

**IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN SEMILLAS DE
MAÍZ RELACIONADAS CON GERMINACIÓN Y VIGOR**

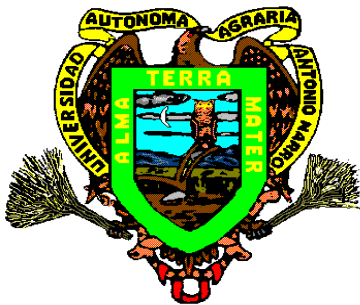
MARIA ALEJANDRA TORRES TAPIA

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

MAESTRO

EN TECNOLOGÍA DE GRANOS Y SEMILLAS



**Universidad Autónoma Agraria
Antonio Narro**

Programa de Graduados

Buenavista, Saltillo, Coah. México

Octubre de 2004

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

SUBDIRECCION DE POSTGRADO

**IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN SEMILLAS DE
MAÍZ RELACIONADAS CON GERMINACIÓN Y VIGOR**

TESIS

POR

MARIA ALEJANDRA TORRES TAPIA

Elaborada bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y aprobada
como requisito parcial para optar al grado de:

MAESTRO
EN TECNOLOGIA DE GRANOS Y SEMILLAS

COMITÉ PARTICULAR

Asesor principal:

Dr. Mario Ernesto Vázquez Badillo

Asesor:

Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal

Asesor:

MC. Federico Facio Parra

Asesor:

Msc. Rafael Jiménez Salazar

Dr. Jerónimo Landeros Flores
Subdirección de Postgrado

Buenavista, Saltillo, Coahuila, Octubre 2004

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por las facilidades brindadas para avanzar en la superación académica personal y al Centro de Capacitación y Desarrollo de Tecnología de Semillas por brindarme la oportunidad de desarrollarme profesionalmente y por el apoyo brindado durante mis estudios.

A la Empresa Monsanto S.A. de C.V. por brindarme la oportunidad de elaborar un trabajo en conjunto con la Universidad y por la aportación de sus materiales para la realización del trabajo de investigación.

Al Ing. Rafael Jiménez por darme la oportunidad de realizar mi estancia en la Empresa Monsanto, así como dar la idea del trabajo de investigación.

Al Dr. Mario Ernesto Vázquez Badillo por su apoyo, sugerencias y observaciones durante el desarrollo del trabajo de investigación.

A la Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal por su invaluable apoyo, sus atinadas sugerencias y ayuda brindada para la realización de la parte bioquímica de esta investigación.

Al Ing. Federico Facio Parra, por ser un buen maestro y darme las sugerencias brindadas para la elaboración del presente trabajo.

A la Dra. Margarita Murillo por su amistad y el apoyo que me brindó a lo largo de mis estudios.

A la Ing. Lourdes Hernández Hernández y al Ing. José A. Daniel, por su amistad y entusiasmo para que yo realizara mis estudios.

A la TLQ María de Jesús Sánchez por su amistad y apoyo para la realización del trabajo de investigación.

Al Ing. Candelario Díaz, compañero de estudios y desvelos durante mis estudios de maestría

DEDICATORIA

A mi Señor Jesucristo, por darme la vida y fortalecer mi camino, bendiciéndome con una maravillosa familia.

A mi Mamá, Sra. Josefina Tapia Pacheco, por ser una mujer luchadora, ejemplar y ayudarme en mi superación personal y profesional; con todo mi amor y admiración por ser una mujer de Fe. Dios te bendiga.

A mi Papá, Sr. Jorge Torres Alonso, quien se gozaría conmigo por mi logro.

A mi amado Esposo, por su grande amor y paciencia que me tiene, por haberme ayudado incondicionalmente, por su comprensión por el tiempo que no podíamos estar en familia. Dios gracias por su vida.

A mis hijos, Eric y Gabriela, por ser el tesoro máspreciado que Dios me dio y que son mi razón de seguir superándome. Dios los bendiga.

A mis Hermanos, por su amor, oraciones y ayuda en los momentos difíciles. Los amo.

A mi Suegra y Cuñadas, Sra. Carmen Villa Sifuentes, Srita. Manuela Zamora Villa y Srita. Carmen Zamora Villa, por su amor y ayudarme incondicionalmente en los momentos que no estaba en casa. Dios las bendiga.

A todos mis familiares y amigos, que aunque no los nombre a cada uno, los quiero y les doy las gracias por su apoyo.

COMPENDIO

Identificación y Cuantificación de Proteínas en Semillas de Maíz Relacionadas con Germinación y Vigor

POR

MARIA ALEJANDRA TORRES TAPIA

**MAESTRIA PROFESIONAL
TECNOLOGIA EN GRANOS Y SEMILLAS**

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, OCTUBRE 2004

Dr. Mario Ernesto Vázquez Badillo-Asesor-

Palabras claves: Maíz, genotipos, semilla, imbibición, germinación, vigor, proteínas, albúmina, globulina, zeína, glutelina, electroforesis.

La presente investigación se realizó en los laboratorios de ensayos de calidad en semillas y de apoyo a la investigación de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Así como las evaluaciones de campo se llevaron a cabo en el Municipio de La Barca, Jalisco; en tres localidades: Salamea, San Antonio, Santa Lucia, ubicado al oriente del Estado. Sus coordenadas son de los 20°15' 30" a los 20°26'45" de la latitud norte y de los 102°20'40" a los 102°21' 20" de longitud oeste, a una altura de 1,530 msnm.

Se evaluaron nueve genotipos de maíz (pertenecientes a la Empresa Monsanto, S. A. de C V.) en sus atributos de calidad fisiológica (germinación y vigor), sanitaria y genética (tipos y cantidad de proteínas en las membranas celulares), así como la tasa de imbibición, con el fin de caracterizarlos, establecer una relación entre las variables evaluadas, similitud entre los genotipos y relacionarlos con su comportamiento en campo bajo los métodos de siembra en seco y húmedo.

Para la mayoría de las variables evaluadas se realizó un análisis de varianza bajo el diseño completamente al azar con cuatro repeticiones, excepto para el porcentaje de proteína total en las estructuras evaluadas de la semilla (semilla entera, endospermo y embrión), donde solo se realizaron dos repeticiones. Adicionalmente se realizó un análisis de componentes principales con el fin de estudiar la relación entre variables y establecer la similitud entre los genotipos.

Los parámetros de calidad fisiológica se evaluaron de acuerdo a las reglas de la ISTA (1996) y AOSA (1992 y 1983), mientras que la sanidad de la semilla se evaluó e identificó conforme a lo descrito por Neergaard (1977). En lo referente a el porcentaje de proteína total en semilla entera, endospermo y embrión, se utilizó el método de Macrokjeldahl, así mismo, la cuantificación de las proteínas albúmina, globulina, zeína y glutelina se determinó por el método

de Lowry, donde finalmente estas se separaron en fracciones polipéptidicas por una separación de electroforesis vertical (PAGE-SDS).

Los resultados indicaron que los genotipos G1, G2, G3 y G4 obtuvieron una tasa de imbibición más alta que el resto de los genotipos. Los genotipos G1 y G3 mostraron valores bajos de germinación inicial a las 24, 32 y 48 horas de imbibición, resultando más acentuada la disminución en el G3. Lo anterior también se reflejó en los bajos valores de vigor en los tiempos de imbibición mencionados. Por otra parte, se reportaron valores altos de infección de *Fusarium moliniforme* en los genotipos G1 y G3, por lo que se asume que influyó en la expresión de la germinación y vigor de la semilla.

En la proteína total en semilla entera resultó con mayor valor el G11 (10.07%) y con el más bajo el G2 (8.32%). En la porción de endospermo se reafirmó el G11 (9.26%) como el de mayor contenido, mientras el G3 (6.6%) mostró lo contrario. En el embrión, resultó ser el genotipo G10 el de mayor valor (42.76%) y G9 el de menor valor (10.02%).

En la cantidad de albúmina en endospermo y embrión, el G13 presentó los mayores contenidos, así como el G11, quien reportó la mayor cantidad en el embrión. En cuanto a la globulina, destacaron los genotipos G11 y G13 con 0.78 y 0.79 mg/ml respectivamente, en tanto que el G12 en su cantidad en el endospermo fue de 0.19 mg/ml; mientras que en el embrión no se encontró

diferencia. Los mayores contenidos de zeína se obtuvieron nuevamente en los genotipos G11 y G13 en semilla entera y el G2 en endospermo, así como estos mismos en el embrión. La glutelina se obtuvo en mayor cantidad en el G12 en semilla entera y en el embrión, en tanto que en el endospermo resultó con mayor contenido el G13.

El análisis de componentes principales señaló algunas relaciones interesantes entre la capacidad de germinación y el vigor asociándolos positivamente, y de forma negativa con la infección por *Fusarium*. Así mismo, la capacidad de germinación y vigor se relacionaron positivamente con la glutelina en las tres formas evaluadas en la semilla, aunado a la concentración de zeína en la semilla entera, pero negativamente con la infección por el patógeno mencionado y con las concentraciones de globulina y albúmina en semilla entera, así como de ésta última en el embrión.

Lo anterior se interpreta que a mayor concentración de albúmina y globulina en la semilla entera hay mayor infección del patógeno y en consecuencia, menor germinación y vigor en la semilla.

La mayor similitud se observó entre los genotipos G2, G10 y G11, los cuales se diferenciaron mayormente de los genotipos G3 y G1; quienes mostraron menor germinación y vigor, mayor infección por *Fusarium*

moliniforme y menor contenido de glutelina en general, lo cual se relacionó con la baja emergencia en campo bajo el método de siembra en seco.

ABSTRACT

PROTEIN IDENTIFICATION AND CUANTIFICACION IN MAIZE SEED RELATED TO GERMINATION AND VIGOR

MASTER

GRIAN AND SEED TECHNOLOGY

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, OCTOBER 2004

Dr. Mario Ernesto Vazquez Badillo- Adviser-

Key words: Maize, genotypes, seed, imbibition, germination, vigor, proteins, albumen, globulin, zein, glutelin, electrophoresis.

The present investigation was made in the research laboratories of seeds quality and support the investigation of Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro. As well as the field evaluations were carried out in the Municipality of La Barca, Jalisco; in three localities: Salamea, San Antonio, Santa Lucia, located to the east of the State. Their coordinates are of 20°15' 30" to 20°26'45" of the North latitude and 102°20'40" to 102°21' 20" of west longitude, to a 1.530 height of masl.

Nine maize genotypes were evaluated (from the Monsanto Company, S.A. of C V.) in their attributes of physiological quality (germination and vigor), sanitary and genetics (proteins types and amount in cellular membranes), as well as the rate of imbibition, with the purpose of characterizing them, establishing a relation between the evaluated variables, similarity between the genotypes and to relate them to their field behavior under the methods of dry and humid sowing.

Most of the evaluated variables made an analysis of variance under a random design with four repetitions, except for total protein percentage in the seed structures evaluated (whole seed, endosperm and embryo), where two single repetitions were made. Additionally an analysis of main components was made with the purpose of studying the relation between variables and establishing the similarity between the genotypes.

The parameters of physiological quality were evaluated under the rules of ISTA (1996) and AOSA (1992 and 1983), While as the health of the seed was evaluated and identified according Neergaard (1977). With respect to the percentage of total protein in whole seed, endosperm and embryo, the method of Macrokjeldahl was used, also, the quantification of proteins albumen, globulin, zein and glutelin was determined by the Lowry method (1951), these were separated in polipeptidic fractions by a separation of vertical electrophoresis (PAGE-SDS).

The results indicated that genotypes G1, G2, G3 and G4 showed a rate of imbibition higher than the rest of the genotypes. The genotypes G1 and G3 showed low values of initial germination to 24, 32 and 48 hours of imbibition, being more the diminution in G3. In consequence also was reflected in low values of vigor in times of imbibición. On the other hand, high infection values of *Fusarium moliniform* in genotypes G1 and G3 were reported, reason why it is assumed that it influenced in the expression of the seed germination and vigor.

The total protein in whole seed the G11 showed a greater value (10.07%) and the lowest G2 (8.32%). The endosperm portion of the G11 (9.26%) with a greater content was reaffirmed, while the G3 (6.6%) showed the opposite. In the embryo, the G10 genotype the one with a greater value (42.76%) and G9 the one of smaller value (10.02%).

The albumen amount in endosperm and embryo, the G13 showed the greater contents, as well as the G11, was with the greater amount in the embryo. As far as the globulin, the best genotypes were G11 and G13 with 0.78 and 0.79 mg/ml respectively, whereas the G12 its endosperm amount were 0.19 mg/ml; whereas in the embryo did not show differences. The greater contents of zein again obtained in genotypes G11 and G13 in whole seed and G2 in endosperm, as well as these same ones in the embryo. The glutelin was

obtained in greater amount in G12 in whole seed and embryo, whereas in endosperm the G13 was with greater content.

The main components analysis indicated some interesting relations between the capacity of germination and vigor associating them positively, and a negative form with infection by *Fusarium*. Also, the capacity of germination and vigor were related positively to glutelin in the three forms evaluated in the seed, combined to the concentration of zein in the whole seed, but negatively with the infection by the mentioned pathogen and with the concentrations of globulin and albumen in whole seed, as well as of this last one in the embryo.

Interpreting that a greater concentration of albumen and globulin in the whole seed there is greater infection of the pathogen and consequently, minor seed germination and vigor.

A greater similarity was observed between the genotypes G2, G10 and G11, which were mainly different from genotypes G3 and G1; who showed a minor germination and vigor, greater infection by *Fusarium moliniforme* and smaller content of glutelin in general, which was related to low emergency in field under the method of sowing in dry.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CUADROS.....	xvii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xix
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
CALIDAD DE SEMILLA.....	6
PROCESO DE GERMINACIÓN.....	15
PROTEÍNAS EN LAS SEMILLAS.....	23
RELACIÓN ENTRE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS DE LA SEMILLA.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
UBICACION DEL AREA DE ESTUDIO.....	38
MATERIAL GENETICO.....	38
PARÁMETROS A EVALUAR.....	39
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	53
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	58
CONCLUSIONES.....	99
RESUMEN.....	101
LITERATURA CITADA.....	104
APENDICE.....	110

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
3.1	Relación de genotipos utilizados en el estudio.....	39
3.2	Volúmenes utilizados para la curva estándar de Seroalbúmina.....	48
3.3	Soluciones para la preparación del gel concentrador y de corrida en la prueba de electroforesis vertical.....	51
4.1	Ecuación de predicción para la tasa de imbibición y coeficientes de determinación.....	60
4.2	Cuadrados medios y significancia, resultado de la comparación de medias para las variables evaluadas en la prueba de capacidad de germinación a cero horas de imbibición.....	61
4.3	Cuadrados medios y significancia, resultado de la comparación de medias para las variables evaluadas en la prueba de capacidad de germinación a 24 horas de imbibición.....	63
4.4	Cuadrados medios y significancia, resultado de la comparación de medias para las variables evaluadas en la prueba de capacidad de germinación a 32 horas de imbibición.....	65
4.5	Cuadrados medios y significancia, resultado de la comparación de medias para las variables evaluadas en la prueba de capacidad de germinación a 48 horas de imbibición.....	67
4.6	Cuadrados medios y significancia, resultado de la comparación de medias para las variables evaluadas en la prueba de envejecimiento acelerado.....	68
4.7	Cuadrados medios y significancia, resultado de la comparación de medias para las variables evaluadas en el tiempo de 0 horas y envejecimiento acelerado	

	respectivamente.....	69
4.8	Cuadrados medios y significancia, resultado de la comparación de medias para las variables evaluadas en los tiempos 2 (24horas), 3 (32 horas) y 4 (48 horas) respectivamente.....	72
4.9	Cuadrados medios y significancia, resultado de la comparación de medias para la semilla infectada por <i>Fusarium moliniforme</i>	73
4.10	Cuadrados medios y significancia para cuantificación de albúmina y globulina por el método de Lowry en semilla y sus partes.....	76
4.11	Cuadrados medios y significancia para cuantificación de albúmina y globulina por el método de Lowry en semilla y sus partes.....	77
4.12	Comparación de medias en las diferentes proteínas de semilla entera de los genotipos evaluados.....	80
4.13	Comparación de medias en las diferentes proteínas del endospermo de los genotipos evaluados.....	80
4.14	Comparación de medias en las diferentes proteínas del embrión de los genotipos evaluados.....	80
4.15	Cuadrados medios y significancias de proteínas totales en semilla entera, endospermo y embrión en los genotipos evaluados.....	81
4.16	Comparación de medias en proteína total en semilla entera, endospermo y embrión en los genotipos evaluados.....	82
4.17	Coeficientes de correlación de variables con los factores, eigenvalores y varianza explicada para los nueve genotipos de maíz.....	94

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
4.1	Tasa de imbibición de los genotipos evaluados a intervalos de 4 horas.....	60
4.2	Separación por electroforesis vertical PAGE-SDS de proteína estándar seroalbúmina de bovino (66.0 KD).....	84
4.3	Gel de poliacrilamida de nueve genotipos de maíz en semilla entera y el estándar de la proteína seroalbúmina.....	85
4.4	Gel de poliacrilamida de nueve genotipos de maíz en endospermo y en embrión de la proteína albúmina.....	87
4.5	Gel de poliacrilamida de nueve genotipos de maíz en endospermo y en embrión de la proteína globulina.....	88
4.6	Gel de poliacrilamida de nueve genotipos de maíz en semilla entera, en endospermo y en embrión de la proteína zeína.....	90
4.7	Gel de poliacrilamida de nueve genotipos de maíz en semilla entera, en endospermo y en embrión de la proteína glutelina....	91
4.8	Relación entre variables estudiadas con base en los dos primeros factores (fisiológico y químico-sanitario).....	95
4.9	Relación entre genotipos estudiados con base en los dos primeros factores (fisiológico y químico-sanitario).....	96
4.10	Comportamiento de la germinación en los genotipos G1,G2, G3 y G4 en tres localidades.....	97
4.11	Comportamiento de la capacidad de germinación en campo de cuatro genotipos evaluados.....	98

INTRODUCCIÓN

El maíz es el segundo cultivo del mundo por su producción, y es el primer cereal en rendimiento de semilla por hectárea. Por ser un alimento de primera necesidad este cereal es de gran importancia económica a nivel mundial, ya que es utilizado como alimento para el humano y animal, o como fuente de un gran número de productos industriales.

En la actualidad, en México se destina una superficie de 10.8 millones de hectáreas para sembrar cereales; de las cuales, 7.7 son ocupadas por maíz, de aquí su importancia económica, aunado que, es el principal alimento consumido por los mexicanos. La producción promedio anual en México, según la FAO en el 2003 fue de 19.6 millones de toneladas, donde sus rendimientos fluctúan de 1.8 a 3.2 ton/ha., produciendo 425.7 miles de toneladas de semilla de este cultivo, aportando así el 2.16 por ciento de la producción nacional.

En nuestro país, se presentan problemas muy complejos en la agricultura, tales como, la pérdida creciente de especies y biodiversidad, que esta ligada al deterioro de hábitats, sobreexplotación de recursos, cambios climáticos, la dispersión acentuada de especies exógenas y la contaminación ambiental.

Es importante destacar, que dentro de la problemática, juega un papel importante los agentes causales y los vectores de enfermedades, los cuales cada vez son más resistentes a los controles químicos y biológicos; y por si fuera poco, el suelo sufre erosión, sobreexplotación, pérdida de fertilidad, y salinidad.

Consciente de esta situación, las instituciones de investigación, Universidades y empresas productoras de semillas, han desarrollado nuevas tecnologías que proporcionan soluciones integrales, mediante el uso de semillas mejoradas de alto rendimiento, resistentes a plagas, a enfermedades y a condiciones adversas, las cuales contribuyen a reducir la contaminación del suelo y el agua, e incrementan el valor nutricional de los granos; tal es el caso de la Compañía Monsanto, S. A. de C V. Esta compañía, presenta un elemento que seguramente tiene un papel cada vez más significativo y preponderante en el desarrollo de las semillas mejoradas, el área de control de calidad; la cual ayuda a solucionar problemas al momento de la generación de semillas, o bien, desde que la semilla ha sido sembrada hasta su comercialización, motivo por el cual se llevan a cabo acciones de monitoreo constante para que la semilla no pierda sus atributos de calidad.

Un aspecto relevante de esto, lo constituye la detección en semillas generadas por los fitomejoradores referente a su germinación y vigor cuando son sembradas en seco y se aplica posteriormente el riego, presentando niveles

bajos de germinación y por consiguiente de vigor; en cambio, cuando son sembradas en tierra venida, sus valores de germinación y vigor son altos.

Dado el estricto control que se lleva en cada una de las etapas de producción de semillas (producción, acondicionamiento y almacenamiento), se descartó que el problema anteriormente descrito fuera debido a una falla en los procesos mencionados y que pudieran existir otros factores que estén afectando el comportamiento de los materiales. Algunos de ellos podrían ser los parámetros fisiológicos, y que ha explorado el proceso de imbibición; en tanto en el bioquímico, Goodman (2002) menciona que las proteínas celulares atraviesan la membrana varias veces, formando de esta manera, un conducto con mayor grado de polaridad dentro de la misma, por lo que son llamadas proteínas transportadoras, cuyo mecanismo de acción es utilizar los solutos del medio para transportar agua y nutrientes del exterior al interior de la célula o viceversa; iniciando así la etapa de imbibición en el proceso de la germinación.

Por lo anterior, la Compañía Monsanto le propuso a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro a través del Centro de Capacitación y Desarrollo de Tecnología de Semillas, a participar en un proyecto de investigación, con el objeto de conocer el fenómeno causante de este comportamiento en algunos de sus materiales mejorados; teniendo el siguiente:

Objetivo General

Caracterizar nueve genotipos de maíz en función del tipo y cantidad de proteínas en las membranas de la semilla que inciden en la germinación y el vigor

Objetivos Específicos

1. Identificar los tipos y cantidad de proteínas en las membranas de la semilla de nueve genotipos de maíz.
2. Identificar los genotipos susceptibles y tolerantes en la manifestación de la germinación y el vigor bajo diferentes tiempos de imbibición de la semilla y su correlación con el tipo y cantidad de proteínas, así como su sanidad.
3. Evaluar genotipos procedentes de la Compañía Monsanto, desde el punto de vista fisiológico y químico bajo los métodos de siembra en seco y húmedo.

Hipótesis

- La germinación y el vigor de los genotipos estudiados, presentan diferencias influenciadas por los tipos y cantidades de proteínas presentes en las membranas celulares, además de la sanidad de semilla.
- Al menos un genotipo de los evaluados tendrá similitud en su tasa de imbibición, germinación y vigor, así como en sus tipos y cantidades de proteínas presentes en las membranas celulares que el genotipo testigo.

REVISION DE LITERATURA

Calidad de Semilla

La calidad de la semilla es un concepto múltiple que comprende varios componentes, los cuales se refieren a la conveniencia de aptitud de la semilla para sembrarse, designados como: componente genético, fisiológico, sanitario y características físicas (Thomson, 1979). De igual manera Garay (1989), coincide con este autor y menciona que la presencia de los cuatro componentes permite que la semilla esté en su máxima calidad integral. Este concepto también coincide con lo mencionado por Bustamante (1995), quien además estableció la necesidad de identificar claramente los aspectos que requieren atención y definir los límites de tolerancia que garantice en cada etapa, el logro de la máxima calidad genética, física, fisiológica y sanitaria de la semilla producida.

Recientemente, Hampton (2001) señaló que la calidad de semilla puede ser vista como un patrón de excelencia que van a determinar el desempeño de la semilla en la siembra o en el almacén; y que es utilizada para reflejar el valor de la semilla para propósitos específicos, como es la distribución y comercialización.

En forma general se menciona que:

Calidad = G + F + S + CF

G = Componente genético

F = Componente fisiológico

S = Componente sanitario

CF = Características físicas

A continuación se describe cada uno de los componentes de la calidad de la semilla.

Componentes de Calidad

Componente Genético

Thomson (1979), menciona que la calidad se determina por el genotipo de la variedad o híbrido, llamando calidad genética a las características sobresalientes del material genético superior. Las cuales son obtenidas durante la etapa del mejoramiento genético (Garay, 1989); y para que no se pierdan, es necesario identificar los cultivares de potencial y valor comercial (De la Torre, 1992).

Componente Fisiológico

La calidad fisiológica de la semilla incluye los atributos de viabilidad, capacidad de germinación y vigor; siendo la semilla un insumo vivo, es importante el que cuente con la capacidad de reproducir una planta para lograr su establecimiento en campo y obtener rendimientos de forraje y/o grano (Bustamante, 1995). Por su parte, Moreno (1996) considera que la calidad fisiológica es un valor comercial por ser el principal atributo a evaluar, ya que consiste en la capacidad de la semilla para germinar y producir una plántula normal. Por otro lado, Thomson (1979) marcó que las características de la semilla son que fuera viable, que tuviera alta capacidad de germinación y vigor; así mismo, que la calidad fisiológica depende de muchos factores y puede ser muy fácilmente dañada en cualquiera de sus etapas: maduración, cosecha, trillado, secado, desgrane, acondicionamiento, almacenamiento, distribución, siembra y en el suelo mismo.

Moreno (1996) define a la germinación, como la emergencia y desarrollo de aquellas estructuras esenciales que provienen del embrión, y que manifiestan la capacidad de la semilla para producir una planta normal bajo condiciones favorables, coincidiendo con las definiciones de la AOSA (1993) e ISTA (1996). Esta última Asociación añade que, la germinación de semillas en un ensayo de laboratorio es la emergencia y desarrollo de la plántula a un

estado donde el aspecto de sus estructuras esenciales indican si son o no capaces de desarrollarse en una planta satisfactoria bajo condiciones favorables de suelo.

Otro de los atributos que actualmente se ha considerando dentro del manejo de semillas es el vigor, el cual, en 1977 la ISTA lo definió como la suma total de aquellas propiedades de la misma que determinan el nivel de actividad y comportamiento de la semilla o lote de semillas durante la germinación y emergencia de la plántula. Este concepto varió un poco, ya que la AOSA en 1980 lo describió como aquellas propiedades de la misma que determinan el potencial para una rápida, uniforme emergencia y desarrollo de plántula, bajo una amplia variación de condiciones de campo (Moreno, 1996). El mismo autor menciona que, al evaluar el vigor de las semillas es de gran utilidad para predecir el comportamiento de un lote cuando las condiciones del medio ambiente no son del todo favorables para la germinación y emergencia de las plántulas. El manual de la ISTA (1996) menciona por último, que las semillas que muestran un buen comportamiento son consideradas de alto vigor, y aquellas que presentan un pobre comportamiento son llamadas de bajo vigor.

Componente Sanitario

La ISTA (1996), define como sanidad de semillas, principalmente a la ausencia de organismos causantes de enfermedades, tales como hongos, bacterias y virus, y pestes animales, como son nemátodos o insectos, además

condiciones fisiológicas como vestigios de deficiencia de elementos que pueden estar incluidos, coincidiendo con la definición de Moreno (1996). Por su parte Garay (1989), mencionó que es una de las cualidades básicas de sanidad de la semilla, ya que esta influye en el potencial de productividad.

Recientemente, el concepto de sanidad se ha ampliado para considerar la presencia de toxinas producidas por los microorganismos que pueden contaminar un lote. Al respecto Champeil *et al.*, (2003) mencionan que el nivel de contaminación del grano por micotoxinas depende del clima y de los sistemas de siembra. Los mismos autores realizaron un estudio en cuatro sistemas de siembra, en tres ciclos de cultivo, con contaminación natural de *Fusarium*; la severidad de *Fusarium* y niveles de toxinas difirieron entre años, debido a efectos climáticos.

Sólo en un ciclo, la severidad del *Fusarium* mostró diferencias entre los sistemas de siembra, siendo más severo en el sistema convencional, donde se registraron niveles severos de enfermedades con micotoxinas, estos niveles de contaminación fueron los más altos con el sistema de siembra directa; sin poder comparar los sistemas orgánico y convencional, debido a que ninguno fue consistentemente más contaminado que el otro, en donde no se encontró ninguna relación clara entre los niveles de severidad de la enfermedad y los niveles de contaminación por micotoxinas (deoxinivalenol, nivalenol o zearalenona) bajo condiciones de contaminación natural.

Por su parte, menciona Luque y sus colaboradores (1995) que existen patógenos capaces de afectar drásticamente en la calidad fisiológica por ejemplo el *Fusarium moliniforme*, el cual comprende un amplio y heterogéneo grupo de hongos de distribución mundial, frecuentemente aislados como saprófitos en aguas, suelos y substratos orgánicos en descomposición

Características Físicas

Entre las principales características físicas de interés están: la pureza analítica, el contenido de humedad, peso de la semilla y el color, entre otras. Estas son indicadoras de la calidad de un lote de semillas (Garay, 1989). Quien al mismo tiempo señala que; todos los componentes juegan un papel importante en la aptitud de la semilla para la siembra, y que la calidad de ésta puede ser calificada a partir de ciertos atributos como: pureza genética, viabilidad, vigor, magnitud de daño mecánico, grado de sanidad, contenido de humedad, pureza física, uniformidad, apariencia, peso de la semilla y otros. Respecto al tamaño de semilla, Thomson (1979), menciona dos componentes físicos esenciales, el tamaño y la uniformidad. El tamaño real es una característica varietal y la uniformidad tiene su origen en las condiciones ambientales.

Factores que Afectan la Calidad de la Semilla

Bustamante (1995), menciona que la calidad fisiológica depende de factores bióticos y abióticos que pueden fácilmente dañar la maduración, cosecha, secado, almacenamiento, acondicionamiento, distribución y durante la siembra; y añade que la semilla como una unidad biológica es susceptible a ser dañada en todo instante, por lo que su manejo desde la maduración hasta la siembra requiere de alto grado de especialización.

Según Ferguson (1995), uno de los componentes de la calidad que muestra señales de deterioro, es el vigor de las semillas, seguido por una reducción en la germinación o en la producción de plántulas normales, y finalmente la muerte de las semillas.

Otros aspectos que pueden influir en la calidad de las semillas, según Moreno (1996) son:

- a) El genotipo.- La constitución genética determina el vigor sobre todo en la plántula.
- b) Madurez de la semilla.- Según la madurez de la semilla, el potencial de germinación y vigor aumenta. Semillas maduras dan su máxima expresión de vigor en contraste con las semillas inmaduras.

- c) Condiciones ambientales.- La temperatura del aire y disponibilidad de humedad del suelo, afectan el tamaño de la semilla durante el desarrollo, el rendimiento posterior, la germinación y el vigor.
- d) Tamaño de la semilla.
- e) Daño mecánico.- Semillas dañadas mecánicamente pueden parecer normales, pero presentan un menor vigor que las semillas sin dañar. Este se puede presentar en la trilla, en la limpieza, en el tratamiento, en el envasado, en el transporte y/o durante la siembra.
- f) Envejecimiento.- Disminuye el vigor, y es más susceptible a plagas y enfermedades.
- g) El ataque de plagas y/o enfermedades, ya sea transmitidas por la misma semilla, o el suelo que esta contaminado, afectan la germinación y el vigor.

Baud *et al.*, (2002) describieron el desarrollo de la semilla en tres etapas. Durante la primera etapa se presenta la embriogénesis temprana (es decir, la morfogénesis), el peso de la semilla aumenta y el contenido de lípidos son bajos, mientras que las cantidades importantes de almidón se acumulan transitoriamente. En la segunda etapa, o la fase de la maduración, se presenta un aumento rápido en peso seco de la semilla y la acumulación de grandes cantidades de aceites y proteínas, donde se tiene aproximadamente 40% de materia seca. Durante la tercera y última etapa (maduración incluyendo la adquisición de la tolerancia a la desecación), sigue siendo constante el peso seco, mientras existe una pérdida aguda de agua en la semilla. La síntesis del

almacenaje termina con la acumulación de sacarosa y rafinosa. Revelando la ocurrencia de actividades metabólicas, tales como la síntesis de la proteína en la fase de la desecación del embrión, y una correlación llamativa entre los picos en hexosa al cociente de la sacarosa y las fases de la transición durante la embriogénesis.

Bajo condiciones de almacenamiento, D'Antonino (1993) reporta que las semillas pueden tener calidades diferentes, que dependen de variables ocurridas en etapas anteriores. De este modo, no se puede esperar que un lote de semillas de calidad mediana se comporte igual que un lote de semillas de alta calidad. La calidad inicial de las semillas, según éste autor, depende de los siguientes factores: Condiciones climáticas durante el período de maduración de la semilla, grado de maduración en el momento de la cosecha, daños mecánicos, impurezas, humedad, temperatura, microorganismos, insectos, y roedores. Algunos de estos factores que afectan la calidad dependen en gran manera al tipo de almacén que se le ofrezca a la semilla y el tratamiento químico que se le aplique a la semilla, ya que este sirve como preventivo o como correctivo.

En la década de los 80's, Perry (1987) había descrito los procesos que influyen en el comportamiento de la semilla sobre el vigor, y pueden presentar variaciones asociadas con diferencias en el vigor propio de la semilla, dentro de estos están: los procesos bioquímicos durante la germinación, las reacciones enzimáticas, la actividad respiratoria, la tasa y uniformidad de germinación de la

semilla, el crecimiento de la plántula en el campo, y la habilidad de emergencia de la plántula bajo condiciones no favorables. Así mismo, mencionó que los efectos del nivel del vigor pueden persistir para influir en el desarrollo de la planta, uniformidad del cultivo y el rendimiento.

Por su parte, Ferguson (1995) señaló que la composición química en semillas de soya con elevado contenido de ácidos grasos polinsaturados, sufren importantes reducciones en su calidad fisiológica en períodos relativamente cortos de tiempo. Mencionando que las alteraciones en los procesos bioquímicos son generalmente los primeros cambios detectables que ocurren durante el deterioro de un lote de semillas. Él considera que las pruebas de conductividad eléctrica permiten medir el nivel de integridad de las membranas celulares.

Proceso de Germinación

Weaver (1980), describió el proceso de germinación con un enfoque bioquímico de la siguiente manera:

- a) El agua del medio entra en la semilla, mediante la diferencia entre el potencial hídrico del medio y el potencial hídrico de la semilla; y tanto las células del embrión como del endospermo se hidratan y entra en actividad, por lo que la semilla se hincha. La absorción de agua es un proceso físico-químico y se lleva a cabo más rápido a temperaturas altas.

- b) El embrión empieza a producir ácido giberélico (GA₃), que va actuar en la capa de aleurona que rodea al endospermo y la induce a secretar enzimas hidrolíticas, como la alfa-amilasa, glucosidasa, fosforilasa, lipasa, etc.
- c) Por la acción de la alfa-amilasa y otras enzimas, el almidón se hidroliza liberando glucosa, quien proporciona al embrión energía para su desarrollo.
- d) El embrión empieza a producir citocininas, que junto con el ácido giberélico inducen las síntesis de otras enzimas que degradan las proteínas y lípidos en compuestos más simples.
- e) Por la acción de citocininas y contando con la energía producto de la oxidación de la glucosa y con proteínas solubles, las células del embrión se dividen activamente al romperse la radícula, la testa o pericarpio; y se da por terminado el proceso de germinación.
- f) Las células del endospermo y posteriormente las del embrión sintetizan auxinas, quienes inducen al alargamiento de los meristemas de la radícula primero y del talluelo después. Con un rápido crecimiento inducido por la acción de las auxinas, las citocininas inician el proceso de la diferenciación de los tejidos, así como el crecimiento direccional del talluelo hacia arriba y el de la raíz hacia abajo.

Por su parte, Copeland y McDonald (1985) describieron el proceso de germinación, como una secuencia de eventos físicos, fisiológicos y bioquímicos muy generales, agrupándolos como:

- Imbibición.- Absorción física del agua.
- Hidratación y activación.- Activación de las enzimas y formación de vacuolas.
- División celular y extensión.- Iniciación del crecimiento del embrión.
- Resurgimiento.- Ruptura de la cubierta de la semilla.
- Emergencia de la plántula.- Emergencia física del embrión de la semilla.

Absorción de Agua o Imbibición

Las definiciones del proceso de germinación arriba enunciadas, coinciden en que el primer paso consiste en la hidratación, la cual según Besnier (1989), es condición indispensable en las semillas secas para la activación del metabolismo y la subsiguiente germinación. Así mismo, señaló que la absorción de agua suele efectuarse en tres fases; una fase inicial de rápida absorción, una fase intermedia, en la cual, el contenido de agua de la semilla permanece casi constante, y una fase final de intensa absorción que está relacionada con el alargamiento de las células y la aparición de la radícula.

La primera fase es denominada imbibición, está relacionada con la diferencia del potencial hídrico existente entre la semilla y el sustrato húmedo en el que éstas se encuentran. Constituye un fenómeno puramente físico que tiene también lugar en las semillas muertas o aletargadas y va acompañado por el desprendimiento de calor. Por su parte Bidwell (1979), define la imbibición

como el mecanismo de actuación de procesos bioquímicos, la cual está aplicada en la absorción del agua mediante el movimiento de ésta, de un área de alto potencial hídrico a otra de bajo potencial.

En condiciones naturales, la uniformidad y la rapidez de imbibición dependen de la morfología y de la permeabilidad de las cubiertas, de las características del contacto de semillas con el sustrato húmedo y la diferencia de potencial hídrico. Popinigis (1985) coincide con lo anterior, mencionando que la velocidad de la imbibición de la semilla es afectada por la especie, permeabilidad de la cubierta, temperatura, área de contacto, composición química y condición fisiológica, cantidad de agua y presión hidrostática.

La rapidez de la imbibición, especialmente cuando existe un exceso de agua en el sustrato, tienen generalmente efectos desfavorables para la germinación y el crecimiento de las plántulas. Si la hidratación es muy rápida, el contenido celular se hace soluble, pero las paredes celulares no están aún lo suficientemente hidratadas para funcionar como membranas permeables e impedir la salida de solutos. Además, si las cubiertas están dañadas se produce una pérdida de solutos hacia el sustrato, lo que significa que no solo existe una disminución de las reservas, sino también, el enriquecimiento del sustrato con nutrientes, lo que favorece el desarrollo de hongos del suelo (Besnier, 1989). El mismo autor menciona, que estos fenómenos son importantes y bien conocidos en el caso de las semillas de leguminosas y los daños se agravan cuando la imbibición es rápida y se hace a baja temperatura; todo esto parece ser debido

a una maduración imperfecta de las semillas a causa de temperaturas inadecuadas.

En muchos casos, la entrada inicial de agua tiene lugar por el micropilo o por el callo, tras lo cual, al hincharse las semillas, las cubiertas se abren y se hacen más permeables. En las semillas relativamente grandes de cereales, quienes tienen el embrión situado junto a las cubiertas, éste puede ser hidratado completamente, mientras que el resto de la semilla no lo está; esto es debido a causa de un mayor contenido de proteínas, el embrión absorbe mayor cantidad de agua proporcionalmente, que el endospermo rico en almidón.

En el caso específico del maíz, Kozlowski (1972) menciona que la absorción de agua ocurre a través del pericarpio, provocando la reactivación de las células meristemáticas de la raíz y el ápice de la plántula, coincidiendo en esto Copeland y McDonald (1985). La extensión de la imbibición depende de tres factores: 1) composición química de la semilla, 2) permeabilidad de la cubierta de la semilla y 3) la disponibilidad de agua (Popinigis, 1985).

Pretratamiento de la Semilla (Osmoacondicionamiento)

Besnier (1989), hace énfasis en que no existe una distinción tajante entre la imbibición y la fase intermedia, durante la cual se desencadena un proceso metabólico activo de preparación para la germinación. Las zonas humedecidas

comienzan su actividad metabólica antes de que toda la semilla esté hidratada, especialmente si la hidratación no es uniforme.

Si ocurre entonces una desecación, ésta es más grave si el embrión se ha hidratado. Sin embargo, parece existir un período de tiempo, variable según las especies, e incluso, según distintos lotes de semilla, durante el cual pueden desecarse la semilla o el embrión, sin que se dañe la germinación cuando la semilla se rehídrata.

En chícharos, este lapso de tiempo llega hasta las seis horas después del comienzo de la imbibición; Besnier (1989) indica que durante este tiempo, el agua absorbida se usa para rehidratar moléculas orgánicas desecadas (ácidos nucleicos y proteínas) y que solo después de esta rehidratación, el agua comienza a acumularse en las vacuolas citoplasmáticas, a partir de este momento, la desecación produce daños cada vez mayores.

Tesar (1988), sometió diversos procesos alternativos de imbibición y desecación a semillas de diversas plantas varias veces, encontrando ausencia de daño a la germinación subsiguiente e incluso una germinación más rápida. El tratamiento de semillas con polietilenglicol, que permite una hidratación parcial a causa del potencial osmótico de las soluciones del compuesto químico, mantiene a las semillas en la fase intermedia de absorción de agua.

Si la semilla se seca superficialmente y se hidrata con agua normal, se produce muchas veces una aceleración de la aparición de la radícula y mayor uniformidad en la germinación de los lotes de semilla; a veces, sin embargo, hay aparición de letargo secundario.

La reactivación del sistema metabólico comienza con la imbibición de agua y la rehidratación de proteínas y enzimas, así como de organelos celulares, añadiendo que la respiración se incrementa, seguida de una imbibición inicial a los 10 minutos de haber comenzado, y la duración de este incremento depende del sustrato almacenado en el eje embrionario.

Aspectos Bioquímicos de la Germinación

Además de los descritos por Weaver (1980), recientemente se han realizado estudios específicos sobre aspectos bioquímicos que ocurren durante la germinación, tal es el caso de la investigación realizada por Nicanuzia *et al.*,(2003) para determinar algunas características de semillas de soya y la detección de las actividades de la fosfatasa alcalina en diversos sustratos durante el proceso de germinación. Lo anterior, consistió en la determinación de las actividades enzimáticas con el p-nitrofenilfosfato (pNPP) y el pirofosfato inorgánico (PPi) como sustratos, se detectaron a partir del quinto y séptimo día después de la germinación. Las actividades de la fosfatasa ácida con el fosfato tirosina (TyrP), glucosa-6-fosfato (G6P) y el fosfofenol piruvato (PEP), fueron detectadas pero en menor grado. El aspecto de la actividad de la fosfatasa

coincidía con la disminución del contenido inorgánico del fosfato durante la germinación; sobre el mismo período, el contenido proteínico crecía hasta el quinto día, disminuyendo hasta el octavo día, y seguía siendo constante después de este período.

La actividad de la fosfatasa en los cotiledones fue de 82 por ciento en el hipocotilo y en las raíces de 38 por ciento, respectivamente. Durante el almacén, la enzima mantuvo el 63 por ciento de su actividad por tres meses a 5°C. Los valores constantes de la especificidad (V_{max}/K_m) para el pNPP y PPI era de 212 y 64 V_{max}/K_m en 1 mg de enzima respectivamente. Entre los sustratos probados, PPI podía ser un sustrato fisiológico potencial para la fosfatasa ácida durante la germinación de las semillas de soya.

Kuo *et al.*, (2003) estudiaron el efecto de la luz sobre la cantidad de aminoácidos en la germinación en semillas de habas, lentejas y chícharos, en períodos de 2, 4 y 6 días bajo luz y oscuridad continua. Los aminoácidos libres fueron analizados por electroforesis. Los efectos de la germinación en los aminoácidos libres de la proteína (FPA) y los aminoácidos sin proteínas (FNPA) dependieron del tipo de legumbres y de las condiciones de proceso. Después de la germinación de habas, el contenido de histidina, glutamato, glicina, arginina, tirosina y triptofano disminuyó, mientras que de lentejas y de chícharos, los FPA aumentaron después de la germinación.

La germinación ligera produjo cantidades más altas de FPA en habas y lentejas, pero el más bajo en chícharo. Las FNPA hubo un cambio marcado en la germinación. En habas, la germinación produjo una reducción – ácido amino adípico y un aumento de ácido aminobutírico. Todo el FNPA aumentó en lentejas y chícharo; en la germinación ligera se obtuvo el valor más alto, los niveles de ácido amino atípico en habas, y más alto en lentejas. El contenido más alto de FNPA fue encontrado en chícharos después de la germinación oscura.

Proteínas en las Semillas

Las unidades básicas de las proteínas son los α -aminoácidos. Químicamente, se pueden unir mediante la formación de un enlace amido o peptídico; definiendo esta reacción como una condensación (por la pérdida de agua) entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino de otro, dando lugar a un dipéptido, esta reacción se puede repetir con más aminoácidos, que se unen en una cadena formando tripéptidos, tetrapéptidos etc; A cada uno de los aminoácidos incorporados en el polipéptido se le denomina residuo. Los péptidos de 10 a 100 aminoácidos se llaman polipéptidos, mientras que aquellos con más de 100 aminoácidos se denominan proteínas.

Por lo general, los polipéptidos y proteínas que se aíslan de células y tejidos contienen entre 2 y 2000 aminoácidos. Por lo que se supone que el peso molecular promedio de todos los aminoácidos es de 110, se puede estimar que el peso molecular de la mayoría de las cadenas de péptidos y proteínas va de 220 a 220 000, aunque también se han encontrado más grandes (Boyer, 2000).

Las proteínas, que constan de una sola cadena polipéptidica se denominan monoméricas, en tanto las oligoméricas constan de dos o más cadenas de polipéptidos, y muchas se mantienen unidas por interacciones no covalentes. Estas últimas, constituyen el principal componente de las semillas que contienen coloides que absorben agua; también lo hacen los mucílagos y las sustancias pécticas; por el contrario, el almidón no interviene en este proceso, porque sólo absorbe agua en condiciones ácidas y tras tratamiento a altas temperaturas.

Uno de los estudios recientemente realizados, muestra que los contenidos proteínicos de la semilla y los factores de conversión del nitrógeno a proteína, calculados en 13 especies de semillas tropicales poco conocidas, basadas en el nitrógeno total (tradicional) y la suma de aminoácidos totales. El contenido proteínico total, calculado del residuo total de aminoácidos, varió desde 4.90 en *Diospiros mespiliformis* hasta 32.47 g/100 g de peso fresco en *Gliricidia sepium*.

En algunas semillas, las comparaciones indicaron diferencias significativas entre el contenido proteínico basado en el factor tradicional (6.25) y el análisis

de aminoácidos. Un promedio de 22 por ciento de nitrógeno total de la semilla parece ser que no forma proteínas. En general, un factor de conversión de 5.5 parece proporcionar una estimación mucho más exacta de las proteínas de la semilla. Se concluye que el factor de la conversión basado en el aminoácido total, más bien que el factor tradicional 6.25, es más válido para estimar contenidos proteínicos (Ezeagu *et al.*, 2002).

En otro estudio realizado por Vaz *et al.*, (2003) se determinó la variabilidad en las fracciones de la proteína en gemoplasma de *Lupinus albus*, para obtener datos e información en relaciones genéticas y para programas de siembra. Resultando las globulinas, las principales proteínas de la semilla extraídas con hidróxido de sodio (en forma de glutelinas). Varias fracciones de la proteína fueron separadas por electroforesis (con gel polyacrilamida) y los patrones fueron examinados por análisis multivariado.

Las bandas de las glutelinas junto con los polipéptidos glucosilados demostraron tener la capacidad discriminatoria más alta, mostrando que es posible que los patrones del polipéptido podrían reflejar las especificidades microclimáticas relacionadas con altitud y temperatura. De hecho, un cultivar del sur de alta latitud, fue agrupado con los tipos del norte, donde la planta se adaptada a un clima más frío y más húmedo, mientras que dos cultivares de una región del norte más caliente fueron agrupados con los tipos meridionales.

Los resultados demuestran además, que existe una correlación general entre las características de floración temprana del cultivar y cantidades más altas de proteína y glutelinas totales de la semilla, y la glucosilación más baja de glutelina. Lo cual resultó de interés, que el alto contenido de proteínas de la semilla y el florecimiento temprano son puntos importantes del programa de siembra.

Una de las proteínas que ha tenido importancia en cuanto a su actividad metabólica es la zeína (Forato *et al.*, 2000). Además, mencionan que las zeínas son las proteínas de almacenaje en semillas de maíz, las cuales son abundantes en endospermo, y se sintetizan en el retículo endoplásmico rugoso y se deposita en discretos organelos llamados cuerpos de proteínas. Algunos investigadores utilizaron dicroísmo circular y la dispersión rotativa óptica, y determinaron que estas proteínas tienen un alto contenido α -hélice en solución alcohólica. Por lo que, ellos estudiaron estas proteínas, tanto dentro de la semilla, como en la extracción de los granos del maíz con etanol al 70 por ciento, usando la espectroscopia NMR (de resonancia magnética nuclear). Demostrando la presencia de ácidos grasos libres dentro de ambos, en cuerpos de proteínas y también en las α -zeínas extraídas con alcohol. Presentando evidencias donde existe una interacción directa entre los ácidos grasos libres y las proteínas de α -zeína y dentro de los cuerpos de proteínas. Además sugieren los posibles mecanismos por los cuales tal asociación sea presentada durante la evolución del endospermo del maíz.

En una investigación sobre la composición de la proteína prolamina (llamada zeína) en semilla de maíz, encontraron que los resultados de electroforesis marcaron tres fracciones de proteínas, las cuales fueron identificadas como alfa-zeinas (24.1k y 23.4k combinados como Z19; 26.8k como Z22), extraídas con 2-propanol acuoso, tres fracciones de alfa-alfa-zeína (26.8k, 24.1k y 23.4k eran predominantes); y utilizando etanol al 75 por ciento, encontraron alfa-alfa-zeína a temperatura de medio ambiente, y con ese mismo solvente a 60°C encontraron delta-delta zeína (Wang *et al.*, 2003).

Los inhibidores del aminoácido serina se distribuyen en la naturaleza e inhiben la actividad de enzimas como la tripsina y la quimotripsina. Estas proteínas interfieren con los procesos fisiológicos tales como la germinación, maduración y forman la primera línea de defensa contra el ataque del depredador de la semilla. Los inhibidores que se han estudiado son la proteinasa de la serina, que se encuentra en las especies de leguminosas, gramíneas y solanaceas (Sattar *et al.*, 2004).

Relación entre la Composición Química y Características Genéticas de la Semilla

Los estudios más recientes en la bioquímica de las semillas, han reportado una relación muy íntima entre su composición química y la manifestación genética y fisiológica de las semillas. Dupont y Altenbach (2003), explican que los efectos del ambiente se sobreponen en los patrones temporales intrínsecos

de la expresión del gene durante el desarrollo del grano. Trabajaron con la integración de estudios genómicos y proteínicos bajo condiciones ambientales controladas para resolver patrones complejos de la expresión del gene durante el desarrollo del grano. Estableciendo claramente los procesos reguladores dominantes que son influenciados por el ambiente, y revela la base molecular de las consecuencias del medio ambiente en la composición y la calidad de la harina. Estas proteínas se pueden identificar por la digestión proteolítica y la huella dactilar total del péptido, también por medio de bases de datos, usando las etiquetas de la corto-secuencia generadas por espectrometría total. Demostrando que la información sobre el comportamiento cromatográfico de péptidos puede asistir a la identificación de la proteína por huella dactilar de la masa del péptido en espectrometría líquido del cromatógrafo de masas (Palmlblad *et al.*, 2002).

La ISTA (1996), señala que un patrón de bandas de proteínas producidas en un electróforo grama, está relacionado con la constitución genética y puede considerarse como la “huella digital” de una variedad. Las “huellas digitales” se pueden utilizar para identificar muestras desconocidas y mezclas por análisis de semilla individual. Por ejemplo, las proteínas solubles en alcohol (zeína) son extraídas de semillas individuales y separadas por el método de electroforesis en un gel de lámina ultradelgado. El patrón de las bandas de proteínas encontradas en el gel es una característica para una variedad o una línea. También, generalmente es posible estimar la pureza de la muestra del híbrido, encontrando una o más bandas de zeína en el parental masculino que está

ausente en el parental femenino (y presente en el híbrido). Estas bandas se pueden usar como bandas marcadoras para verificación de los híbridos y como un medio de estimar pureza híbrida.

Para semilla híbrida, es posible determinar pureza híbrida (tasa de autofecundación). Se asume que ambos parentales son homogéneos. Comparando los patrones de proteína de los parentales femenino y masculino con el híbrido, uno o más bandas marcadores (presente en el macho solamente) se necesitan encontrar en el híbrido. Semillas con patrón de proteínas idénticas al parental femenino se juzgará como autopolinización. Semillas de polen extraño muestran un patrón diferente. En la mayoría de los casos se presenta una banda de proteína en un lugar no esperado en el patrón de la variedad. También se presentará semillas con diferentes patrones debido a la contaminación con otra variedad.

Con respecto a diferentes tipos de híbridos, esta asociación describe como son las evaluaciones de estos materiales:

- Híbrido cruza simple: solo un patrón de banda es característico para el híbrido, con bandas heredadas de ambos parentales macho y hembra.
- Híbrido de cruza triple: El parental hembra es una cruza, y contiene bandas de proteína de dos líneas. Así que el híbrido, tiene dos posibilidades de patrones (banda macho más una de las dos bandas hembras) que son características. Sin embargo, la experiencia

demuestra que la mayoría de los híbridos exhiben solo un patrón de banda.

- Híbrido de cruce doble: ambos parentales usados en la producción del híbrido se derivan de cruces simples, por ello pueden presentarse cuatro patrones de bandas diferentes en semillas híbridas.

Proteínas Constituyentes de las Membranas Celulares

Las biomembranas son ensamblados supramoleculares de lípidos, proteínas y carbohidratos. La proporción de estos componentes varía según la fuente de la membrana. Las propiedades dinámicas de las membranas las llevan a cabo las proteínas de membrana. Dichas proteínas son de distintos tipos funcionales, incluyendo las enzimas, las proteínas receptoras y las proteínas de transporte (Boyer, 2000).

Luengo (2001), considera a las proteínas como componentes de la membrana que desempeñan funciones específicas tales como, transporte, soporte y comunicación, añade, que en el caso de los lípidos, las proteínas pueden girar alrededor de su eje y muchas de ellas pueden desplazarse lateralmente (difusión lateral) por la membrana. Las proteínas de membrana las clasifica en:

Proteínas integrales: Están unidas a los lípidos íntimamente, suelen atravesar la bicapa lipídica una o varias veces, por lo que son llamadas proteínas de transmembrana.

Proteínas periféricas: Se localizan a un lado u otro de la bicapa lipídica y están unidas débilmente a las cabezas polares de los lípidos de la membrana u a otras proteínas integrales por enlaces de hidrógeno.

Saenz (2004) por su parte, menciona que las proteínas de membrana pueden ser extrínsecas ó intrínsecas. Las extrínsecas se encuentran enteramente fuera de la membrana, pero unidas a ella por uniones tipo puente hidrógeno, Van der Waals ó iónicas. Las intrínsecas embebidas en la membranas, muchas se extienden desde una cara a la otra de la membrana, conocidas como proteínas de transmembrana. También, se ha considerado que las células constantemente bombean iones hacia fuera o adentro a través de su membrana plasmática. Estas células contienen proteínas que están embebidas en la capa lipídica de sus membranas plasmáticas y se extienden de un lado al otro de las mismas.

Muchas proteínas de transmembrana poseen tres diferentes dominios: dos hidrofílicos y uno hidrofóbico. Un dominio hidrofílico (formado por aminoácidos hidrofílicos) en el extremo N-terminal se proyecta al medio externo. El dominio hidrofóbico en el medio de la cadena peptídica (a menudo solo tiene unos 20 - 30 aminoácidos), está atravesando la membrana plasmática y un dominio

hidrofílico en el extremo C-terminal que constituye al citoplasma. El dominio de transmembrana, en razón de que sus aminoácidos tienen cadenas laterales hidrofóbicas, se encuentran "confortables" en la capa hidrofóbica de la membrana plasmática. Dado que estos dominios transmembranosos "anclan" la proteína a la bicapa lipídica, estas proteínas no flotan libremente y no pueden aislarse sin primero disolver la bicapa lipídica con detergentes.

Muchas proteínas de transmembrana son glicoproteínas, es decir que poseen cadenas de azúcares unidas covalentemente al dominio hidrofílico que se expone al medio externo. Cada una de esas glicoproteínas tienen su dominio extracelular glicosilado (generalmente a nivel del aminoácido asparagina) con residuos azucarados que forman cadenas con ramificaciones complejas. Pueden tener una o mas cadenas glicosídicas. Si bien existen proteínas que tienen un solo dominio transmembranoso, hay algunas que los tienen múltiple. Cuando se estudia la secuencia de aminoácidos se observa que se alternan dominios hidrofílicos con dominios hidrofóbicos alternados.

La cadena proteínica que se embebe enteramente en la membrana, va de un lado al otro de la membrana plasmática. Algunos les vieron forma de serpiente, de allí su nombre (proteínas serpientes). Una estructura que se observa en muchas de estas proteínas comprende siete dominios hidrofóbicos que se insertan en la membrana separados por regiones hidrofílicas que forman "lazos" que constituye alternativamente, tanto en el citoplasma como en el espacio extracelular.

Características de las Biomembranas de la Semilla

Luengo (2001), reconoce con Boyer (2000) que, con los actuales estudios de microscopía electrónica, análisis bioquímicos y la elaboración de modelos de biomembranas tomando como base el modelo propuesto por Singer y Nicholson (1972), quienes lo denominaron “mosaico fluido” y que además ha sido el más aceptado, presenta las siguientes características:

- Considera que la membrana es como un mosaico fluido en el que la bicapa lipídica es la red cementante y las proteínas embebidas en ella, interaccionando unas con otras y con los lípidos. Tanto las proteínas como los lípidos pueden desplazarse lateralmente.
- Los lípidos y las proteínas integrales se hallan dispuestos en mosaico.
- Las membranas son estructuras asimétricas en cuanto a la distribución fundamentalmente de los glúcidos, que sólo se encuentran en la cara externa.

Un aspecto importante dentro de las características de las biomembranas o membranas de la célula, es que actúan como una *barrera que separa dos medios acuosos*, el medio donde vive la célula y el medio interno celular. Las células requieren nutrientes del exterior y deben eliminar sustancias de desecho procedentes del metabolismo y mantener su medio interno estable.

La membrana presenta una permeabilidad selectiva, ya que permite el paso de pequeñas moléculas, siempre que sean lipófilas, pero regula el paso de moléculas no lipófilas. Este mecanismo de permeabilidad dentro de la membrana celular, se determina por un proceso de transporte de moléculas de bajo peso molecular, en el cual existen dos tipos de transporte, el pasivo y el activo, los cuales son descritos por Taiz y Zeiger (1997), y Luengo (2001), como aparecen a continuación:

El transporte pasivo. Es un proceso de difusión de sustancias a través de la membrana. Se produce siempre a favor del gradiente, es decir, de donde hay más hacia el medio donde hay menos. Este transporte se ha definido como difusión simple, la cual es el paso de pequeñas moléculas a favor del gradiente. Esta difusión se realiza de las formas siguientes:

Difusión simple a través de la bicapa. Mediante sustancias no polares como el oxígeno y el nitrógeno atmosférico. Algunas moléculas polares de muy pequeño tamaño, como el agua, CO₂, etanol y glicerina, también atraviesan la membrana por difusión simple. La difusión del agua recibe el nombre de ósmosis.

Difusión simple a través de canales. Se realiza mediante las denominadas proteínas de canal. Así entran iones como el Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺, Cl⁻. Las proteínas de canal son proteínas con un orificio o canal interno, cuya apertura está regulada por una ligación como ocurre con neurotransmisores u hormonas, que

se unen a una determinada región, el receptor de la proteína de canal, quien sufre una transformación estructural que induce la apertura del canal.

Difusión facilitada. Permite el transporte de pequeñas moléculas polares, como los aminoácidos, monosacáridos, etc, que al no poder atravesar la bicapa lipídica, requieren de proteínas transmembranosas que faciliten su paso.

Estas proteínas reciben el nombre de proteínas transportadoras o permeasas, que al unirse éstas a la molécula a transportar sufren un cambio en su estructura que arrastra a dicha molécula hacia el interior de la célula.

El transporte activo. En este proceso también actúan proteínas de membrana, pero éstas requieren energía en forma de ATP (Adenosin trifosfato), para transportar las moléculas al otro lado de la membrana. Se produce cuando el transporte se realiza en contra del gradiente electroquímico. Son ejemplos de transporte activo la bomba de Na/K, y la bomba de Ca. La bomba de Na⁺/K⁺ requiere una proteína transmembranosa que bombea Na⁺ hacia el exterior de la membrana y K⁺ hacia el interior. Esta proteína actúa contra el gradiente gracias a su actividad como la ATP-asa, ya que rompe el ATP para obtener la energía necesaria para el transporte.

Además de la permeabilidad selectiva, existe una alta permeabilidad al agua, que ahora se sabe es causada por la proteína AQP1, llamado aquaporin. Las cuales forman un canal que permite libremente el movimiento del agua a

través de la membrana de la célula, pero no se unen a otras moléculas pequeñas, sin carga o solutos con carga. Las aquaglicerosporinas tienen funcionamientos múltiples en procesos fisiológicos y son unidas por el agua, el glicerol y algunos otros solutos. Se han encontrado en especie anfibias, insectos y plantas (Borgnia *et al.*, 2002).

Suga *et al.*, (2002), encontraron que el aquaporin en el plasma y las membranas, estas desempeñan un papel dominante en el transporte intercelular e intracelular del agua en plantas, mostrando que los aquaporin de proteínas presentes en la membranas son las responsables de la absorción de agua y solutos (sal) en la raíz de una plántula de rábano.

Con respecto a la permeabilidad de las membranas, Zhu *et al.*,(2001), hacen mención de que aplicando una fuerza constante a las moléculas de agua a granel y una fuerza contraria en el sistema complementario, una diferencia hidrostática de la presión través de la membrana se puede establecer, produciendo un flujo direccional neto del agua. La permeabilidad hidráulica u osmótica se puede determinar por el cociente del flujo de agua y la diferencia de la presión.

La formación espontánea de la bicapa de fosfolípidos es la base de función de la barrera de la permeabilidad de la membrana biológica. Los defectos que exponen el agua a las cadenas del acil son curados espontáneamente por la difusión del lateral lípidico. Sin embargo, las barreras

mecánicas, por ejemplo agregados de la proteína formados en un lugar, podrían sostener defectos hidrofóbicos. Tales defectos se han postulado para ocurrir en procesos tales como fusión de la membrana (Tieleman y Bentz, 2002).

Se ha discutido, que la evidencia de los caminos, con excepción de la bicapa lipídica son o existen para el transporte a través de las membranas de la célula de pequeños unielectrolitos hidrofílicos específicos. Lo cual es importante cuando se trata de describir el canal con modelos matemáticos básicos para entender la permeabilidad de las membranas y el transporte de moléculas a través de estas. Las proteínas recientemente descubiertas facilitan el transporte de las moléculas, del agua, y de la urea lipo-soluble con actividades fisiológicas importantes (Goodman, 2002).

De la Fuente *et al.*, (2002), describen que en las células vivas, existe una estructura jerárquica del control que conecta los transportes metabólicos con la señal-transducción y la gene-expresión. Por tanto, las actividades enzimáticas no son generalmente constantes, ya que se mencionaba en los análisis tradicionales del control y regulación de concentraciones y flujos de estado estacionario, que las actividades enzimáticas eran constantes.

MATERIALES Y METODOS

Ubicación del Área de Estudio

En la presente investigación, se llevó a cabo en los Laboratorios de Ensayos de Semillas del Centro de Capacitación y Desarrollo de Tecnología de Semillas, y el de Apoyo a la Investigación del Departamento de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, ubicada en Saltillo, Coahuila, México.

Material Genético

El material genético incluyó nueve genotipos de maíz (*Zea Mays* L.) proporcionados por la Empresa semillera Monsanto, S.A. de C.V. donde uno de ellos se considero como el testigo; que por motivos de confidencialidad no se proporcionaron sus nombres comerciales y solo se denominan como genotipos (Cuadro 3.1).

Estos genotipos se cosecharon durante el ciclo Primavera-Verano del 2003.

Cuadro 3.1 Relación de genotipos utilizados en el estudio.

GENOTIPO	EMPRESA
G1	Monsanto
G2	Monsanto (Testigo)
G3	Monsanto
G4	Monsanto
G9	Monsanto
G10	Monsanto
G11	Monsanto
G12	Monsanto
G13	Monsanto

Parámetros a Evaluar

Tasa de imbibición (TI)

Se colocaron cuatro repeticiones de 100 semillas de cada genotipo, se tomó el peso inicial de la semilla; y se agregaron 100 ml de agua por vaso. Se dejó reposar por cuatro horas; posteriormente, se midió la cantidad final de agua absorbida durante este tiempo, de la siguiente forma: se sacudió la semilla hasta tratar de quitar el exceso de agua adherida con ayuda de un cedazo. En seguida se seco la semilla con papel secante, hasta tratar de quitar

el posible exceso de agua, y se determinó el peso final de la semilla, por diferencia se obtuvo la cantidad absorbida.

Después se añadieron nuevamente 100 ml de agua limpia repitiendo el proceso cada cuatro horas, hasta observar una germinación fisiológica del 50 por ciento más uno en cada vaso, tomando la anotación del tiempo final en cada repetición, el peso se expresó en gramos por 100 semillas. Para obtener la cantidad de agua absorbida en tiempo al peso de cada lectura se le restó al peso final (Alcocer, 2000). Adicional a la prueba de imbibición, se evaluaron los parámetros de capacidad de germinación, longitud media de plántula y peso seco de plántula de los genotipos en tres tiempos de imbibición 24, 32 y 48 horas.

Capacidad de Germinación (CG)

Se sembraron cuatro repeticiones de 25 semillas por genotipo, entre dos toallas húmedas de papel marca Anchor para germinación de acuerdo a las reglas de la ISTA (1996). Las toallas, se enrollaron e identificaron con fecha, número de híbrido y repetición, sujetando las orillas del papel enrollado "tacos" con ligas y se guardaron en bolsas de polietileno, colocándolas finalmente en canastas dentro de una cámara germinadora a 25 °C constante, con 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad.

A los seis días después, se evaluaron las plántulas normales, plántulas anormales y semillas sin germinar o muertas conforme al manual de evaluación (ISTA, 1992).

Vigor

Envejecimiento Acelerado (EA)

Se utilizó el método de AOSA (1983) en donde se colocaron 200 semillas por genotipo, en recipientes conteniendo 100 ml de agua (cámara interna) y previamente acondicionadas con la tela metálica para el soporte de la semilla. Posteriormente se taparon con un plástico y asegurado éste con una liga. Los recipientes se colocaron dentro de la cámara por un tiempo de exposición de 96 horas a 42°C. Al finalizar el período de envejecimiento se sacaron las semillas y se sembraron en un ensayo de germinación estándar en cuatro repeticiones de 50 semillas.

Longitud Media de Plúmula (LMP)

Se sembraron 25 semillas en cuatro repeticiones por genotipo. Se preparó previamente el papel de marca Anchor con cinco líneas paralelas de 2 cm, estas son marcadas en el eje de 30 cm del papel y a partir de la parte media hacia arriba (Perry 1977).

En la línea central del papel marcado se colocó una cinta adhesiva, en la cual se pegaron las semillas a un centímetro de separación quedando en su parte media sobre la línea central y orientadas para su crecimiento. Una toalla es puesta sobre las semillas y una toalla adicional bajo el papel que las sostiene y juntas las 3 son sumergidas en agua hasta su absorción total permitiendo drenar el exceso. Las toallas se enrollaron a un diámetro de 4 cm, colocando los tacos en posición vertical en la cámara a 20 ± 1 °C sin luz. Durante el tiempo que dura la prueba se verifica que no le faltara humedad. El periodo de incubación fue de 7 días, asegurando que las plántulas de semillas vigorosas alcanzaron 10 cm de longitud. Al final del ensayo se cuenta el número de plúmulas que están situadas en cada paralela. A las líneas se les da un valor de 1, 3, 5, 7, 9, 11 y 13 cm, siendo el valor del punto medio de cada paralela a la línea central. El número de plúmulas que queda en cada línea se multiplica por la correspondiente distancia y se suma, dividiendo la longitud total entre el número de semillas (25), como sigue:

$$L = \frac{(nx_1 + nx_3 + \dots + nx_{13})}{25}$$

25

Donde:

L = Longitud media de plúmula en cm.

n = Número de plúmulas entre dos paralelas.

x = Distancia del punto medio de paralelas a línea central.

Las plántulas clasificadas como anormales se excluyen del conteo.

Peso Seco de Plántula (PSP)

Se utilizaron cuatro repeticiones de 25 semillas por genotipo; las semillas se colocaron en dos hojas de papel anchor, debidamente orientadas en dos hileras a 6.5 y 13.4 cm de la orilla superior, cubriendo con una toalla igualmente humedecida, enrollando a un diámetro de 6 cm con orificio de 1 cm. Se colocaron los rollos o “tacos” en bolsas de polietileno de 35X60 cm aproximadamente, colocando las bolsas en canastas para el desarrollo de plántulas a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 7 días.

Al finalizar este período, se evaluaron las plántulas, descartando las plántulas anormales y las semillas sin germinar o muertas; a las plántulas normales se les cortó con una navaja la semilla y el mesocotilo, dejando la plúmula o vástago y raíz para el peso seco, colocándolas en bolsas de papel, se secaron en un horno por 24 horas a 65°C . Posteriormente, se enfriaron y se pesaron las bolsas en una balanza analítica con una precisión de diez milésimas de gramo.

Los resultados se obtuvieron en mg/plántula, donde, el peso seco total expresado en miligramos de las plántulas normales se dividió entre el número de plántulas normales (AOSA,1983).

Sanidad (S)

Siembra en Placas de Agar

Se lavó la semilla con tween 20, para quitar el tratamiento químico ya que algunos presentaban tratamiento. Enseguida se efectuó la desinfección de la semilla, colocando de 40 a 50 semillas en un frasco con tapa, agregando hipoclorito de sodio al 2 por ciento, agitando fuertemente por 90 segundos, se quitó el excedente del hipoclorito, colando la semilla y dejando secarla en toallas (“sanitas”) estériles. Luego se sembró utilizando pinzas bajo condiciones de asepsia y esterilidad (haciendo uso de la campana de flujo laminar y lámpara de alcohol), cuatro repeticiones de 10 semillas por genotipo, en cajas petri con agar PDA (agar papa dextrosa) y cuatro repeticiones en cajas petri con MSA (Agar, malta y sal); las semillas se colocaron con el embrión hacia arriba y en forma equidistante en cada caja. Se incubaron por siete días a 27°C, haciendo una evaluación a los cuatro y siete días. Posteriormente, se cuantificaron los patógenos presentes en cada caja, registrado el por ciento de infección de cada genotipo. Para su mejor identificación, se aislaron los patógenos en medio de cultivo de harina de maíz Agar, a 28°C por siete días hasta obtener una purificación monoconidial o cepa pura (Neergaard,1977; Booth, 1971).

Composición Química de la Semilla

Preparación de las Muestras

Para la determinación de proteínas se utilizó la semilla entera, así como el endospermo y embrión triturados y molidos. Colocando cada una de las porciones en frascos con tapa identificados para cada genotipo.

Para su efecto, las semillas de algunos genotipos que se encontraban con tratamiento químico se lavaron con tween 20 y enjuagaron con agua, y dejando secar sobre papel estroza por espacio de 16 horas.

Semilla entera. Se trituraron con ayuda de un mortero de porcelana, se sometió a un molino marca Willey ocupando una malla del No. 20, obteniendo de esta manera las muestras en harina.

Embrión y endospermo. Las semillas se remojaron por espacio de 3.5 horas, al termino, se prosiguió a quitar el pericarpio a cada una de las semillas utilizando un bisturí; para separar el embrión del endospermo, se cortó con cuidado la semilla en forma longitudinal con el filo del bisturí, se separó el embrión, recolectando de inmediato por un lado el endospermo y por otro el embrión en dos morteros de porcelana para su respectiva trituración y molienda.

Aislamiento de Proteínas por Solubilidad

Aislamiento de albúmina. Se pesaron 5 g de semilla entera y de embrión, y 10 g de endospermo de cada genotipo; las muestras se colocaron en vasos de precipitado. Se agregaron 25 y 50 ml de agua a 4°C respectivamente, se agitó por 15 minutos y se guardó en refrigeración por 4 horas. Después se separó el sobrenadante en un matraz de aforación de 100 ml y se lavó el residuo con 12.5 y 25 ml de agua a 4°C; se agitó por 5 minutos, se centrifugó por 10 minutos a 4000 rpm. Se juntó el sobrenadante con el anterior, y se aforó a 100 ml con agua destilada (Sato *et al.*, 1986; Parra, 1990). Se procedió a cuantificar el contenido de proteína por el método de Lowry.

Aislamiento de globulina. Al residuo del punto anterior, se les agregaron 25 y 50 ml respectivamente de cloruro de sodio al 5 por ciento a 4°C, se agitó por 15 minutos y se guardó en refrigeración por 1 hora. Después se separó el sobrenadante en un matraz de aforación de 100 ml y se lavó el residuo con 12.5 y 25 ml de cloruro de sodio al 5 por ciento a 4°C; se agitó por 5 minutos, se centrifugó por 10 minutos a 4000 rpm. Se juntó el sobrenadante con el anterior, y se aforó a 100 ml con cloruro de sodio al 5 por ciento (Sato *et al.*, 1986; Ortiz, 1992; Parra y Ortiz, 1993). Se procedió a cuantificar el contenido de proteína por el método de Lowry.

Aislamiento de zeína. Al residuo, se le agregó 25 y 50 ml respectivamente de etanol al 70 por ciento a 4°C, se agitó por 15 minutos y se guardó en

refrigeración por 4 horas. Después se separó el sobrenadante en un matraz de aforación de 100 ml y se lavó el residuo con 12.5 y 25 ml de etanol al 70 por ciento a 4°C; se agitó por 5 minutos, se centrifugó por 10 minutos a 4000 rpm. Se juntó el sobrenadante con el anterior, y se aforó a 100 ml con etanol al 70 por ciento (Hojilla-Evangelista *et al.*, 2003). Se procedió a cuantificar el contenido de proteína por el método de Lowry.

Aislamiento de glutelina. Al residuo, se les agregaron 25 y 50 ml respectivamente de hidróxido de sodio al 0.2 por ciento a 4°C, se agitó por 15 minutos y se guardó en refrigeración por 1 hora. Después se separó el sobrenadante en un matraz de aforación de 100 ml y se lavó el residuo con 12.5 y 25 ml de hidróxido de sodio al 0.2 por ciento a 4°C; se agitó por 5 minutos, se centrifugó por 10 minutos a 4000 rpm. Se juntó el sobrenadante con el anterior, y se aforó a 100 ml con hidróxido de sodio al 0.2 por ciento (Larsen, 1967). Se procedió a cuantificar el contenido de proteína por el método de Lowry.

Cuantificación de Proteínas por el Método de Lowry

Se realizó una curva estándar de seroalbúmina, preparando una serie de tubos conteniendo lo siguiente:

Cuadro 3.2 Volúmenes utilizados para la curva estándar de seroalbúmina.

Tubo No.	Solución de proteína (ml)	Reactivo A (ml)	Reactivo C (ml)
1	0.0	0.5	4.0
2	0.1	0.4	4.0
3	0.2	0.3	4.0
4	0.3	0.2	4.0
5	0.4	0.1	4.0
6	0.5	0.0	4.0

Para ello se prepararon los reactivos siguientes:

Reactivo A. Na_2CO_3 en NaOH 0.1M.

Reactivo B. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0.5 por ciento en tartrato de sodio y potasio al 1 por ciento.

Reactivo C. 50 volúmenes de reactivo A más 1 volumen de reactivo B.

Reactivo D. Se disolvió 100 g de tungstato de sodio ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 25 g de molibdato de sodio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 700 ml de agua destilada, 50 ml de ácido fosfórico al 85 por ciento y 100 ml de HCl, se reflujo por 10 horas; se añadieron 150 g de sulfato de litio, 50 ml de agua destilada y unas gotas de bromo. Se prosiguió a hervir por 15 minutos, enfriando, aforando a un litro y finalmente se filtró (Lowry *et al.*, 1951)

Solución patrón de proteína. Se disolvió seroalbúmina (1 mg/ml) en reactivo A. Se mezcló el contenido de cada tubo, y se dejó reposar por 10 minutos. Se agregó a continuación tubo por tubo 0.5 ml de reactivo D, agitando de

inmediato; dejando reposar por 30 minutos y se leyó su absorbancia a 600 nm utilizando el tubo No. 1 como blanco. Para la determinación de cada uno de los genotipos y sus diferentes partes, se procedió a desarrollar la técnica de Lowry en las condiciones que se indican para el tubo 4; con tres repeticiones de cada muestra.

Cuantificación de Proteína Total por el Método Macrokjeldahl

El método incluyó dos procesos; el de digestión y destilación. El primer proceso se realizó en un digestor Kjeldahl con 1.5 g de muestra, una cuchara de mezcla catalítica y 25 ml de H₂SO₄ concentrado, se agregaron unas perlas de vidrio y se colocó el matríz en un aparato digestor Kjeldahl, la digestión termina cuando el líquido estuvo claro. Al estar fría la solución se agregaron 250 ml de agua destilada.

El segundo proceso se llevó a cabo en un matraz erlenmeyer de 500 ml y se agregó 50 ml de H₃BO₃ al 4 por ciento y de 3-5 gotas de colorante mixto; luego se colocó en la parte baja del condensador, introduciendo los tubos en el matraz para recibir el destilado y coleccionar 300 ml de volumen. Al matraz kjeldahl se le agregó 100 ml de NaOH al 45 por ciento y unos gránulos de Zinc (catalizador), y se conectó al destilador rápidamente. Se procedió a calentar la mezcla hasta obtener el volumen deseado. Se tituló el amonio recogido con H₂SO₄ estandarizado (0.1N), hasta desaparecer el color verde, y con la

siguiente fórmula se determina el porcentaje de Nitrógeno presente en el grano de maíz.

$$\% \text{ de Nitrógeno} = \frac{[(V \text{ de ácido}) (N \text{ ac.}) - (V \text{ bco.}) (N \text{ bco.})] \times 0.014^* \times 100}{\text{g de muestra}}$$

$$\% \text{ de Proteína} = \% \text{ de Nitrógeno} \times 5.83^{**}$$

V de ácido = Mililitros gastados de H₂SO₄

N ac = Normalidad del ácido

V bco = Mililitros gastados de H₂SO₄ para el blanco

N bco = Normalidad del blanco

g de muestra = Gramos de muestra

*Son los meq/g de Nitrógeno

5.83** = Factor de conversión a proteína de éste cereal.

Separación de Proteínas por Electroforesis Vertical

Se colocaron en tubos de eppendorf 30 µl de muestra de cada extracto (albúmina, globulina, zeína y glutelina) de la semilla entera, endospermo y embrión de cada genotipo; se adicionó 60 µl de solución buffer de muestra (que contenía el dodecil sulfato de sodio y mercaptoetanol). Luego de mezclarse se aplicaron de 10 a 15 µl de muestra en cada pozo del gel.

Preparación del Gel

Se colocaron los vidrios, uno sobre otro, separándolos con dos tiras de polietileno de 1 mm en cada extremo, en donde se depositó el gel, el cual se preparó de la siguiente forma:

Cuadro 3.3 Soluciones para la preparación del gel concentrador y de corrida en la prueba de electroforesis vertical.

Gel concentrador 6.8%		Gel de corrida 4.8%	
Buffer 4x pH=8.8	4.27 ml	Buffer 4x pH=6.8	2.03 ml
Archilamida- bisacrilamida 30%	2.5 ml	Acrilamida- bisacrilamida 30%	1 ml
TEMED 8.4%	50 µl	TEMED 8.4%	20 µl
Persulfato de amonio 10%	100 µl	Persulfato de amonio 10%	40 µl

Una vez vaciado el gel de corrida y concentrador se insertó un peine, se dejó reposar.

Una vez polimerizado el gel, se depositaron los vidrios con el gel en otro soporte donde este lleva los puntales de corriente para que se llevó a cabo el desplazamiento de las proteínas por el gel dentro de la cámara de electroforesis; se quitó el peine y se depositaron dentro de cada pozo 15 µl de cada genotipo a una concentración de 0.1 µl/ml, posteriormente se agregó el buffer de corrida 10x, (SDS, tris-OH, glicina y agua destilada). Se colocó la tapa de corriente y se conectó a la fuente de poder a 150 Voltios. Una vez corridas las muestras se tiñó el gel con una solución de azul de coomasie al 0.3 por

ciento, por un espacio de 25 minutos, y se procedió a desteñir con una solución de ácido acético glacial, etanol y agua destilada, en una proporción de 5:4:1 respectivamente. Las bandas obtenidas en cada fracción se compararon con el testigo.

Evaluación en Campo

Se realizó una evaluación en campo de los cuatro genotipos más importantes de la compañía, incluyendo el genotipo 2 (testigo), con la finalidad de corroborar los comportamientos que se presentaron en la justificación, en las dos formas de siembra; en seco y húmedo; describiendo a continuación su ubicación:

Las evaluaciones de campo de los genotipos 1, 2, 3 y 4 se realizaron en el Municipio de La Barca, Jalisco; en tres localidades, Salamea, San Antonio y Santa Lucia. Los municipios están ubicados al oriente del Estado. Sus coordenadas extremas son de los 20°15' 30" a los 20°26'45" de la latitud norte y de los 102°20'40" a los 102°21' 20" de longitud oeste, a una altura de 1,530 metros sobre el nivel del mar. Limitando al norte con Ocotlán, Atotonilco el Alto y Ayotlán, al sur con el Estado de Michoacán; al este con Ayotlán y al oeste con Jamay y Ocotlán. Presentando una temperatura promedio anual de 19.7°C, temperaturas en los meses de Mayo y Junio de 22°C, con una precipitación media pluvial anual de 863 mm.

Emergencia en Campo (EC)

Se sembró en suelo tipo arcilloso, con alto contenido de materia orgánica y sales. Se realizó una siembra en seco, dando un riego a los 5 días, y evaluando la emergencia de la plántula (primer conteo) a los 4 días después del riego y el segundo conteo a los 10 días después. Los surcos fueron destinados para cada genotipo al azar, con cuatro repeticiones, utilizando 14.5 m por cada genotipo.

Diseño Experimental

Para las variables evaluadas en laboratorio se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones, excepto para el por ciento de proteína total en semilla entera, endospermo y embrión, en donde solo se realizaron dos repeticiones.

Análisis Estadístico

Todos los análisis de varianza se realizaron mediante el paquete estadístico SAS versión 6.0 (1989), con el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ij} = \mu + S_i + \epsilon_{ij}$$

Y_{ij} = Valor observado.

μ = Efecto de la media general.

S_i = Efecto del i ésimo genotipo.

C_{ij} = Error experimental.

Comparación de Medias

Se utilizó la prueba de rango múltiple de la diferencia mínima significativa (DMS), la cual según Steel y Torrie (1980), se calcula mediante:

$$DMS = (t_{\alpha/2, g.l.EE}) (\sqrt{2CMEE/r})$$

donde: CMEE = Cuadrado medio del error.

r = Número de observaciones usadas para calcular un valor medio.

α = Nivel de significancia.

g.l.EE = Grados de libertad del error experimental.

t = Valor tabular que se usa en la prueba, con los grados de libertad del error y el nivel de significancia apropiado.

Adicionalmente se realizaron análisis de regresión con el fin de conocer la dinámica de la tasa de imbibición con respecto al tiempo, explorando los modelos siguientes:

Lineal $y_i = B_0 + B_1 x_i + e_i$

Cuadrática $y_i = B_0 + B_1 x_i + B_2 x_i^2 + e_i$

Cúbica $y_i = B_0 + B_1 x_i + B_2 x_i^2 + B_3 x_i^3 + e_i$

Donde: y_i = Variable dependiente

X_i = Variable independiente.

B_0 = Intercepto.

B_1 , B_2 y B_3 = Coeficiente de regresión asociados a la respuesta evaluada.

Dependiendo de su coeficiente de determinación (R^2), se obtuvo el modelo que mayor ajuste proporcionó, para explicar la casualidad entre las variables.

Análisis de Componentes Principales

Para la información conjunta de cada variable se realizó adicionalmente un análisis de componentes principales (ACP) utilizando el programa Statistica versión 4.5 (1994), con el fin de reducir la dimensionalidad de los datos y establecer las relaciones entre las variables y agrupar genotipos semejantes. El ACP consiste en reducir una gran número de variables originales a unas cuantas variables transformadas (Manly, 1986; Johnson y Wichern, 1988). Se inicia con la concentración de los datos en una tabla de doble entrada, donde los renglones corresponden a los n genotipos en estudio y las columnas corresponden a los p parámetros o variables medidas a cada uno de los n genotipos. Un primer componente principal es entonces la combinación lineal de variables $X_1, X_2, X_3, \dots, X_p$, de la siguiente forma:

$$Z_i = a_{11} X_1 + a_{12} X_2 + a_{13} X_3 + \dots + a_{1p} X_p$$

Donde: a_{ij} = Coeficiente o “carga” de la j -ésima variable del i -ésimo genotipo. Y están sujetas a la condición de:

$$\sum a_{ij}^2 = 1$$

Así, la varianza de Z_i es lo más grande dada la condición sobre las constantes a_{ij} . La condición sobre las constantes es impuesta para que la varianza de Z_i no sea aumentada solamente por elevar el valor de alguno de los a_{ij} . El segundo componente principal:

$$Z_i = a_{i1} X_1 + a_{i2} X_2 + a_{i3} X_3 + \dots + a_{ip} X_p$$

es tal que la varianza de Z_{ij} sea lo más grande posible sujeta a la condición de:

$$\sum a_{ij}^2 = 1$$

debe, además cumplir la condición de que Z_i y Z_j , $i \neq j$, no estén correlacionados.

Los demás componentes principales son definidos continuando de la misma manera. Si se tienen p variables, es posible definir hasta p componentes principales; sin embargo, lo más deseable es retener 2 o 3, tratando de explicar alrededor de un 70 a 75 por ciento de la variación total. Para realizar este análisis se utilizó álgebra de matrices, representado por $Y = Ax$, donde x es el vector de las variables evaluadas y A es la matriz de coeficientes o cargas que deben estimarse.

Una segunda opción que se utilizó en este estudio, es usar una matriz de varianza-covarianza (S) y el ACP sólo involucra encontrar los eigenvalores (valor propio o raíz característica, componente principal, factor, λ_i) de dicha matriz correspondiente a los t vectores característicos (a_{ij}), de tal manera que los λ_i se obtienen mediante $a_{ij}' S a_{ij} = \lambda_i$. Donde $\lambda_i = \text{Var}(Z_i)$, es decir, la varianza de los componentes principales son los eigenvalores de la matriz S y

las constantes a_{ij} son los elementos de los eigenvectores correspondientes. De tal forma que los valores negativos de los eigenvalores no son posibles y dado que en la diagonal de la matriz aparecen varianzas de los datos originales y que la varianza de λ_i es la varianza de Z_i , esto significa que la suma de varianzas de los componentes principales es igual a la suma de las varianzas de las variables originales.

Con el fin de evitar la influencia de las unidades de medida de las variables originales, se estandarizaron para que mostraran media cero y varianza de unidad, de tal manera que la matriz S , tiene unos en la diagonal y correlaciones entre las variables fuera de la diagonal y en este caso, la suma de los términos de la diagonal (suma de eigenvalores), será igual a p , el número de variables (Manly, 1986).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tasa de Imbibición (TI)

En la Figura 4.1 se presenta el comportamiento de los genotipos para esta variable y se aprecia que el G1, G2 (testigo) y G3 tienen un comportamiento parecido en las primeras 4 horas, donde se obtuvieron valores altos en la tasa de imbibición; mientras que el G12 presentó el menor valor en la tasa a este tiempo. A las 8 horas, el G2 mostró la tasa más alta, seguido del G9, en tanto el G4 presentó el menor valor de absorción en la tasa.

A las 12 horas de imbibición, los genotipos G2 y G3 mostraron una mayor absorción de agua, mientras que el G4 presentó la menor absorción; a las 16 horas, el G2 continuó apareciendo como el de mayor valor de absorción al igual que el G9, en cambio el G3 disminuyó su tasa, y el G1 presentó un ligero descenso; a las 20 horas, los genotipos G2 y G3 mostraron un drástico descenso en su comportamiento, en cambio G1, G4, G9, G10, G11, G12 y G13 presentaron ligeros descensos y aumentos en sus tasas. Un comportamiento similar presentaron G2 y G3 a las 24 horas, donde resultaron valores altos en su tasa, y el G9 presentó un bajo valor; para las 28 horas, la respuesta de absorción por parte de G1, G2, G3 y G4 fueron de

menor absorción en comparación a G9, G10, G11, G12 y G13, quienes aumentaron ligeramente en su tasa; a las 32 horas, el G2 aumentó más su valor de absorción que todos los demás genotipos, y el G10 fue el que menor absorción tuvo. En las siguientes 8 horas (36 y 40 horas), el G2 obtuvo el mayor valor en su tasa, mientras que los demás siguieron absorbiendo en poca cantidad, siendo el G11 quien menor cantidad absorbió.

Para las 44 horas, los genotipos G4, G5 y G13 aumentaron su tasa, a diferencia del G2 quien disminuyó hasta cero, al igual que los genotipos G10, G11 y G12. Al terminó de las 48 horas de imbibición, el G3 y el G9 siguieron absorbiendo agua, mientras que los genotipos G1, G2, G4, G10, G11 y G12 ya no lo hicieron; indicando que la velocidad de imbibición de la semilla, depende de la composición química de las cubiertas de cada uno de los genotipos (Popinigis,1985), o bien de la permeabilidad de sus cubiertas (Bidwell, 1979).

Las tendencias de la tasa de imbibición se ajustaron mediante una regresión lineal, probándose varios modelos, resultando el más adecuado el nivel cúbico (Cuadro 4.1) con coeficientes de determinación que varían desde 0.78 al 0.98, dichas ecuaciones de predicción demuestran que los genotipos G1, G2, G3 y G4 presentaron la tasa de imbibición más alta que el resto de los genotipos, atendiendo a sus interceptos y coeficientes de regresión.

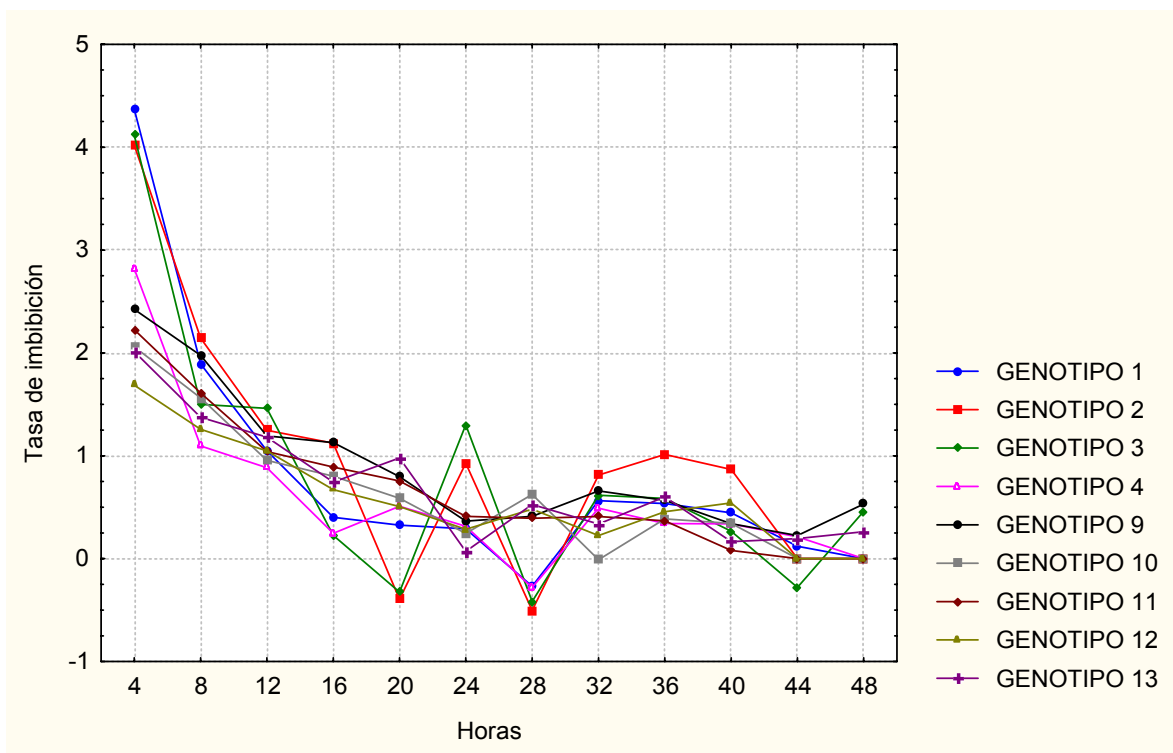


Figura 4.1 Tasa de imbibición de los genotipos evaluados a intervalos de 4 horas.

Cuadro 4.1 Ecuación de predicción para la tasa de imbibición y coeficientes de determinación.

Genotipo	Ecuación de predicción	R ²
G1	$6.53514 - 2.82451x + 0.39104x^2 - 0.01686x^3$	0.96
G2	$6.29334 - 2.67374x + 0.37765x^2 - 0.01663x^3$	0.85
G3	$5.80325 - 2.40182x + 0.3232x^2 - 0.01362x^3$	0.78
G4	$4.04197 - 1.68215x + 0.23105x^2 - 0.00994x^3$	0.90
G9	$3.24536 - 0.86502x + 0.08793x^2 - 0.00296x^3$	0.95
G10	$2.84949 - 0.86438x + 0.10078x^2 - 0.00406x^3$	0.94
G11	$2.92264 - 0.82684x + 0.09271x^2 - 0.00372x^3$	0.98
G12	$2.4045 - 0.74949x + 0.09529x^2 - 0.00414x^3$	0.93
G13	$2.58984 - 0.68722x + 0.07233x^2 - 0.00264x^3$	0.88

Capacidad de Germinación (CG)

En el análisis de varianza para las cero horas de imbibición, mostró que entre los genotipos hubo diferencias ($P < 0.01$), donde los genotipos G2 (testigo), G4, G9, G10, G11, G12 y G13 mostraron valores altos de germinación, mientras que el G3 mostró la menor capacidad de germinación inicial (Cuadro 4.2), aclarando que sigue siendo favorable la germinación pero no la ideal, ya que para ser semilla de alta calidad, según las Normas de Certificación publicadas por el SNICS (1980), la germinación debe ser mínima del 85 por ciento, pero en la política de la Empresa Monsanto, la mínima es de 90 por ciento.

Cuadro 4.2 Cuadrados medios y significancia, resultado de la comparación de medias para las variables evaluadas en la prueba de capacidad de germinación a cero horas de imbibición.

F.V.	G.L	PN (%)	PA (%)	SSM (%)
Genotipo	8	53.111**	41.444**	5.000**
Error	27	13.629	14.518	1.481
Comparación de medias	G1	91.0 bc	8.0 a	1.0 bc
	G2	99.0 a	1.0 b	0.0 c
	G3	90.0 c	8.0 a	2.0 ab
	G4	100 a	0.0 b	0.0 c
	G9	98.0 a	2.0 b	0.0 c
	G10	97.0 a	3.0 ab	0.0 c
	G11	97.0 a	0.0 b	3.0 a
	G12	100 a	0.0 b	0.0 c
	G13	96.0 a	4.0 ab	0.0 c
Valor DMS		5.36	5.53	1.77

Medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes (DMS 0.05%).

** = Altamente significativo al 1% de probabilidad; PN = Plántulas normales (capacidad de germinación); PA = Plántulas anormales; SSM = Semillas sin germinar (muerta, fresca o latente).

En el Cuadro anterior se observó que en las plantas anormales se marcó una alta significancia entre los genotipos, de tal forma que los que presentaron menor número de plantas anormales fueron el G2 (testigo), G4, G9, G11 y G12, reafirmando su alta calidad, mientras que el G1 y el G3, seguidos por el G10, mostraron mayores valores de plantas anormales, confirmando ser los de menor capacidad germinativa.

En cuanto a semillas sin germinar, también se marcó una alta significancia entre los genotipos, obteniendo mayor valor de semillas muertas el G11, seguido por el G3, y el G1, por lo que se confirma su baja capacidad de germinación. En cambio, los genotipos G2 (testigo), G4, G9, G10, G12 y G13 resultaron mejores por no presentar semillas muertas o sin germinar.

Después de 24 horas de imbibición, se determinó la capacidad de germinación de los genotipos, resultando ser altamente significantes entre ellos (Cuadro 4.3); y al realizar la comparación de medias, se obtuvo que el G12 presentó el mayor valor de germinación, seguido por los genotipos G2 (testigo), G4, G10, G11 y G13; en tanto que G3 mostró el valor más bajo de germinación, con 66 por ciento.

En cuanto a plantas anormales, se observa en el Cuadro antes mencionado, la alta significancia entre los genotipos, resultando el G2 (testigo) y G12 los mejores por no presentar plántulas anormales, seguidos por G4, G9, G10, G11 y G13, los cuales presentaron baja proporción, mientras que el G1

presentó mayor valor de plántulas anormales, seguido por G3, por lo que se consideran como los peores genotipos.

En lo que respecta a las semillas sin germinar, se presentó una alta significancia entre los genotipos (Cuadro 4.3), mostrando en la comparación de medias que los genotipos G2 (testigo), G4, G9, G10, G11, G12 y G13, presentaron bajos valores de semillas muertas o sin germinar, lo cual los hace ser mejores genotipos que el G3, quien obtuvo un 29 por ciento, seguido por G1 con 18 por ciento.

Cuadro 4.3 Cuadrados medios y significancia, resultado de la comparación de medias para las variables evaluadas en la prueba de capacidad de germinación a 24 horas de imbibición.

F.V.	G.L	PN (%)	PA (%)	SSM (%)
Genotipo	8	587.00**	15.44**	415.11**
Error	27	16.148	5.481	17.185
Comparación de medias	G1	76.0 c	6.0 a	18.0 b
	G2	99.0 ab	0.0 c	1.0 c
	G3	66.0 d	4.0 ab	29.0 a
	G4	96.0 ab	1.0 bc	3.0 c
	G9	94.0 b	2.0 bc	5.0 c
	G10	98.0 ab	2.0 bc	0.0 c
	G11	97.0 ab	1.0 bc	2.0 c
	G12	100 a	0.0 c	0.0 c
	G13	99.0 ab	1.0 bc	0.0 c
Valor DMS		5.83	3.40	6.01

Medias sugeridas por la misma letra no son significativamente diferentes (DMS 0.05%)

** = Altamente significativo al 1% de probabilidad.

PN = Porcentaje de plántulas normales capacidad de germinación.

PA = Porcentaje de plántulas anormales.

SSM = Porcentaje de semillas sin germinar (muerta, fresca o latente).

En lo referente a la capacidad de germinación, después de imbibir la semilla en agua por 32 horas (Cuadro 4.4), el ANVA mostró alta significancia entre genotipos; resultando que los genotipos G2 (testigo), G4, G9, G10, G11, G12 y G13, se comportaron estadísticamente iguales, con altos valores de germinación, mientras que el G3 mostró un valor muy bajo (45 por ciento), disminuyendo su capacidad de germinación a un 50 por ciento de su germinación inicial (0 horas de imbibición), seguido del G1, quien obtuvo un 77 por ciento en esta variable.

En plántulas anormales no hubo significancia entre los genotipos, sin embargo, G3 obtuvo el mayor valor (aunque estadísticamente es igual a G1), por lo que resultó ser el de menor calidad fisiológica después de imbibirla en agua por 32 horas (Cuadro 4.4).

Para las semillas sin germinar, cuyos resultados se muestran en el mismo Cuadro 4.4, se reportó alta significancia entre los genotipos, y la comparación de medias determinó que el genotipo con valores altos de semillas sin germinar fue el G3. Es de resaltar que el G12 no presentó ninguna semilla sin germinar a las 32 horas de imbibición. El testigo (G2), al igual que los genotipos G4, G9, G10, G11 y G13, resultaron tener menores valores de semillas sin germinar que el G1, y aún menores que el G3, quien mostró una marcada disminución de su calidad a este tiempo de imbibición; lo cual indica que su capacidad de germinación disminuye por las altas condiciones de humedad y cero

oxigenación a que fueron sometidas, causando deterioro a la semilla, tal como lo ha mencionado Ferguson (1995).

Cuadro 4.4 Cuadrados medios y significancia, resultado de la comparación de medias para las variables evaluadas en la prueba de capacidad de germinación a 32 horas de imbibición.

F.V.	G.L	PN (%)	PA (%)	SSM (%)
Genotipo	8	1084.0**	36.778NS	751.778**
Error	27	39.704	21.037	18.370
Comparación de medias	G1	77.0 b	8.0 ab	15.0 b
	G2	95.0 a	2.0 b	3.0 cd
	G3	45.0 c	10.0 a	45.0 a
	G4	90.0 a	2.0 b	8.0 c
	G9	94.0 a	2.0 b	4.0 cd
	G10	93.0 a	3.0 b	4.0 cd
	G11	92.0 a	3.0 b	5.0 cd
	G12	98.0 a	2.0 b	0.0 cd
	G13	90.0 a	2.0 b	8.0 c
Valor DMS		9.14	6.65	6.22

Medias sugeridas por la misma letra no son significativamente diferentes (DMS 0.05%).

** = Altamente significativo al 1% de probabilidad.

PN = Porcentaje de capacidad de germinación (plántulas normales).

PA = Porcentaje de plántulas anormales.

SSM = Porcentaje de semillas sin germinar (muerta, fresca o latente).

A las 48 horas de haber sido imbibida la semilla, los genotipos exhibieron en la capacidad de germinación una alta significancia (Cuadro 4.5), mostrando la comparación de medias que el mejor genotipo fue el G13, ya que obtuvo el cien por ciento de germinación, seguido del G4; los genotipos G2 (testigo), G9 y G12 tuvieron valores aceptables de germinación, pero no satisfactorios para considerarse de alta calidad fisiológica establecida para esta especie. Al igual

que en el tiempo anterior, el G3 presentó muy baja germinación y se consideró de mala calidad fisiológica a una imbibición de 48 horas.

El ANVA para las plántulas anormales en este tiempo de imbibición, no reportó significancia entre los genotipos (Cuadro 4.5), sin embargo, la comparación de medias mostró que el G13 fue el mejor, al no tener plántulas anormales y el G2 (testigo) fue el que presentó el mayor número de plántulas anormales, lo cual indica un deterioro en la semilla; mientras que los demás genotipos mostraron valores inferiores al testigo, aunque dentro de un mismo grupo de significancia.

En lo referente a las semillas sin germinar, se observó una alta significancia entre los genotipos, y al comparar las medias, el G3 obtuvo el mayor valor (62 por ciento), indicando un severo deterioro de la semilla; mientras que el genotipo que mejor comportamiento obtuvo por su nulo valor de semillas sin germinar fue el G13.

Es interesante hacer notar que en este tiempo de imbibición (48hrs), todos los genotipos, excepto G4, disminuyeran su capacidad de germinación a niveles inferiores de lo permitido para este especie marcado por el SNICS (1980), y que esto pudiera constituir un umbral en los casos en que se aplique osmocondicionamiento para la semilla de maíz.

Cuadro 4.5 Cuadrados medios y significancia, resultado de la comparación de medias para las variables evaluadas en la prueba de capacidad de germinación a 48 horas de imbibición.

F.V.	G.L	PN (%)	PA (%)	SSM (%)
Genotipo	8	1364.0**	10.00 NS	1341.778**
Error	27	50.370	11.70	52.741
Comparación de medias	G1	68.0 d	4.0 ab	28.0 b
	G2	83.0 bc	5.0 a	12.0 cd
	G3	35.0 e	3.0 ab	62.0 a
	G4	91.0 ab	3.0 ab	5.0 de
	G9	84.0 bc	3.0 ab	13.0 cd
	G10	70.0 d	1.0 ab	29.0 b
	G11	77.0 cd	4.0 ab	19.0 bc
	G12	82.0 bc	4.0 ab	14.0 cd
	G13	100 a	0.0 b	0.0 e
	Valor DMS		10.30	4.96

Medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes (DMS 0.05%).

** = Altamente significativo al 1% de probabilidad.

PN = Porcentaje de germinación (plántulas normales)

PA = Porcentaje de plántulas anormales.

SSM = Porcentaje de semillas sin germinar (muerta, fresca o latente).

Vigor

Envejecimiento Acelerado (EA)

El ANVA para el porcentaje de vigor mostró una alta significancia entre los genotipos estudiados (Cuadro 4.6) en la prueba de envejecimiento acelerado; observando que los mejores genotipos fueron el G2 (testigo) y G12, seguidos por el G4, G9, G10, G11 y G13, quienes mostraron altos valores de vigor, mientras que el G1 presentó el valor más bajo con 67 por ciento. En lo referente

a plántulas anormales resultantes del envejecimiento, se observó una significancia alta entre los genotipos, mostrando el genotipo testigo (G2) ser el mejor, por no presentar anomalías, seguido de G3, G4, G11, G12 y G13; quien resultó ser de menor vigor fue G1 con 10 por ciento de plantas anormales. Para las semillas sin germinar se obtuvo una alta significancia entre los genotipos (Cuadro 4.6), señalando la comparación de medias que los genotipos G2 (testigo), G4, G9, G10, G11 y G12 fueron los mejores al no presentar semillas sin germinar en la prueba de vigor, mientras que el G1 fue el que presentó el menor vigor por tener el valor más alto de semillas sin germinar.

Cuadro 4.6 Cuadros medios y significancia, resultado de la comparación de medias para las variables evaluadas en la prueba de envejecimiento acelerado.

F.V.	G.L	GER (%)	PA (%)	SSM (%)
Genotipo	8	380.00**	36.00**	232.00**
Error	27	39.704	13.037	20.741
Comparación de medias	G1	67.0 c	10.0 a	23.0 a
	G2	99.0 a	0.0 c	1.0 c
	G3	88.0 b	2.0 bc	10.0 b
	G4	94.0 ab	6.0 ab	0.0 c
	G9	94.0 ab	4.0 bc	2.0 c
	G10	94.0 ab	6.0 ab	0.0 c
	G11	97.0 ab	2.0 bc	1.0 c
	G12	98.0 a	2.0 bc	0.0 c
	G13	91.0 ab	4.0 bc	5.0 bc
Valor DMS		9.14	5.24	6.61

Medias sugeridas por la misma letra no son significativamente diferentes (DMS 0.05%).

** = Altamente significativo al 1% de probabilidad.

GER = Porcentaje en vigor de plántulas normales en la capacidad de germinación (Envejecimiento acelerado).

PA = Porcentaje de plántulas anormales (Envejecimiento acelerado).

SSM = Porcentaje de semillas sin germinar (puede ser muerta, fresca o latente).

Longitud Media de Plúmula (LMP)

En el tiempo de 0 horas de imbibición de los genotipos, se encontró una alta significancia, por lo que la comparación de la medias demostró que los genotipos G10, G11, G13 y G4 mostraron valores altos de longitud de plúmula, indicador de un alto vigor, mientras que G1 y G9, por sus bajos valores en esta variable se clasifican de bajo vigor (Cuadro 4.7).

Cuadro 4.7 Cuadrados medios y significancia, resultado de la comparación de medias para las variables evaluadas en el tiempo de 0 horas y envejecimiento acelerado respectivamente.

F.V.	G.L	LMP (cm)	PS (mg/pl)	LMPEA (cm)	PSEA (mg/pl)
Genotipo	8	3.000**	768.21**	14.218**	720.145**
Error	27	0.412	20.745	0.956	27.889
Comparación de medias	G1	9.97 d	47.35 e	4.35 b	31.24 e
	G2	11.03c	69.09 c	8.31 a	45.41 cd
	G3	11.24bc	54.39 d	8.62 a	41.40 d
	G4	12.04ab	43.18 e	5.10 b	18.49 f
	G9	10.68cd	67.98 c	5.48 b	44.38 cd
	G10	12.50 a	75.97ab	8.96 a	56.55 ab
	G11	12.35 a	84.04 a	8.67 a	63.88 a
	G12	11.03 c	69.03 c	9.02 a	39.17 d
	G13	12.02 a	72.97bc	8.49 a	50.67 bc
Valor DMS		0.93	6.61	1.42	7.66

Medias sugeridas por la misma letra no son significativamente diferentes (DMS 0.05%).

** = Altamente significativo al 1% de probabilidad.

LMP = Vigor de crecimiento de plántula (Longitud media de plúmula al tiempo 1).

PS = Peso seco total de plántulas normales (Tasa de crecimiento de plántula al tiempo 1)

LMPEA = Vigor de crecimiento de plántula (Longitud media de plúmula después de un envejecimiento).

PSEA = Peso seco total de plántulas normales (Tasa de crecimiento de plántula después de un envejecimiento).

En cuanto a la longitud de plúmula después de un envejecimiento acelerado (LMPEA), se detectó en el ANVA una alta significancia entre los genotipos (Cuadro 4.7), y la comparación de medias demostró que los genotipos G2 (testigo), G3, G10, G11, G12 y G13 presentaron altos valores de longitud de plúmula, teniendo así mayor vigor que los genotipos G1, G4 y G9, ya que estos presentaron bajos valores de longitud, al parecer éstos fueron afectados por las altas temperaturas y humedades del envejecimiento.

En lo referente a la longitud media de plúmula en los tiempos 2, 3 y 4 (24, 32 y 48 horas de imbibición respectivamente), se encontró una alta significancia entre los genotipos (Cuadro 4.8); mostrando que para cada tiempo resultó un genotipo diferente con alto vigor G12, G10 y G13 (LMP de 12.14, 11.33 y 12.54 cm) respectivamente para los tiempos antes mencionados; mientras que el G3, en los tres tiempos presentó los valores más bajos de vigor con LMP de 7.32, 4.97 y 3.81 cm; lo cual sugiere que las condiciones de humedad afectan su vigor, tal como lo ha mencionado Moreno (1996); además, los genotipos G1 (6.98 cm) y G10 (7.36 cm) en el tiempo 1 también resultaron ser de bajo vigor.

Peso Seco de Plántula

El ANVA para esta variable en su evaluación inicial (0 horas de imbibición) mostró alta significancia entre los genotipos, y la comparación de medias mostró que el G11 (con 84.04 mg/pl) resultó ser el mejor genotipo, seguido por el G10 (con 75.97 mg/pl), teniendo valores altos de peso seco, interpretandose

como de alto vigor, mientras que el G1 y el G4 obtuvieron pesos bajos (47.35 y 43.18 mg/pl respectivamente), indicando un bajo vigor.

En el peso seco de plántula después de un envejecimiento acelerado, también se encontró una alta significancia entre genotipos, donde G11 y G10, siguieron siendo los mejores al tener valores altos de PS con 63.88 y 56.55 mg/pl respectivamente; por su parte, el G4 (18.49 mg/pl) resultó ser el de menor vigor (Cuadro 4.7).

En lo que respecta a los tres tiempos de imbibición (24, 32 y 48 hrs), entre los genotipos se presentaron diferencias altamente significativas (Cuadro 4.8.), donde el G2 (testigo) obtuvo altos valores de PS (69.78, 62.88 y 74.47 mg/pl, respectivamente), resultando tener un alto vigor, seguido en el tiempo 2 por el G9 (67.23 mg/pl), mientras que en el tiempo 3 forma parte del grupo estadístico con altos valores de PS junto con G9 (63.74 mg/pl) y G11 (58.64 mg/pl) y en el tiempo 4 en el grupo de G9 (82.09 mg/pl) y G12 (82.70 mg/pl), quienes muestran tener altos valores de vigor en la prueba.

En contra parte, en el tiempo 2, el G4 con PS de 34.80 mg/pl fue el de menor vigor, así también en los tiempos 3 y 4 mantuvo valores bajos de PS (32.85 y 46.75 mg/pl), agrupándose con los genotipos G1 y G3 como los de menor valor.

Cuadro 4.8 Cuadrados medios y significancia, resultado de la comparación de medias para las variables evaluadas en los tiempos 2 (24horas), 3 (32 horas) y 4 (48 horas) respectivamente.

F.V.	GI	LMP2 (cm)	PS2 (mg/pl)	LMP3 (cm)	PS3 (mg/pl)	LMP4 (cm)	PS4 (mg/pl)
Gen	8	13.73**	490.76**	15.897**	602.365**	23.454**	713.066**
Error	27	1.178	18.847	0.801	23.000	0.827	42.694
Comp. de Medias	G1	6.98 e	46.21 d	6.63 de	35.62 e	6.59 d	53.90 e
	G2	9.02 c	69.78 a	9.75 bcd	62.88 ab	8.55 c	74.47 ab
	G3	7.32 de	49.46 d	4.97 f	35.73 e	3.81 e	55.98 de
	G4	9.78 c	34.80 e	9.14 cd	32.85 e	9.38 bc	46.75 e
	G9	8.79 cd	67.23ab	7.82 e	63.74 a	9.96 b	82.09 a
	G10	7.36 de	57.98 c	11.33 a	49.10 d	8.76 bc	64.63 cd
	G11	11.53ab	62.43 bc	10.78 ab	58.64 abc	8.89 bc	66.89 bc
	G12	12.14 a	58.93 c	10.37abc	55.25 cd	10.0 b	82.70 a
	G13	10.21bc	61.03 bc	10.95 ab	56.53 bc	12.54 a	51.05 e
Valor DMS		1.57	6.30	1.30	6.96	1.32	9.48

Medias sugeridas por la misma letra no son significativamente diferentes (DMS 0.05%).

** = Altamente significativo al 1% de probabilidad.

LMP2 = Vigor de crecimiento de plántula (Longitud media de plúmula al tiempo 1).

PS2 = Peso seco total de plántulas normales (Tasa de crecimiento de plántula al tiempo 2).

LMP3 = Vigor de crecimiento de plántula (Longitud media de plúmula al tiempo 3).

PS3 = Peso seco total de plántulas normales (Tasa de crecimiento de plántula al tiempo 3).

LMP4 = Vigor de crecimiento de plántula (Longitud media de plúmula al tiempo 4).

PS4 = Peso seco total de plántulas normales (Tasa de crecimiento de plántula al tiempo 4).

Los resultados anteriores sugieren la existencia de un posible daño por el tiempo de imbibición, ocasionando que no se produzca suficiente cantidad de peso seco en las plántulas, éstas pueden ser normales pero débiles, afectado de esta forma un establecimiento pobre en el campo. Así, existen genotipos con valores altos de LMP pero bajo PS, como es el caso del G12, quien tuvo una alta LMP (12.14 cm) y un PS bajo (58.93 mg/pl) en el tiempo 2; mientras en el tiempo 3, el G10 obtuvo 11.33 cm de LMP y 49.10 mg/pl; y en el último tiempo, el G13 con una LMP de 12.54 cm y 51.05 mg/pl de PS. Sin embargo, el testigo

fue poco afectado por los tiempos de imbibición, ya que se mantuvo con LMP y PS similares, tal como se puede apreciar en el Cuadro 4.8.

Sanidad

En el Cuadro 4.9, se muestra que en el tiempo 1, a 0 horas de imbibición, hubo una alta significancia entre los materiales, y la comparación de medias destaca que el G4 no presentó ninguna infección por *Fusarium moliniforme*, mientras que los genotipos G1, G2, G3, G9 y G11 presentaron valores altos de infección, en tanto el G10 y el G12 presentaron infección en menor cuantía que los genotipos antes mencionados.

Cuadro 4.9 Cuadrados medios y significancia, resultado de la comparación de medias para la semilla infectada por *Fusarium moliniforme*.

F.V.	G.L	SEMILLA INFECTADA POR <i>Fusarium moliniforme</i> (%)
Genotipo	8	20.486**
Error	27	325.926
Comparación de medias	G1	62.50 a
	G2	52.50 ab
	G3	62.50 a
	G4	0.0 e
	G9	50.0 abc
	G10	25.0cde
	G11	55.0 ab
	G12	12.5 de
	G13	35.0bcd
Valor DMS		26.19

** = Altamente significativo al 1% de probabilidad.

La identificación se realizó después de la purificación monoconidial, encontrando abundantes microconidios unicelulares. La longitud de estos fue de 6 -125 micras (μ) y 2.43-3 μ de ancho, ésta se encontró en cadena y cabezuela en el medio de cultivo. El hongo produjo pocos conidios cuando solo tenía siete días de edad, la célula ápical del microconidio terminó en forma reducida y redondeada; la parte basal fue en forma de pie. La ramificación de las fialides fue lateral en forma verticilada. Las dimensiones de tamaño fueron de 20 x 3 μ . Las fialides se adelgazaron en la parte terminal donde hubo la producción de conidios.

La presencia de clamidosporas no fue tan evidente en el cultivo. Éstas se pudieran confundir con el micelio que va germinando y se producen cuando el micelio está formando parte del cuerpo fructífero de la fase sexual de este hongo en la parte terminal, intercaladas y en cadena.

Estas características identifican al *Fusarium moniliforme* según Booth (1971); donde todas las cajas presentaron estas características y la variabilidad fue evidente entre los diferentes genotipos, ya que se observó una amplia gama de colores entre los aislamientos.

La agresividad del hongo depende de la toxina que produce. Por el efecto de la imbibición de agua en diferentes tiempos a lo que fueron expuestos los genotipos, se desarrolló un gran exceso de patógeno, en este caso *Fusarium moliniforme*, por lo que fue imposible su contabilidad en la prueba, lo que nos

indica que a mayor tiempo de imbibición, se reproducen más patógenos; lo que nos puede indicar que el tipo de patógeno o en este caso el tipo de toxina, afecta la membrana celular de algunos genotipos susceptibles a este patógeno o toxina, coincidiendo con Carrillo (2003), quien mencionó que las micotoxinas producidas por estos patógenos actúan sobre membranas celulares inhibiendo el ADN y la síntesis de ARN, alterando el metabolismo de los lípidos y proteínas, principalmente en casos extremos de humedad en el medio.

Cuantificación de Proteínas por el Método de Lowry

Albúmina

Para esta proteína se reportó alta significancia en las tres formas de evaluación (semilla entera, la porción de endospermo y la porción de embrión), siendo confiables de acuerdo a sus coeficientes de variación: Esto indica que la cantidad de albúminas presente tanto en la semilla entera, en el endospermo y en el embrión puede estar determinado por el genotipo (Cuadro 4.10).

Globulina

En lo referente a esta proteína, se observó una alta significancia entre los genotipos en semilla entera y en la porción de endospermo, mientras que en la porción de embrión no se detectó diferencia entre los genotipos (Cuadro 4.10).

Esta proteína como la albúmina son proteínas funcionales, las cuales se encuentran también en el embrión y en la capa de aleurona (Luengo, 2001), así mismo los resultados sugieren que existe igual cantidad de globulina en el embrión de los genotipos evaluados, mientras que la cantidad de globulina que se encuentra en el endospermo y por consecuencia en la semilla entera son diferentes.

Cuadro 4.10 Cuadrados medios y significancia para cuantificación de albúmina y globulina por el método de Lowry en semilla y sus componentes.

FV	GL	ALBUMINA			GLOBULINA		
		SE	END	EMB	SE	END	EMB
Gen	8	0.00162**	0.00148**	0.0346**	0.0018**	0.00306**	0.0035NS
Error	18	0.00036	0.00027	0.0049	0.000214	0.00021	0.0028
CV		2.51%	17.94%	11.08%	1.96%	10.25%	5.99%

** = Altamente significativo al 1% de probabilidad.

CV = Coeficiente de variación.

SE = Semilla entera

END = Endospermo

EMB = Embrión

Zeína

El ANVA del Cuadro 4.11 reportó una alta significancia entre los genotipos para la evaluación de la semilla entera y en el endospermo; mientras que en el embrión no hubo diferencias entre los genotipos. Lo anterior confirma lo descrito por Valdez (2002) y Forato *et al.*, (2000), quienes mencionan que la zeína se encuentra principalmente en el endospermo, siendo una proteína estructural, integral y/o transmembranal, la cual determina la permeabilidad de las

membranas, y en este caso, las cantidades de zeína son diferentes en el endospermo y obviamente en la semilla entera en cada genotipo evaluado; sin embargo en el embrión, la cantidad de zeína es estadísticamente igual.

Glutelina

Al igual que las dos proteínas anteriores, hubo diferencias ($P < 0.01$) entre los genotipos en la evaluación de semilla entera y endospermo, mientras que en la evaluación de embrión no hubo diferencia; se registraron C.V. menores al 13 por ciento, señalado en el mismo Cuadro 4.11. Con ello se confirma lo descrito por Valdez (2002), que al igual que la zeína, la glutelina es una proteína estructural o de reserva y se localiza principalmente en el endospermo; y por consecuencia en la semilla entera; mientras que en el embrión, la cantidad de esta proteína resulta estadísticamente similar.

Cuadro 4.11 Cuadrados medios y significancia para cuantificación de albúmina y globulina por el método de Lowry en semilla y sus componentes.

FV	GL	ZEINA			GLUTELINA		
		SE	END	EMB	SE	END	EMB
Gen	8	0.0238**	0.0465**	0.00214NS	0.0207**	0.0679**	0.0048NS
Error	18	0.00055	0.00032	0.00059	0.00138	0.00327	0.0034
CV		15.54%	4.46%	9.32%	9.5%	12.25%	7.5%

** = Altamente significativo al 1% de probabilidad.

CV = Coeficiente de variación.

SE = Semilla entera

END = Endospermo

EMB = Embrión

Comparación de Proteínas en Semilla Entera

Los genotipos G11 y G13 señalados en el Cuadro 4.12, mostraron las más altas concentraciones de albúmina (0.767 y 0.777 mg/ml), globulina (0.778 y 0.789 mg/ml) y zeína (0.269 y 0.257 mg/ml) respectivamente, pero bajos contenidos de glutelina (0.434 y 0.467 mg/ml); indicando contenidos altos de proteínas funcionales y solo una de las integrales. También el G3 presentó alto contenido de proteínas funcionales (albúmina 0.773 mg/ml y globulina 0.778 mg/ml) pero bajo contenido de proteínas integrales, sobre todo glutelina (0.304 mg/ml); otros genotipos como el G1 y G4 también pertenecen estadísticamente al grupo de altos contenidos de albúmina, pero presentaron bajos contenidos de globulina y de proteínas integrales.

En el caso del G2 (testigo) y G9 se presentó en el mismo grupo estadístico, tanto en las proteína funcionales como estructurales; en cambio, G12 presentó la más alta concentración de glutelina con 0.531 mg/ml pero bajos contenidos de albúmina y globulina (0.735 y 0.737 mg/ml). Uno de los genotipos que presentó bajos contenidos de albúmina, globulina y zeína (con 0.712, 0.735 y 0.040 mg/ml, respectivamente) fue el G10, así como el G9, quien también presentó bajo contenido de zeína con 0.019 mg/ml.

Comparación de Proteínas en Endospermo

El testigo (G2) y el G13 presentaron los más altos contenidos de albúmina (0.108 y 0.133 mg/ml) y globulina (0.187 y 0.174 mg/ml), añadiéndose a esta última con alto contenido el G9 (0.171mg/ml); mientras que los genotipos G3, G4 y G12, tienen los más bajos contenidos de estas dos proteínas; otro genotipo que también presentó baja concentración de albúmina es el G10 con 0.081 mg/ml (Cuadro 3.13). En este mismo cuadro se observó que el testigo resultó tener la más alta concentración de zeína (0.596 mg/ml), mientras que el G1 contiene las más bajas concentraciones de esta proteína con 0.122 mg/ml y de globulina con 0.102 mg/ml, junto con los genotipos G3, G4 y G12. El genotipo que presentó la mayor concentración de glutelina con 0.829 mg/ml, es el G13, y los que presentaron las más bajas concentraciones de esta proteína en el endospermo son los genotipos G3 y G11 con 0.286 y 0.364 mg/ml respectivamente.

Comparación de Proteínas en Embrión

En el Cuadro 4.14 se aprecia que los genotipos G2, G10 y G13 presentaron las más altas concentraciones de zeína y glutelina; en cambio, los genotipos G1, G9 y G12 resultaron tener los más bajos contenidos de albúmina (0.571, 0.533 y 0.456 mg/ml) y de zeína (0.224, 0.248 y 0.228 mg/ml respectivamente), así como los genotipos G3 y G10 con bajos contenidos (0.253 y 0.261 mg/ml) de esta última proteína; en tanto que los genotipos G3

(0.728 mg/ml) y G11 (0.820 mg/ml) presentaron las mayores valores de albúmina. En cuanto a los genotipos G1, G3, G4 y G11, mostraron bajos contenidos de glutelina.

Cuadro 4.12 Comparación de medias en las diferentes proteínas de semilla entera de los genotipos evaluados.

Proteína	G1	G2	G3	G4	G9	G10	G11	G12	G13
Albúmina	0.773 ab	0.744 bcde	0.773 ab	0.756 abcd	0.727 de	0.712 e	0.767 abc	0.735 cde	0.777 a
Globulina	0.752 bc	0.718 d	0.769 ab	0.735 cd	0.723 d	0.735 cd	0.778 a	0.737 cd	0.789 a
Zeína	0.201 b	0.118 b	0.104 c	0.143 c	0.019 d	0.040 d	0.269 a	0.204 b	0.257 a
Glutelina	0.404 c	0.273 d	0.304 d	0.403 c	0.317 d	0.434 bc	0.383 c	0.531 a	0.467 b

Medias sugeridas por la misma letra no son significativamente diferentes (DMS 0.05%).

Cuadro 4.13 Comparación de medias en las diferentes proteínas del endospermo de los genotipos evaluados.

Proteína	G1	G2	G3	G4	G9	G10	G11	G12	G13
Albúmina	0.0912 b	0.108 ab	0.080 bc	0.080 bc	0.085 b	0.081 bc	0.105 b	0.054 c	0.133 a
Globulina	0.102 c	0.187 a	0.122 c	0.105 c	0.171 ab	0.150 b	0.150 b	0.113 c	0.174 ab
Zeína	0.122 d	0.596 a	0.439 b	0.443 b	0.413 b	0.443 b	0.380 c	0.356 c	0.417 b
Glutelina	0.454 bc	0.508 b	0.286 d	0.414 bc	0.424 bc	0.467 b	0.364 cd	0.458 bc	0.829 a

Medias sugeridas por la misma letra no son significativamente diferentes (DMS 0.05%).

Cuadro 4.14 Comparación de medias en las diferentes proteínas del embrión de los genotipos evaluados.

Proteína	G1	G2	G3	G4	G9	G10	G11	G12	G13
Albúmina	0.571 cde	0.658 bc	0.728 ab	0.629 cbd	0.533 de	0.668 bc	0.820 a	0.456 e	0.596 cd
Globulina	0.845 a	0.912 a	0.910 a	0.872 a	0.856 a	0.918 a	0.914 a	0.844 a	0.839 a
Zeína	0.224 d	0.295 a	0.253 bcd	0.290 ab	0.248 cd	0.261 abcd	0.292 ab	0.228 cd	0.269 abc
Glutelina	0.085 b	0.122 ab	0.062 b	0.072 b	0.034 b	0.115 ab	0.056 b	0.269 a	0.125 ab

Medias sugeridas por la misma letra no son significativamente diferentes (DMS 0.05%).

Proteína Total por el Método Macrokjeldahl

El análisis de varianza reportó diferencias altamente significativas entre genotipos en la semilla entera, endospermo y embrión (Cuadro 4.15).

Cuadro 4.15 Cuadrados medios y significancias de proteínas totales en semilla entera, endospermo y embrión en los genotipos evaluados.

FV	G.L	SEMILLA ENTERA (% PT)	ENDOSPERMO (% PT)	EMBRIÓN (% PT)
Genotipo	8	0.548**	1.697**	178.168**
Error	9	0.0538	0.082	1.141
CV		2.52%	3.63%	5.75%

** = Altamente significativo al 1% de probabilidad.

CV = Coeficiente de variación.

% PT = Porcentaje de proteínas totales.

La prueba de comparación de medias para semilla entera, los genotipos G4 y G11 presentaron valores altos en el contenido de proteínas totales (9.64 y 10.07 por ciento), en tanto que el G2 (testigo con 8.32 por ciento) obtuvo el valor más bajo de proteínas totales, al igual que el G9 con 8.65 por ciento, coincidiendo con los resultados en la cuantificación por el método de Lowry, donde el G4 tuvo por lo menos una de las proteínas (albúmina) con alta concentración y el G11 obtuvo valores altos en tres de las cuatro proteínas evaluadas (Cuadro 4.16), indicando un alto porcentaje en la suma de estas proteínas y de nitrógeno no proteínico (Ezeagu *et al.*, 2002).

En cuanto a la porción de endospermo, en el mismo cuadro se observó que los genotipos G11 (9.26%) y G12 (8.82%), mostraron los contenidos más altos, sugiriendo que este porcentaje se debe principalmente al nitrógeno no proteico o a proteínas diferentes a la albúmina, globulina, zeína y glutelina, ya que estos genotipos presentaron bajos contenidos de estas proteínas en el endospermo por el método de Lowry, en cambio, se reafirma la baja concentración de proteínas que presenta el G3 (6.60%) en el endospermo y en G13 que contienen 6.77 por ciento de proteínas totales, las cuales parecen ser en su totalidad las cuatro proteínas evaluadas (albúmina, globulina, zeína y glutelina).

Cuadro 4.16 Comparación de medias en proteína total en semilla entera, endospermo y embrión en los genotipos evaluados.

GENOTIPO	SEM. ENTERA (% PT)	ENDOSPERMO (% PT)	EMBRION (% PT)
G1	9.26 bcd	8.44 bc	16.51 cd
G2	8.32 f	7.26 de	19.38 b
G3	8.97 de	6.60 f	14.94 d
G4	9.64 ab	7.47 d	14.44 d
G9	8.65 ef	8.32 bc	10.02 e
G10	9.23 bcd	8.17 c	42.76 a
G11	10.07 a	9.26 a	17.63 bc
G12	9.51 bc	8.82 ab	16.59 cd
G13	9.11 cde	6.77 ef	14.77 d
Valor DMS	0.53	0.65	2.42

Medias sugeridas por la misma letra no son significativamente diferentes (DMS 0.05%).
% PT = Porcentaje de proteína total por el método de Macrokjeldahl.

En la porción de embrión (Cuadro 4.16), se observó que el G10 tuvo el mayor porcentaje de proteína total entre los genotipos y G9 el de menor porcentaje; lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el método de

Lowry, ya que el G10 es uno de los genotipos que tiene tres proteínas (globulina, zeína y glutelina) con mayor concentración en el embrión, en contraste con G9, quien sólo tiene una globulina en mayor concentración como se mostró en el Cuadro 4.13.

Separación de Proteínas por Electroforesis Vertical

Se muestra en la Figura 4.2, los resultados de la separación por electroforesis de la proteína de albúmina patrón; la cual presenta seis bandas, las cuales se compararon con la separación PAGE-SDS de proteínas estándar hecha por Bertorelli (1982), mostrando pesos moleculares (PM) desde 66.0 a 13.0 Kilo Daltons (KD). Siguiendo el patrón presentado por este autor, se logró obtener los pesos moleculares de las diferentes fracciones de las proteínas (albúmina, globulina, zeína y glutelina) en semilla entera, en endospermo y en embrión del testigo (G2) para poderlo comparar con los diferentes genotipos estudiados.

El Cuadro A.1, concentra la coincidencia de bandas existentes por la separación por electroforesis PAGE-SDS para la proteína albúmina en semilla entera del testigo; comparándolas con los genotipos G1, G3, G4, G9, G10, G11, G12 y G13; donde la fracción de polipéptidos con PM de 66.0 KD del testigo no se detectó en el G3, mientras que en el resto de los genotipos si esta presente, sugiriendo que el G3 es diferente en su composición proteíca. La

fracción de 58.8 KD no se detectó en los genotipos G4, G5 y G12; haciéndolos diferentes al testigo; El G1 por ejemplo, presentó alta semejanza con el testigo a excepción de la fracción de polipéptidos con PM de 52.1 KD, esto se puede apreciar visualmente en la Figura 4.3.

En general, los genotipos G3, G4, G10, G11 y G13 no presentaron dos bandas o fracciones de polipéptidos que tiene el testigo con diferentes pesos moleculares, lo cual confirma la diferencia proteica de dichos genotipos con el testigo en semilla completa.

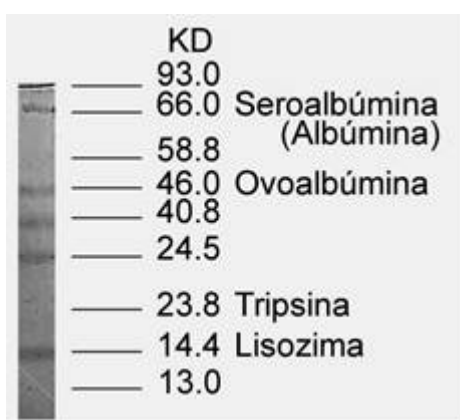
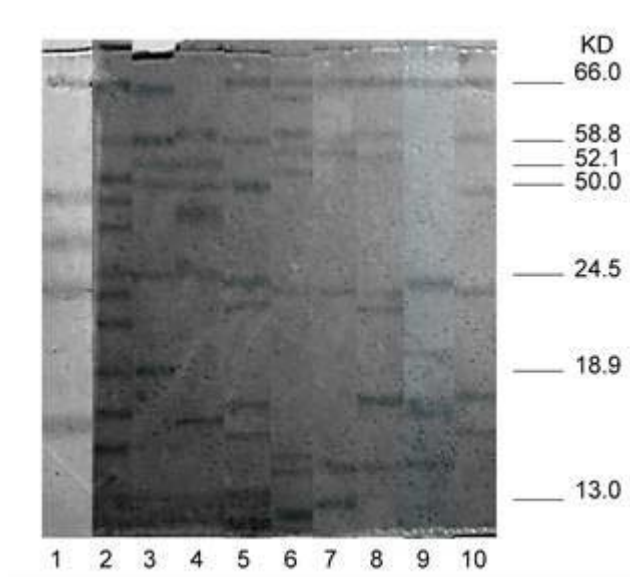


Figura 4.2 Separación por electroforesis vertical PAGE-SDS de proteína estándar seroalbúmina de bovino (66.0 KD).



1 = Seroalbúmina (patrón).

2 al 10 = Genotipos de maíz.

* Peso Molecular expresado en Kilo Daltons (KD)

Figura 4.3 Gel de poliacrilamida de nueve genotipos de maíz en semilla entera y el estándar de la proteína seroalbúmina.

Los resultados de la separación por electroforesis PAGE-SDS de los polipéptidos en la proteína de albúmina en endospermo mostrados en el Cuadro A.2, señalan la ausencia de fracciones de polipéptidos en los genotipos evaluados; los genotipos G1, G10 y G11, no presentan la fracción con PM de 50.0 KD, mientras que en los genotipos G3 y G13 si esta presente (Figura 4.4).

El G3 presenta la mayoría de las bandas del testigo en el endospermo, con excepción de la fracción de 15.9 KD, en el Cuadro A.3, se reafirma la coincidencia de bandas en las tres formas de evaluación, esta banda también se encuentra ausente en los genotipos G4 y G9; señalando más diferencias con respecto al testigo.

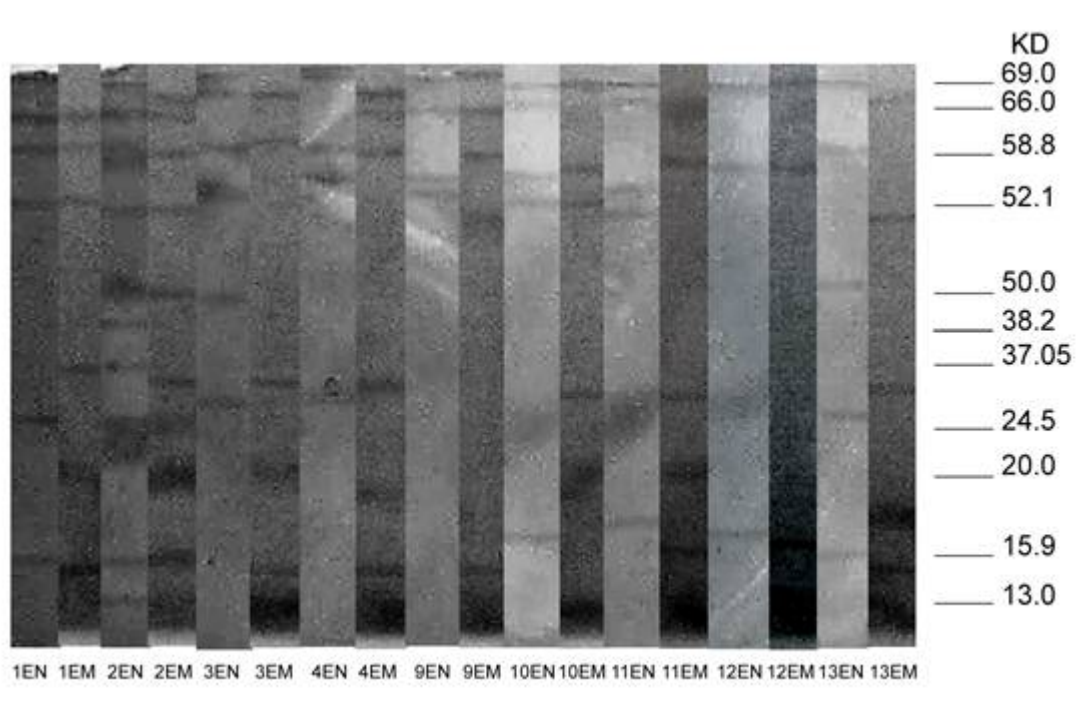
La fracción ausente en la mayoría del testigo fue la del peso molecular de 50.0 KD presente solo en G3 y G13, afirmando esta similitud en el Cuadro A.3, que indica la coincidencia de bandas en la separación por electroforesis PAGE-SDS entre los genotipos y la albúmina patrón (seroalbúmina).

En lo referente a la separación de la albúmina en embrión, cuya presencia de bandas se muestra en la Figura 4.4 y se señala en el Cuadro A.4, donde existe una gran diferencia entre los genotipos y el testigo en fracciones de diferentes pesos moleculares de los polipéptidos. En cuanto a la similitud entre los genotipos evaluados, solo el G4 presentó casi las mismas fracciones de polipéptidos que el testigo, excepto la banda de 52.1 KD, lo que lo hace similar a éste en su composición proteica del embrión (Cuadro A.3).

La separación por electroforesis vertical PAGE-SDS de la proteína globulina en endospermo en el testigo, detectó seis bandas o fracciones de polipéptidos señaladas en el Cuadro A.5; en el mismo se observa la comparación del testigo con el resto de los genotipos evaluados, donde el G3 no presenta una fracción de la separación de proteína del testigo (41.25 KD), lo cual indica una diferencia en el contenido de globulina de los genotipos G2 y G3 en endospermo. Lo mismo sucede con los genotipos G10, G11 y G12, quienes tienen diferencia con el testigo de una banda que no está presente en cada uno de ellos (las bandas de PM 60.0, 55.8 y 25.8 KD). Los genotipos G1, G4 y G13 les faltan dos fracciones de polipéptidos indicadas en el testigo, por lo que parecen ser diferentes en la composición proteica, siendo más acentuada la

diferencia en el G9, por no existir tres de las bandas indicadas en el mencionado Cuadro.

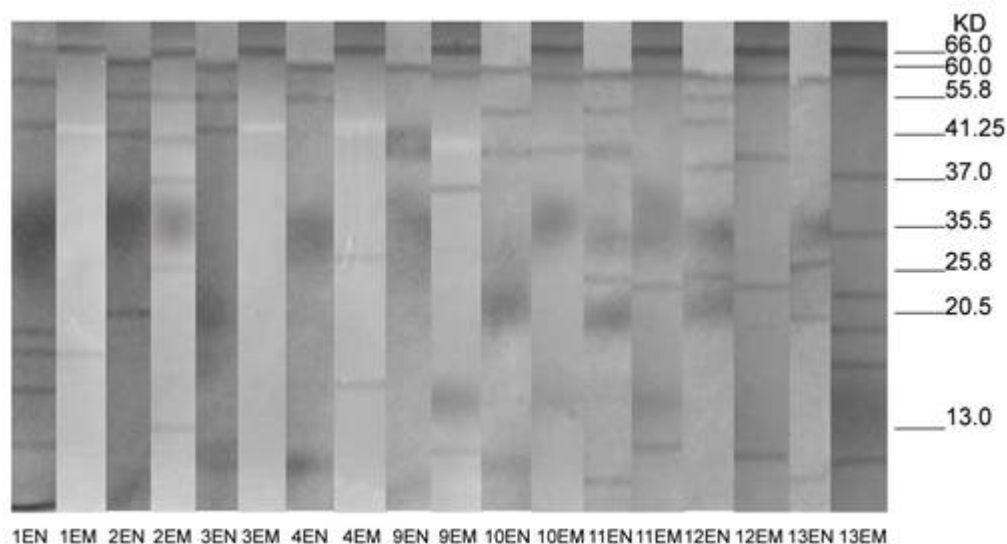
La mayor similitud se dió en las bandas de 66.0 y 41.25 KD y los genotipos G1, G3, G10, G11, G12 y G13 presentaron la fracción de PM de 37.0 KD en la separación de la proteína de globulina en endospermo y resulta interesante que esta misma banda esta presente en el embrión de los mismos materiales (Figura 4.5).



1-13 EN = Genotipo- Endospermo; 1-13 EM = Genotipo- Embrión

* Peso Molecular expresado en Kilo Daltons (KD)

Figura 4.4 Gel de poliacrilamida de nueve genotipos de maíz en endospermo y en embrión de la proteína albúmina.



1-13 EN = Genotipo- Endospermo; 1-13 EM = Genotipo- Embrión

* Peso Molecular expresado en Kilo Daltons (KD)

Figura 4.5 Gel de poliacrilamida de nueve genotipos de maíz en endospermo y en embrión de la proteína globulina.

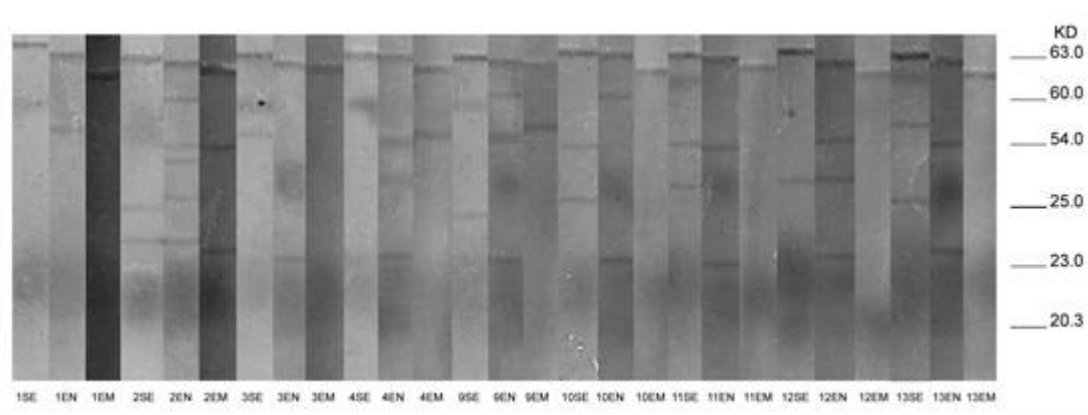
En la separación de la globulina en el embrión del genotipo G2, se definieron seis bandas o fracciones de polipéptidos mencionadas en el Cuadro A.6, el cual también describe las coincidencias de fracciones entre el testigo y el resto de los genotipos evaluados. Los genotipos G9, G11 y G13 presentaron alta similitud con el testigo a diferencia de los que tienen una banda o fracción ausente, como por ejemplo, el G9 donde falta la fracción de PM de 35.5 KD, en los genotipos G11 y G13, la fracción con PM de 55.8 KD; mientras que el G3 solo presenta dos bandas parecidas al testigo, por lo que no existe similitud en la composición proteica del testigo y los genotipos.

Sin embargo se conforma la similitud de composición proteica entre los genotipos G1, G3, G10, G11, G12 y G13 por la fracción de PM de 37.0 KD en la

separación de la proteína de globulina en embrión, quien se muestra en la Figura 4.5.

En cuanto a la separación de zeína en semilla entera; resultaron seis fracciones de polipéptidos en el testigo, las cuales se compararon con las separaciones de cada genotipo y se observó que el G11 coincide en todas las bandas al testigo, lo cual indica que esta proteína se encuentra en igual composición en los dos genotipos; en tanto que en los genotipos G3, G9, G10 y G13 hizo falta una banda para ser similares en esta proteína (Cuadro A.7); y los genotipos G1 y G4 no presentaron las mismas dos bandas; y en el G9 y el G10 también faltaron dos bandas en su separación de electroforesis como se muestra en la Figura 4.6.

Entre los genotipos evaluados en la separación de zeína en semilla entera hubo coincidencia en las fracciones de polipéptidos con PM de 23.0 y de 20.3 KD, tal como se aprecia en la Figura 4.6. Mientras que en la composición de zeína en endospermo y embrión hubo coincidencia de los genotipos en las fracciones de polipéptidos con PM de 23.0 y 20.3 KD, según se aprecia en los Cuadros A.8 y A.9.



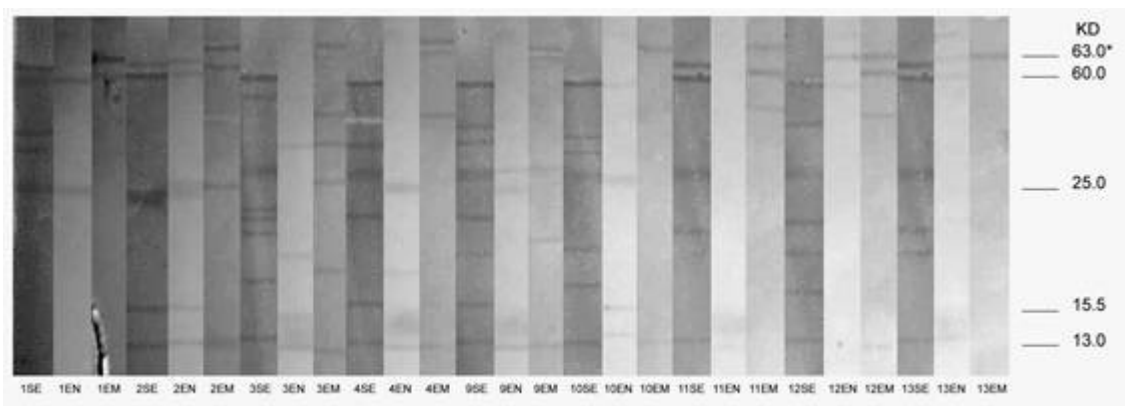
1-13 SE = Genotipo- Semilla entera; 1.13 EN = Genotipo- Endospermo; 1-13 EM = Genotipo- Embrión; * Peso Molecular expresado en Kilo Daltons (KD)

Figura 4.6 Gel de poliacrilamida de nueve genotipos de maíz en semilla entera, en endospermo y en embrión de la proteína zeína.

Con respecto a la separación de la glutelina en semilla entera, se observó que los genotipos G3, G4, G9, G10 y G12 no presentaron las bandas con PM de 63.0 KD (Cuadro A.10), además los genotipos G3, G10 y G12 no presentaron las bandas con PM de 63.0 y 15.5 KD. La mayor coincidencia con el testigo lo presentaron G4, G9, G11 y G13, quienes difieren solo en una banda al analizar la semilla entera, como se muestra en la Figura 4.7. Pero en la separación de glutelina en endospermo y embrión hay gran diferencia entre los genotipos y el testigo por la ausencia de bandas en sus separaciones (Cuadros A.11 y A.12).

En el endospermo (Cuadro A.11), solo el G13 difirió con el testigo en la banda de 25.0 KD, y el resto de genotipos no mostró 2 o 3 bandas, como se muestra en la Figura 4.7. Respecto al contenido proteico en el embrión, solo la banda de 63.0 KD fue común en todos los genotipos, en tanto, los genotipos

G9, G11 y G12 difirieron con el testigo en solo una banda de distinto peso molecular, según se aprecia en el Cuadro A.12.



1-13 SE = Genotipo- Semilla entera; 1-13 EN = Genotipo- Endospermo; 1-13 EM = Genotipo- Embrión; * Peso Molecular expresado en Kilo Daltons (KD)

Figura 4.7 Gel de poliacrilamida de nueve genotipos de maíz en semilla entera, en endospermo y en embrión de la proteína glutelina.

Relación entre Variables

En el Cuadro 4.17, se aprecia el análisis de componentes principales explicando un 65.5 por ciento de la variación total con tres componentes principales o factores, el primer factor contuvo un 32.6 por ciento de la varianza total y explicó principalmente la relación que existe entre la capacidad de germinación, el vigor y la concentración de globulina en el endospermo, relacionándose positivamente entre sí y con el primer Factor, por lo cual se puede considerar éste como un componente o factor fisiológico. El segundo factor explicó un 18.3 por ciento de la varianza total y estuvo determinado por las concentraciones de albúmina y globulina en el embrión, donde estas se

relacionaron negativamente con la concentración de glutelina en la semilla entera, así también, mostró una relación con la sanidad de la semilla y la concentración de globulina en el endospermo, considerando a este factor como un componente químico-sanitario. El resto de la varianza explicada (14.6%) lo retuvo el tercer factor, señalando principalmente la relación entre las concentraciones de albúmina, globulina y zeína en semilla entera.

Lo anteriormente expresado se puede apreciar gráficamente en la Figura 4.8, en donde se establecen las relaciones ya mencionadas; aprovechando aún más los cuadrantes que aparecen; se detecta en el cuadrante superior derecho el estar comprendido principalmente por la capacidad de germinación y longitud media de plúmula en los tres tiempos de imbibición, además de la evaluación inicial, deduciendo de esta forma, que existe una estrecha relación entre el vigor y el porcentaje de proteína total en semilla entera y endospermo, así como con las concentraciones de glutelina en las tres formas en que se determinó en la semilla (endospermo, embrión y semilla entera) y aunado a esto la concentración de zeína en la semilla entera, dando por resultado la existencia de una relación positiva entre ellas y negativa con el por ciento de infección en la semilla (sanidad) y las concentraciones de globulina y albúmina en semilla entera y de esta última en el embrión (cuadrante inferior izquierdo).

Con ello, se explica que la capacidad de germinación y el vigor (longitud media de plúmula) están directamente relacionadas con las concentraciones de glutelina principalmente.

Al parecer, la concentración de las proteínas funcionales en semilla entera y embrión están estrechamente relacionadas con el ataque de *Fusarium moliniforme*, es decir, a mayor concentración de albúmina y globulina en la semilla entera hay mayor incidencia del patógeno, lo cual sugiere que este patógeno requiere de dichas proteínas para su proliferación, lógicamente si hay más infección se obtiene menos germinación y por lo tanto menor vigor en la semilla.

En esta misma Figura 4.8, se aprecia en el cuadrante inferior derecho la relación positiva que existe entre el vigor (el envejecimiento acelerado y el peso seco) con las concentraciones de albúmina y zeína en el endospermo, y de esta última con globulina ambas en el embrión, las cuales están relacionadas negativamente con la incidencia del *Fusarium* mencionado anteriormente.

Vale la pena resaltar que la poca asociación del porcentaje de proteína total con las proteínas aisladas (albúmina, globulina, zeína y glutelina), confirma lo propuesto por Ezeagu y colaboradores (2002), donde el factor de conversión utilizado para calcular el porcentaje de proteína total no proporciona la estimación total del contenido de proteínas en la semilla.

Cuadro 4.17 Coeficientes de correlación de variables con los factores, eigenvalores y varianza explicada para los nueve genotipos de maíz.

VARIABLE	FACTOR 1	FACTOR 2	FACTOR 3
CGPN	0.825*	0.288	0.191
G24PN	0.948*	0.197	-0.035
G32PN	0.851*	0.351	0.092
G48PN	0.851*	0.351	0.092
EAPN	0.775*	-0.241	0.116
VPL	0.484	-0.276	-0.499
VEAPL	0.394	-0.410	-0.220
V24PL	0.648	0.326	-0.356
V32PL	0.903*	0.112	-0.288
V48PL	0.786*	0.339	-0.228
VPS	0.777*	-0.382	-0.148
VEAPS	0.518	-0.589	-0.217
V24PS	0.649	-0.433	0.241
V32PS	0.806*	-0.259	0.179
V48PS	0.538	-0.001	0.629
<i>Fusarium m.</i>	-0.409	-0.611	0.042
%NSE	0.036	0.378	-0.628
%NENDOS	0.309	0.362	0.087
%NEMB	0.268	-0.187	0.089
ALBSE	-0.527	-0.084	-0.716*
ALBENDO	0.173	-0.476	-0.542
ALBEMB	-0.105	-0.761*	-0.413
GLOSE	-0.196	-0.178	-0.889*
GLOENDO	0.612	-0.618	0.108
GLOEMB	0.062	-0.774*	0.092
ZEINSE	0.076	0.254	-0.834*
ZEINENDO	0.499	-0.557	0.213
ZEIN EMB	0.386	-0.533	-0.282
GLUTSE	0.301	0.737*	-0.407
GLUTENDO	0.421	0.146	-0.400
GLUTEMB	0.408	0.539	0.024
VARIANZA	32.60	18.30	14.61

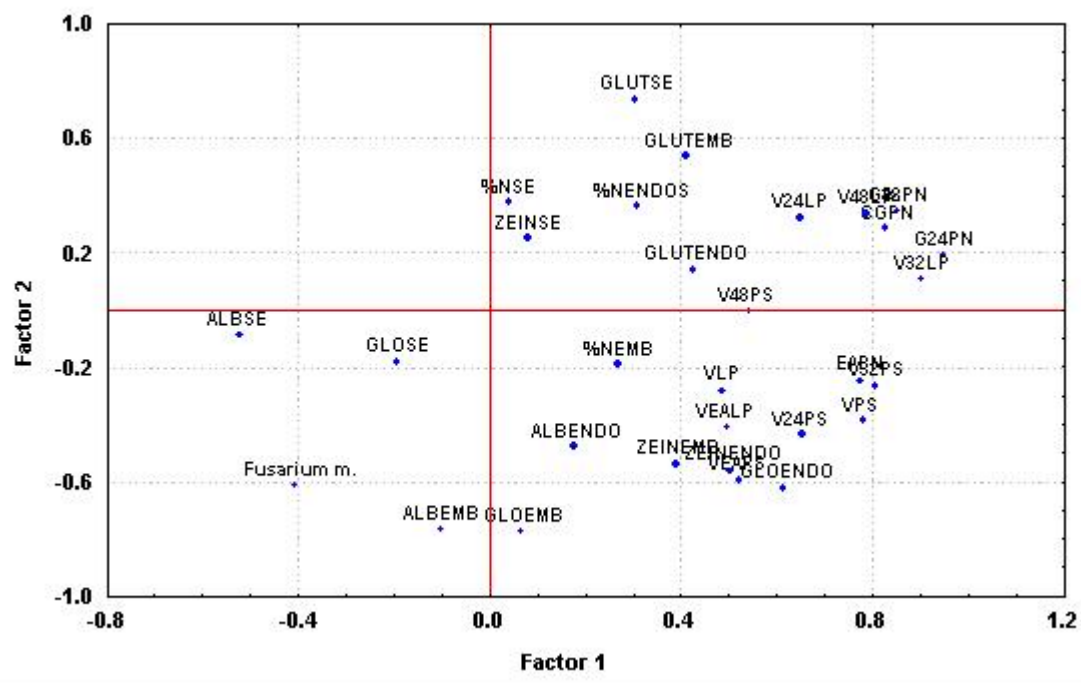


Figura 4.8 Relación entre variables estudiadas con base en los dos primeros Factores (fisiológico y químico-sanitario).

Los resultados del análisis de componentes principales se utilizaron para establecer la relaciones entre los genotipos, apreciándose en la Figura 4.9 que el genotipo G2 es muy similar en su caracterización general a los genotipos G10 y G11, así como con los genotipos G9 y G13, caracterizados por presentar mayor vigor (peso seco y envejecimiento acelerado) y una alta concentración de proteínas descritas en el cuadrante inferior derecho de la Figura 4.8.

Por su parte, el genotipo G12 se caracterizó por tener excelente capacidad de germinación, alta longitud media de plúmula pero con bajo peso seco. El genotipo que presentó mayor deterioro por infección del patógeno y reducción de sus concentraciones de proteínas funcionales fue el G3, dando valores bajos en la capacidad de germinación en los diferentes tiempos de imbibición y en las

pruebas de vigor al igual que el G1, aunque éste presentó concentraciones diferentes de proteínas.

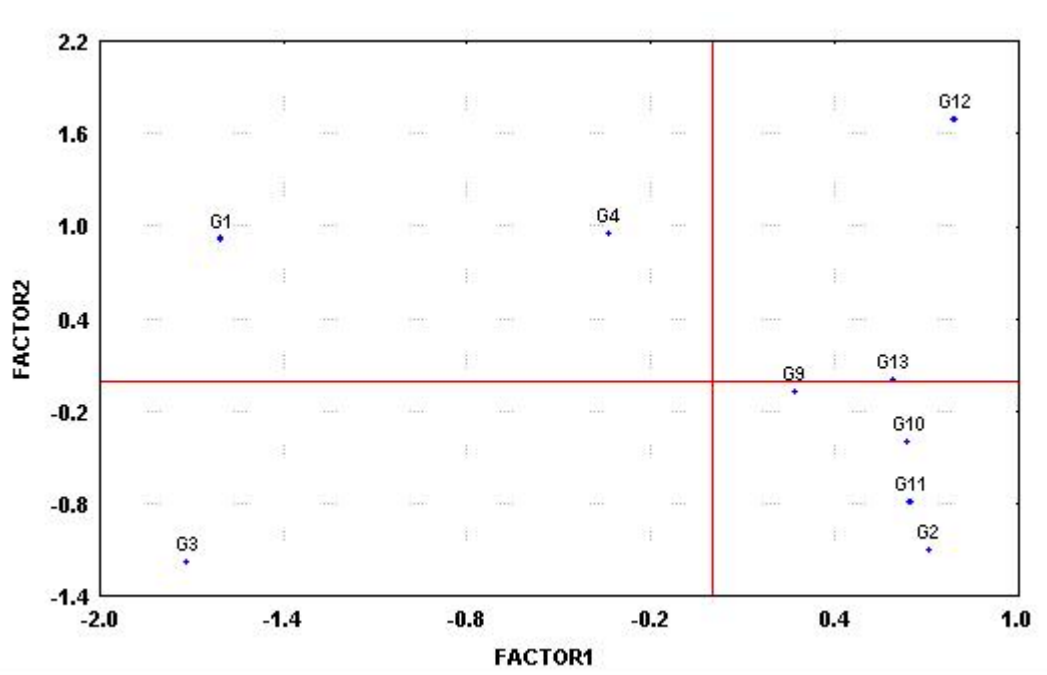


Figura 4.9 Relación entre genotipos estudiados con base en los dos primeros Factores (fisiológico y químico-sanitario).

Evaluación en campo

El comportamiento general de los cuatro genotipos (G1, G2, G3 y G4) en las tres localidades estuvo acorde a la diferencia en los métodos de siembra que se utilizaron, así en la localidad de San Antonio, donde se sembró en seco y después se dio un riego pesado, la emergencia general de los genotipos fue de menos del 50 por ciento, mientras que en la localidad de Salamea, por la ubicación del terreno y mantener el agua del riego tan estático produjo una germinación ligeramente más elevada, mayor al 55 por ciento, pero menor del 60 por ciento, en cambio en la localidad de Santa Lucía, la emergencia obtenida

por los diferentes genotipos en el método de siembra en húmedo fue mayor del 65 por ciento, tal como se aprecia en la Figura 4.10.

En cuanto el comportamiento de los genotipos en el método de siembra en seco, se observa en la Figura 4.11, que el G3 presentó una marcada disminución en la germinación al igual que el G1, con porcentajes menores de 45 por ciento, lo cual se atribuye a la baja capacidad de germinación y vigor, así como a los elevados porcentajes de infección por *Fusarium moliniforme*, mientras que el G2 presentó germinaciones de 70 por ciento, seguido por G4 con 67 por ciento, a pesar de que éste último en la prueba de sanidad no mostró porcentaje de infección.

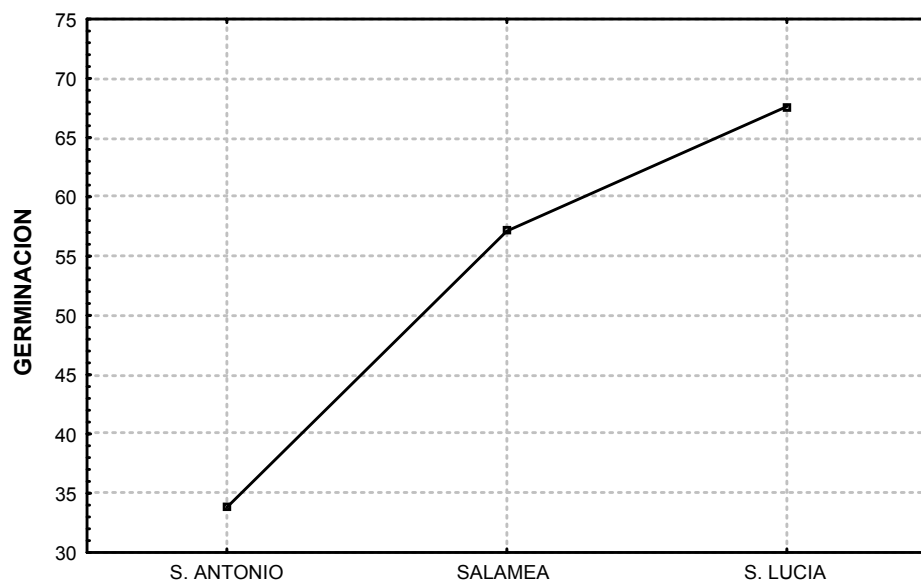


Figura 4.10 Comportamiento de la germinación en los genotipos G1,G2, G3 y G4 en tres localidades.

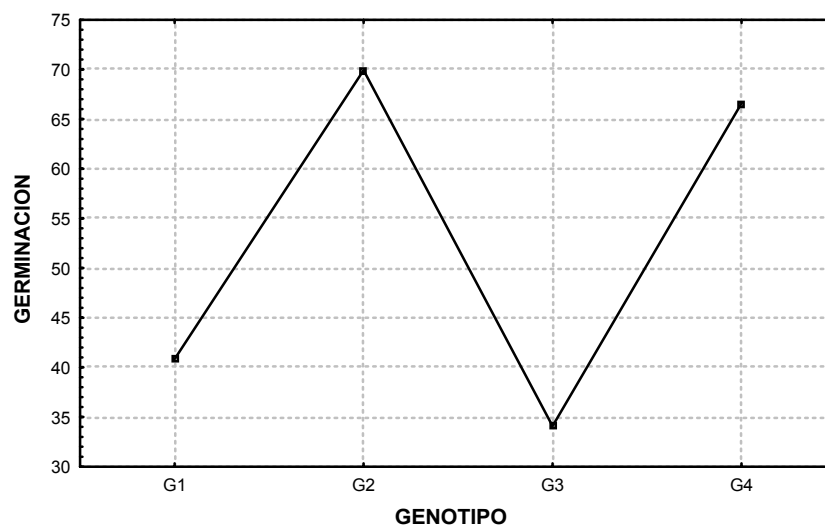


Figura 4.11 Comportamiento de la capacidad de germinación en campo de cuatro genotipos evaluados.

CONCLUSIONES

Con los resultados antes encontrados, se concluye lo siguiente:

- La mayor tasa de imbibición se presentó en los genotipos G1, G2, G3 y G4, sin embargo, esto no se reflejó en los mayores porcentajes de germinación y vigor.
- La presencia de infección por *Fusarium moliniforme* en la semilla en la mayoría de los genotipos evaluados afectó radicalmente su calidad fisiológica y su proliferación se relacionó con las concentraciones de las proteínas albúmina y globulina, siendo estas de tipo funcional, las cuales son importantes en el proceso de la germinación.
- Las concentraciones de zeína en endospermo y en embrión, están estrechamente relacionadas con el vigor principalmente con peso seco y longitud de plúmula por ser una proteína de tipo estructural.
- Altos valores de infección por *Fusarium moliniforme*, provoca una pérdida en la capacidad de germinación y vigor, así como una pobre emergencia

en campo bajo el método de siembra en seco, como lo muestran los genotipos G1 y G3.

- La determinación de proteína total por el método de macrokjeldahl, solo se relaciona con la concentración de zeína en la semilla entera, por lo que no proporciona una determinación confiable de todos los tipos de proteína analizadas en este estudio.

- La mayor similitud en las características evaluadas se tuvo entre los genotipos G10 y G11 con relación y al genotipo G2 quien fue el testigo.

RESUMEN

Se evaluaron nueve genotipos de maíz (ocho pertenecientes a la Empresa Monsanto, S. A. de C V. y uno a la competencia comercial) en sus atributos de calidad fisiológica (germinación y vigor), sanitaria y genética (tipos y cantidad de proteínas en las membranas celulares), así como la tasa de imbibición, con el fin de caracterizarlos, establecer una relación entre las variables evaluadas, similitud entre los genotipos y relacionarlos con su comportamiento en campo bajo los métodos de siembra en seco y húmedo.

Para la mayoría de las variables evaluadas se realizó un análisis de varianza bajo el diseño completamente al azar con cuatro repeticiones, excepto para el porcentaje de proteína total en semilla entera, endospermo y embrión donde solo se realizaron dos repeticiones. Adicionalmente se realizó un análisis de componentes principales con el fin de estudiar la relación entre variables y establecer la similitud entre los genotipos.

Los resultados indicaron que los genotipos G1, G2, G3 y G4 mostraron una tasa de imbibición más alta que el resto de los genotipos. Los genotipos G1 y G3 mostraron valores bajos de germinación inicial a las 24, 32 y 48 horas de imbibición, resultando más acentuada la disminución en el G3. Lo anterior también se reflejó en los bajos valores de vigor en los tiempos de imbibición

mencionados. Por otra parte, se reportaron valores altos de infección de *Fusarium moliniforme* en los genotipos G1 y G3, por lo que se asume que influyó en la expresión de la germinación y vigor de la semilla.

En la proteína total en semilla entera resultó con mayor valor el G11 (10.07%) y con el más bajo el G2 (8.32%). En la porción de endospermo se reafirmó el G11 (9.26%) como el de mayor contenido, mientras el G3 (6.6%) mostró lo contrario. En el embrión, resultó ser el genotipo G10 el de mayor valor (42.76%) y G9 el de menor valor (10.02%).

En la cantidad de albúmina en endospermo y embrión, el G13 presentó los mayores contenidos, así como el G11, quien reportó la mayor cantidad en el embrión. En cuanto a la globulina, destacaron los genotipos G11 y G13 con 0.78 y 0.79 mg/ml respectivamente, en tanto que el G12 en su cantidad en el endospermo fue de 0.19 mg/ml; mientras que en el embrión no se encontró diferencia. Los mayores contenidos de zeína se obtuvieron nuevamente en los genotipos G11 y G13 en semilla entera y el G2 en endospermo, así como estos mismos en el embrión. La glutelina se obtuvo en mayor cantidad en el G12 en semilla entera y en el embrión, en tanto que en el endospermo resultó con mayor contenido el G13.

El análisis de componentes principales señaló algunas relaciones interesantes entre la capacidad de germinación y el vigor, asociándolos positivamente con la concentración de glutelina y zeína en endospermo, y de

forma negativa con la infección por *Fusarium* y con las concentraciones de globulina y albúmina en semilla entera, así como de ésta última en el embrión.

La mayor similitud se observó entre los genotipos G2, G10 y G11, los cuales se diferenciaron mayormente de los genotipos G3 y G1; quienes mostraron menor germinación y vigor, mayor infección por *Fusarium moliniforme* y menor contenido de glutelina en general, lo cual se relacionó con la baja emergencia en campo bajo el método de siembra en seco.

LITERATURA CITADA

- Alcocer, E. B. 2000. Imbibición, atributos de calidad en semilla de trigo macarronero *Triticum furhidum* var. *durum* y su efecto sobre el cultivo. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coah. México.
- Association of Oficial Seed Analysts (AOSA) 1992. Seedling evaluation handbook. Contribution No. 35 The Handbook of oficial Seed. United Status of America. 76- 80 p.
- Association of Oficial Seed Analysts (AOSA) 1983. Seed vigor testing handbook. Contribution No. 32 The Handbook of oficial Seed. United Status of America. 88p.
- Baud S., J.M. M. Butin, L. Lepiniec and C. Rochat. 2002. An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. Plant Physiology and Biochemistry. 40:2:151-160.
- Besnier R.F.. 1989. Semillas, biología y tecnología. Ediciones Mundi-Prensa. 2da. Edición. Madrid, España. pp. 175-194.
- Bidwell, R. 1979. Fisiología Vegetal. AGT. S.A. 2da. Edición. México. pp. 227 - 286.
- Borgnia M., S. Nielsen, A. Engel and P. Agre. 2002. Cellular and Molecular Biology of the Aquaporin Water Channels. Biophysical Society. Departments of Biological Chemistry and Medicine, Johns Hopkins School of Medicine. Baltimore, Maryland. pp.21205-2185.
- Boyer R. 2000. Conceptos en Bioquímica. International Thomson Editores, S.A. de C.V., 1ª Edición. México pp. 92-97, 257-265.
- Bustamante G., L.A. 1995. Pruebas de vigor en semillas y sus aplicaciones. VII Curso de actualización en tecnología de semillas, Memorias. Buenavista, Saltillo Coah. México. 26-27 Octubre. p. 10-20.

- Champeil A., J. F. Fourbert and D. Rossignol. 2003. Influence of cropping system on *Fusarium* head blight and mycotoxin levels in winter wheat. *Crop Protection*, December 2003, 10.1016/S0261-2194(03)00277-1.
- Copeland L. and M. B. McDonald. 1985. Principles of seed science and technology. 2da. Edition Macmillan Publishing Company. Minneapolis, Minnesota. New Cork, N.Y. p. 63-75.
- D'Antonino F. L. R. 1993. Manual de manejo poscosecha de granos a nivel rural. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación FAO. Editor, Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. Santiago, Chile. Capitulo I. pp.
- De la Fuente A., J. L. Snoep, H. V. Westerhoff, and P. Mendes. 2002. Metabolic control in integrated biochemical systems. *Eur. Journal Biochemistry*. 269, 4399-4408.
- De la Torre, V. J. D. 1992. Descripción y mantenimiento varietal en variedades de frijol. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México.
- Dupont F.M. and S.B. Altenbach. 2003. Molecular and biochemical impacts of environmental factors on wheat grain development and protein synthesis. *Journal of Cereal Science*. 38(2):133-146.
- Ezeagu I.E., J.K. Petzke, C.C. Metges, A.O.Akinsoyinu and A.D. Ologhobo. 2002. Seed protein contents and nitrogen-to-protein conversion factors for some uncultivated tropical plant seeds. *Food Chemistry*. 77(2):105-109.
- FAO. 2003. <http://faostat.fao.org/default.jsp?language=ES>.
- Ferguson, J. 1995. An Intruduction to seed vigour testing. In *Seed Vigour Testing Seminar*; Copenhagen. (Proceedings.) Zurich: International Seed Testing Association. p. 1-9.
- Forato L. A., L.A. Colnago, R.C. Garratt and M.A. Lopes. 2000. Identification of free fatty acids in maize protein bodies and purified α -zeins by ^{13}C and ^1H nuclear magnetic resonance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/ Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1543(1):106-114.
- Garay, A. E. 1989. La calidad de la semilla y sus componentes. En: *Memorias del primer curso avanzado sobre sistemas de semillas para pequeños agricultores*. CIAT. Cali, Colombia. pp.2-11.

- Goodman, B. E. 2002. Transport of small molecules across cell membranes: Water channels and urea transporters. *Biophysical Journal*. 83(1):154-160.
- Hampton, J.G. 2001. *Revista Seed News* Septiembre/Octubre volumen 5 número 5.
- Johnson, R.A. and D.W. Wichern. 1988. *Applied multivariate statistical analysis*. Second edition. Ed. Prentice Hall. New Jersey. USA. 607p.
- Hojilla- Evangelista, Mila P., Johnson, Lawrence A. 2003. Optimizing extraction of zein and glutelin-rich fraction during sequential extraction processing of corn. *Cereal Chemistry* 80(4):481-484.
- Internacional Seed Testing Association. (ISTA) 1996. *Internacional Rules for Seed Testing*. Rules 1996. *Seed Sci. Technol.* 13(2): 299-355.
- Koslowski, T. T. 1972. *Seed biology* . Academy press. U.S.A. Vol. 1 p.232.
- Kuo Yu-Haey, P. Rozan, F. Lambein, J. Frias, C. Vidal-Valverde. 2003. Effects of different germination conditions on the contents of free protein and non-protein amino acids of comercial legumes. *Food Chemistry*. 10.1016/S0308-8146(03)00521-1.
- Larsen, A. 1967. Electrophoretic differences in seed proteins among varieties of soybean, *Glycine max* (L.) Merrill. *Crop. Sci.* 7:311-313.
- Lowry, O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.*;193: 265-275.
- Luengo L. 2001. <http://www.arrakis.es/~lluengo/membrana.html>
- Luque, A.; Biasoli M.; Álvarez D. 1995. Aumento de la incidencia de micosis superficiales producidas por hongos del género *Fusarium*. *Revista Iberoamericana de Micología*. 12:65-67.
- Manly, B.F.J. 1986. *Multivariate statistical methods: A primer*. Ed. Chapman and Hall. London. 160p.
- Moreno, M. E. 1996. *Análisis físico y biológico de semillas agrícolas*. 3ª. Edición. Instituto de Biología. UNAM. México. D.F. pp.113-119, 237.
- Neergaard, P. 1977. *Seed Phathology*, Vol I and II. John Wiley & Sons, New York.

- Nicanuzia D.P.J., C.V. Ferreira and H. Aoyama. 2003. Acid phosphatase activities during the germination of *Glycine max* seeds. Plant Physiology and Biochemistry. 10.1016/S0981-9428(03)00201-8.
- Ortiz, L. 1992. Extracción y caracterización de las prolaminas del grano de seis cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). Arch. Latinoamer. Nutr. 42(1):46-51.
- Palmlblad M., M. Ramström, E.K. Markides, P. HaKasson and J. Bergquist. 2002. Prediction of chromatographic and protein identification in liquid chromatography/mass spectrometry. The Ångström Laboratory, Division of Ion Physics, Box 534, and Institute of Chemistry, Department of Analytical Chemistry, Box 531, Uppsala University, SE-751 21 Uppsala, Sweden.
- Parra, P. 1990. Caracterización de híbridos venezolanos de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), Prosevenca 5, Criollo 1, Chaguaramas 3 y sus parentales, mediante la aplicación de electroforesis discontinua en gel de poliacrilamida y sus estudios morfológicos. Tesis Maestría. Maraca y Venezuela. Universidad Central. Facultad de Agronomía. 89 p.
- Parra, P. y Ortiz L. 1993. Montaje de un método electroforético para la identificación de cultivares de maíz. Rev. Fac. Agron. U.C.V. 19(3):213-226.
- Perry, D. A. 1977. A vigor test for seeds of barley (*Hordeum vulgare*) based on measurement of plumule growth. Seed Science and Techology 5, 709-719.
- Perry, D. A. 1987. Introduction: methodology and application of vigour tests: Growth and evaluation tests: Topographical Tetrazolium test. ISTA. Handbook of vigour tests methods. 2a. Edición. Zurich, Switzerland. p.72
- Popinigis, F. 1985. Fisiología de semente. AGIPLAN 2da. Edición. Brasilia. D.F. p.40-70.
- Saenz P. 2004. Hipertextos del área de biología. Universidad Nacional del Noreste, Facultad de Agroindustrias, Facultad de Ciencias Agrarias, Corriente República de Argentina. <http://www.biologia.edu.ar>
- SAS Institute Inc. 1989. SAS/STAT User' s Guide. Version 6, fourth Edition. SAS Institute Inc., Cary, N. C.
- Sattar R., S. Abid Ali, M. Kamal, K. A. A. and A. Abbasi. 2004. Molecular mechanism of enzyme inhibition: Predication of the tree-dimensional structure of the dimeric trypsin inhibitor from *Leucaena leucocephala* by

- homology modelling. Biochemical and Biophysical Research Communications. 10. 1016/S0006-291X(03)02791-8.
- Singer S.J. & Nicholson G.L. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science. 175, 720-731.
- Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS). 1980. Normas para la Certificación de Semillas. Secretaria de Agricultura y Ganadería Dirección General de Agricultura. México. p. 66 y 67.
- Statistica. 1994. Statistica for windows ver 4.5 StatSoft, Inc. Tulsa, Ok. USA.
- Steel, G.D. and J.H. Torrie. 1980. Principles and procedures of statistics. McGraw-Hill, New York. USA.
- Suga S., S. Komatsu and M. Maeshima. 2002. Aquaporin isoforms responsive to salt and water stresses and phytohormones in radish seedlings. Laboratory of Cell Dynamics, Graduate School of Bioagricultural Sciences. Nagoya University, Nagoya Japan. pp. 464-8601.
- Taiz L. and E. Zeiger. 1997. Plant Physiology. The Benjamin/Cummings Publishing Company. Inc. Redwood City. California, USA. pp.
- Tesar, M.B. 1988. Physiological basis of crop growth and development. Madison, Wisconsin. pp. 73-75.
- Thomson, J. R. 1979. An introduction to seed technology. Thomson Litho Ltd. Great Britain. p. 1-15.
- Tieleman D. P. and J. Bentz. 2002. Molecular Dynamics Simulation of the Evolution of Hydrophobic Defects in One Monolayer of a Phosphatidylcholine Bilayer: Relevance for Membrane Fusion Mechanisms. Biophysical Journal. p. 83(3):1501-1510.
- Valdez R. 2002. <http://usuarios.arnet.com.ar/ricardovald/gliadins.htm>
- Vaz, A. C., M.J.M.N. Pinheiro and C.P.P. Ricardo. 2003. Cultivar discrimination of Portuguese *Lupinus albus* by seed protein electrophoresis: The importance of considering "glutelins" and glycoproteins. Field Crops Research. 10.1016/S0378-4290(03)00205-3.
- Wang J. F., P.H. Geil, D.R. Kolling and G.W. Padua. 2003. Analysis of zein by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51 (20):5849-5854.
- Weaver, R. J. 1980. Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. Ed. Trillas. México. D.F. p.322.

Zhu F., E. Tajkhorshid and K. Schulten. 2001. Pressure-induced water transport in membrane channels studied by molecular dynamics. *Journal Biology Chemistry*. 276(39):36543-36.

APENDICE

Cuadro A.1 Comparación de bandas para albúmina en semilla entera del testigo con los genotipos G1, G3, G4, G9, G10, G11, G12 y G13

TESTIGO PM (KD)	GENOTIPO							
	G1	G3	G4	G9	G10	G11	G12	G13
66.0	+	-	+	+	+	+	+	+
58.8	+	+	-	-	+	+	-	+
52.1	-	+	-	+	+	+	-	-
50.0	+	+	+	-	-	-	-	+
24.5	+	+	+	+	+	+	+	+
18.9	+	-	+	-	-	+	+	+
13.0	+	+	+	+	+	-	-	-

PM = Fracción de polipéptidos medido en su peso molecular expresado en Kilo Daltons.
(+) = Banda presente, (-) = Banda ausente.

Cuadro A.2 Comparación de bandas para albúmina en endospermo del testigo con los genotipos G1, G3, G4, G9, G10, G11, G12 y G13.

TESTIGO PM (KD)	GENOTIPO							
	G1	G3	G4	G9	G10	G11	G12	G13
66.0	+	+	+	+	+	+	-	-
58.8	+	+	+	+	+	+	+	+
52.1	+	+	+	+	+	+	-	-
50.0	-	+	-	-	-	-	-	+
37.05	+	+	+	-	+	+	+	+
20.0	+	+	+	+	+	+	+	+
15.9	+	-	-	-	+	+	+	+

PM = Fracción de polipéptidos medido en su peso molecular expresado en Kilo Daltons.
(+) = Banda presente, (-) = Banda ausente.

Cuadro A.3 Comparación de corridas en albúmina para semilla entera, endospermo y embrión.

GEN	BSE (#)	BEND (#)	BEMBR (#)	BCE (#)	BCSE	BCEN	BCEM
G1	6	7	7	4	1, 2, 4, 5	1, 2, 3, 4, 5	1, 3, 4, 5
G2	7	7	8	4	1, 2, 3, 4, 5	2, 3, 4, 5	1, 2, 3, 5
G3	8	7	7	2	2, 3, 4, 5	2, 3, 4, 5	1, 2, 4, 5
G4	9	6	9	6	1, 2, 4, 5	1, 2, 3, 5	1, 2, 3, 4, 5
G9	7	8	9	5	1, 3, 4, 5	1, 3, 4	1, 3, 4, 5
G10	6	7	8	4	1, 2, 4, 5	1, 2, 4, 5	1, 2, 3, 4
G11	7	7	7	4	1, 2, 4	1, 2, 4, 5	1, 2, 4, 5
G12	5	7	7	4	1, 4, 5	1, 4, 5	1, 4, 5
G13	6	7	6	1	1, 2, 4, 5	3, 5	1, 2, 4, 5

BSE = Número de bandas en semilla entera.

BEND = Número de bandas en endospermo.

BEMBR = Número de bandas en embrión.

BCE = Número de bandas que coinciden entre la semilla entera, endospermo y embrión.

BCSE = Bandas que coinciden de la semilla entera con las bandas de seroalbúmina (proteína patrón).

BCEN = Bandas que coinciden de el endospermo con las bandas de seroalbúmina (proteína patrón).

BCEM = Bandas que coinciden de el embrión con las bandas de seroalbúmina (proteína patrón).

Cuadro A.4 Comparación de bandas para albúmina en embrión del testigo con los genotipos G1, G3, G4, G9, G10, G11, G12 y G13.

TESTIGO PM (KD)	GENOTIPO							
	G1	G3	G4	G9	G10	G11	G12	G13
69.0	-	+	+	+	+	-	+	-
66.0	+	-	+	+	-	+	-	+
58.8	+	+	+	+	+	+	+	-
52.1	+	-	-	+	+	-	-	+
38.2	+	+	+	-	+	+	-	+
24.5	+	+	+	-	+	+	+	+
15.9	+	+	+	+	-	+	+	+
13.0	-	+	+	+	+	+	+	+

PM = Fracción de polipéptidos medido en su peso molecular expresado en Kilo Daltons.

(+) = Banda presente, (-) = Banda ausente.

Cuadro A.5 Comparación de bandas para globulina en endospermo del testigo con los genotipos G1, G3, G4, G9, G10, G11, G12 y G13.

TESTIGO PM (KD)	GENOTIPO							
	G1	G3	G4	G9	G10	G11	G12	G13
66.0	-	+	+	+	+	+	+	+
60.0	+	+	+	-	-	+	+	-
55.8	+	+	-	+	+	-	+	-
41.25	+	-	+	+	+	+	+	+
37.0	+	+	-	-	+	+	+	+
25.8	-	+	+	-	+	+	-	+

PM = Fracción de polipéptidos medido en su peso molecular expresado en Kilo Daltons.
(+) = Banda presente, (-) = Banda ausente.

Cuadro A.6 Comparación de bandas para globulina en embrión del testigo con los genotipos G1, G3, G4, G9, G10, G11, G12 y G13.

TESTIGO PM (KD)	GENOTIPO							
	G1	G3	G4	G9	G10	G11	G12	G13
66.0	+	+	+	+	+	+	+	+
60.0	-	-	-	+	+	+	+	+
55.8	+	+	+	+	+	-	-	-
41.25	-	-	-	+	+	+	+	+
35.5	-	-	+	-	-	+	+	+
20.5	+	-	+	+	+	+	-	+
13.0	-	-	-	+	-	+	+	+

PM = Fracción de polipéptidos medido en su peso molecular expresado en Kilo Daltons.
(+) = Banda presente, (-) = Banda ausente.

Cuadro A.7 Comparación de bandas para zeína en semilla entera del testigo con los genotipos G1, G3, G4, G9, G10, G11, G12 y G13.

TESTIGO PM (KD)	GENOTIPO							
	G1	G3	G4	G9	G10	G11	G12	G13
63.0	+	+	+	+	+	+	+	+
60.0	+	+	+	+	-	+	+	-
54.0	-	+	-	-	+	+	-	+
25.0	-	-	-	+	+	+	+	+
23.0	+	+	+	+	+	+	+	+
20.3	+	+	+	+	+	+	+	+

PM = Fracción de polipéptidos medido en su peso molecular expresado en Kilo Daltons.
(+) = Banda presente, (-) = Banda ausente.

Cuadro A.8 Comparación de bandas para zeína en endospermo del testigo con los genotipos G1, G3, G4, G9, G10, G11, G12 y G13.

TESTIGO PM (KD)	GENOTIPO							
	G1	G3	G4	G9	G10	G11	G12	G13
63.0	+	+	+	-	+	-	+	+
60.0	-	-	-	+	+	-	-	-
54.0	+	-	+	+	-	+	+	+
25.0	-	+	+	+	+	+	+	+
23.0	+	+	+	+	+	+	+	+
20.3	+	+	+	+	+	+	+	+

PM = Fracción de polipéptidos medido en su peso molecular expresado en Kilo Daltons.
(+) = Banda presente, (-) = Banda ausente.

Cuadro A.9 Comparación de bandas para zeína en embrión del testigo con los genotipos G1, G3, G4, G9, G10, G11, G12 y G13.

TESTIGO PM (KD)	GENOTIPO							
	G1	G3	G4	G9	G10	G11	G12	G13
54.0	+	+	+	+	+	+	+	+
25.0	-	-	+	+	-	-	-	-
23.0	+	+	+	+	+	+	+	+
20.3	+	+	+	+	+	+	+	+

PM = Fracción de polipéptidos medido en su peso molecular expresado en Kilo Daltons.
(+) = Banda presente, (-) = Banda ausente.

Cuadro A.10 Comparación de bandas para glutelina en semilla entera del testigo con los genotipos G1, G3, G4, G9, G10, G11, G12 y G13.

TESTIGO PM (KD)	GENOTIPO							
	G1	G3	G4	G9	G10	G11	G12	G13
63.0	+	-	-	-	-	+	-	+
60.0	+	+	+	+	+	+	+	+
25.0	+	+	+	+	+	+	+	+
15.5	-	-	+	+	-	-	-	-
13.0	-	+	+	+	+	+	+	+

PM = Fracción de polipéptidos medido en su peso molecular expresado en Kilo Daltons.
(+) = Banda presente, (-) = Banda ausente.

Cuadro A.11 Comparación de bandas para glutelina en endospermo del testigo con los genotipos G1, G3, G4, G9, G10, G11, G12 y G13.

TESTIGO PM (KD)	GENOTIPO							
	G1	G3	G4	G9	G10	G11	G12	G13
63.0	-	-	-	-	-	-	+	+
60.0	+	-	-	-	+	-	+	+
25.0	+	-	+	+	+	-	-	-
15.500	-	+	+	+	-	+	-	+
13.000	+	+	+	+	+	+	-	+

PM = Fracción de polipéptidos medido en su peso molecular expresado en Kilo Daltons.
(+) = Banda presente, (-) = Banda ausente.

Cuadro A.12 Comparación de bandas para glutelinas en embrión del testigo con los genotipos G1, G3, G4, G9, G10, G11, G12 y G13.

TESTIGO PM(KD)	GENOTIPO							
	G1	G3	G4	G9	G10	G11	G12	G13
63.0	+	+	+	+	+	+	+	+
60.0	-	-	-	-	-	+	+	-
25.0	-	-	+	+	-	+	+	-
15.5	+	-	-	+	-	+	-	-
13.0	-	+	+	+	+	-	+	-

PM = Fracción de polipéptidos medido en su peso molecular expresado en Kilo Daltons.
(+) = Banda presente, (-) = Banda ausente.