

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS



**DINÁMICA DE LOS CARBOHIDRATOS NO-ESTRUCTURALES EN
EL TALLO DE MESTIZOS DE MAÍZ Y SUS CARACTERÍSTICAS
AGRONÓMICAS**

**POR:
OLAT MORENO MENDOZA**

**TESIS
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

INGENIERO AGRÓNOMO

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

ABRIL DE 2014

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS

TESIS DEL C. OLAT MORENO MENDOZA ELABORADA BAJO LA
SUPERVISIÓN DEL COMITÉ PARTICULAR DE ASESORÍA Y APROBADA
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

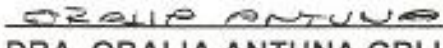
INGENIERO AGRÓNOMO

APROBADO POR:

ASESOR
PRINCIPAL


DR. ARMANDO ESPINOZA BANDA

ASESOR


DRA. ORALIA ANTUNA GRIJALVA

ASESOR


ME. VÍCTOR MARTÍNEZ CUETO

ASESOR


DR. JESÚS VÁSQUEZ ARROYO

**COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE
CARRERAS AGRONÓMICAS**


DR. FRANCISCO JAVIER SÁNCHEZ RAMOS



Coordinación de la División de
Carreras Agronómicas

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

ABRIL DE 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"
UNIDAD LAGUNA


DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS

TESIS DEL C. CIRILO ALTUNAR ÁLVAREZ QUE SE SOMETE A LA
CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO EXAMINADOR, COMO REQUISITO
PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:


INGENIERO AGRÓNOMO

APROBADO POR:

PRESIDENTE


DR. ARMANDO ESPINOZA BANDA


VOCAL


DR. ORALIA ANTUNA GRIJALVA

VOCAL


M.G. JOSÉ LUIS COYAC RODRIGUEZ

VOCAL
SUPLENTE


DR. JESÚS VASQUEZ ARROYO

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE
CARRERAS AGRONÓMICAS


DR. FRANCISCO JAVIER SÁNCHEZ RAMOS



Coordinación de la División de
Carreras Agronómicas

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

ABRIL DE 2014

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**, por darme la oportunidad de ser parte de su comunidad estudiantil, formarme como profesionista y darme techo, comida y apoyo económico para solventar mi estancia.

A mis **Asesores de tesis**: Doctores; Armando Espinoza-Banda, Arturo Palomo-Gil (†), Jesús Vásquez-Arroyo, Oralia Antuna Grijalva y al MC. Víctor Martínez Cueto. Por su apoyo, sugerencias y dedicación a esta tesis, y a su alta disponibilidad en la formación de recursos humanos.

Al **Dr. Axel Tiessen Favier**, por la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, las facilidades brindadas durante mis prácticas profesionales y apoyo económico. Así como la facilitación del material genético evaluado en esta tesis y su disponibilidad en la formación de recursos humanos.

Al personal que integra el **Laboratorio de Metabolómica y Fisiología Molecular** del CINVESTAV IPN Unidad Irapuato, por su apoyo en el análisis de laboratorio. A la MC. Sheila Juárez Colunga, por su tiempo y dedicación en mi preparación.

A mis **Profesores de la UAAAN**, en especial a la Dra. Ma. Teresa Valdez Perezgasga, Dr. Alejandro Moreno Reséndez y al Ing. Heriberto Quirarte Ramírez. Por sus enseñanzas y consejos durante mi estancia en la universidad.

A mis **amigos y compañeros** de la UAAAN, por su apoyo incondicional en el desarrollo de esta tesis en las actividades de campo: Manuel de Jesús, Juan, Moisés, Joel (†), Tomás, Cirilo, Luis Alberto, Víctor Hugo, Julio, José Luis y Felipe.

A todos **mis compañeros** de la UAAAN, XIII generación de ING. AGRONOMO, por compartir toda mi estancia en esta región lagunera y brindarme su amistad.

A toda mi familia:

Mis **padres**, Bertín Moreno Hernández y Marina Mendoza Santos por darme la vida y aconsejarme durante toda mi vida, estar conmigo en las buenas y malas, por enseñarme hacer de mí una buena persona.

Hermanos: Ofelia, Bibiana, Pedro, José y Anastasio, por su apoyo, consejos y por todos los momentos que hemos compartidos, los llevare siempre presente. Tíos (as), cuñados (as), primos (as) y sobrinos (as) por formar parte de esta gran familia.

Al personal de CCC CINCINNATI SEEDS, quienes me han apoyado e impulsado para salir adelante, Ing. José Luis Miranda, Mary, Alex y Julio.

A todas las personas que de una u otra forma hacen posible este logro tan importante para mí, ¡mil gracias!

DEDICATORIA

A **dios**, por permitir e iluminar mi camino, colmar de bendiciones mi vida y mostrarme lo valioso de la vida.

A **mis padres, hermanos**. En especial a mis abuelitos: Francisco Mendoza Ávila (†), Eleuterio Moreno Tornés (†) y Petra Hernández Gutiérrez (†), que en paz descansen, siempre los llevare presente en mi mente.

A **mis amigos**: Héctor (cole), Jorge Luis (jito), Santa Cruz (cucho), Uri, Julio (potra), Edson, Ana Patricia, Carolina, Keyla, Ely, Betty, Alma Nuri, Trinidad, David, Aris, Saray, Yare, Olga, Coreici, Ale (perra), Zenón (Fredy), Yonni, Bladimir, Carlos (lica), Antonio Carlos (toño), Gerónimo (burra), José Alfredo (pepe), Antonio (el gringo), Edilberto, Miguel ángel, José Alfredo, Gladis, María Elena, Carlos (armadillo), Estefanía (fanny), Karen, Ania, Sandy, Jesús Eymar, Adrián, Claudio, Lorenzo Antonio (lencho), José Luis (bochudo), Jacinto, Ganesa, Chavo, Joaquín y Willo, por formar parte y compartir momentos grandiosos de nuestras vidas (quizás si llegué a omitir a alguien, mil disculpas, me fallo la memoria en este momento).

A **mis compañeros y amigos** del CBTA 191, generación 2004 – 2007, por el tiempo, clases y anécdotas compartidas, momentos inolvidables, siempre los recordaré, y éxito donde quiera que estén.

Para mi novia, la persona más maravillosa que llego a mi vida en el momento que más la necesitaba, mi amorcito Aracely Tacuba, te amo mi vida. Llegaste para impulsarme a salir adelante, terminar con lo inconcluso y fortalecer mi mente y alma, eres mi motor, por lo que cada día tiene un nuevo sentido, le diste un giro completamente a mi vida y eso me encanto mi amor. Juntos alzaremos el vuelo, para conquistar nuevos horizontes, triunfos y sueños...

RESUMEN

Con el objetivo de caracterizar y seleccionar los genotipos de diferente origen, por su adaptación, características agronómicas y bioquímicas en base a su potencial de rendimiento de grano y posibles fines de interés forrajero. En el verano 2011 se evaluaron en el campo experimental de la UAAAN-UL, 48 genotipos, 37 mestizos provenientes del programa CIMMYT-CINVESTAV (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo – Centro de Investigación y Estudios Avanzados) y 11 testigos de los cuales 3 fueron híbridos comerciales. El diseño experimental consistió en una distribución de tratamientos en Alpha Látice con 20 bloques y 10 tratamientos por bloque, con dos repeticiones; la parcela experimental fue de 5m de largo y 0.75m entre surcos a una distancia entre planta y planta de 0.20m, donde en primer lugar fueron 100 genotipos, entre los cuales sólo se seleccionaron 48 para este trabajo. Se realizó la extracción de jugo de tallo (anexo 8.3), por lo cual se seleccionaron al azar 2 plantas por cada parcela, para dar un total de 4 plantas por tratamiento (cuatro repeticiones). Se colectó 1mL de jugo y se congeló con hielo seco para su posterior análisis de carbohidratos no-estructurales en el laboratorio de Metabolómica y Fisiología Molecular del CINVESTAV Unidad Irapuato. Además se tomaron datos agronómicos, tales como altura de planta (AP) y mazorca (AMz), floración femenina (FF) y masculina (FM), cobertura de mazorca (COB), rendimiento de grano (REN), longitud de mazorca (LMz), número de hileras (NH) y granos por hilera (NGH), diámetro de mazorca (DMz) y permanencia en verde (SG). Se realizó el análisis estadístico con el paquete SAS V9.0, los datos se sometieron a un análisis de ANOVA, Correlación mediante el método de Pearson y la prueba de medias por Tukey. Las diferencias de los mestizos fueron más acentuadas en 8 de las 15 características evaluadas inclusive, rendimiento de grano. Los valores altamente significativos ($p < 0.01$), muestran que los carbohidratos no-estructurales fueron totalmente diferentes entre sí, en todos los genotipos. La glucosa se presentó en mayor cantidad $27\mu\text{mol/L}$ en los genotipos con respecto a la fructosa $14\mu\text{mol/L}$, aunque con la misma tendencia, esto debido a su correlación positiva (0.69). La sacarosa se observó en mayor cantidad en todos los genotipos con respecto a las hexosas $48\mu\text{mol/L}$ aunque presento la misma tendencia, excepto algunos genotipos pero no hubo diferencias acentuadas. Para el caso del almidón, los niveles bajos ($0.08\mu\text{mol/L}$) obtenidos en la cuantificación son debido a la degradación de este importante polisacárido de reserva para satisfacer las necesidades

en el llenado de grano, presentó una baja correlación con sacarosa solamente (0.24). Los genotipos seleccionados por rendimiento también presentaron buen nivel de carbohidratos no estructurales, caracterizándose por una alta correlación en los azúcares solubles (0.69), excepto para el almidón quien presenta una baja correlación con sacarosa (0.24). Además presenta buenas características agronómicas, lo que valió para el rendimiento final. Con los datos obtenidos se concluye que la relación que existe entre el rendimiento de grano y la características cualitativas, pueden asociarse, dependientes del genotipo y las condiciones donde se desarrollan.

Palabras clave: Azúcares solubles, hexosas, almidón, sacarosa, rendimiento de grano.

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA.....	ii
RESUMEN	iii
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	v
ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivos	2
1.2 Hipótesis.....	2
1.3 Metas.....	2
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Mejoramiento genetico.....	3
2.1.1 Heterosis.....	4
2.1.2 Híbrido simples.....	4
2.1.3 Híbridos dobles.....	4
2.1.4 Híbridos Triples.....	5
2.1.5 Cruzas dialélicas.....	5
2.1.6 Los mestizos o cruza de prueba.....	5
2.2 Perspectivas actuales.....	6
2.3 Fotosíntesis.....	6
2.3.1 Carbohidratos no estructurales.....	9
2.3.2 Sacarosa.....	10
2.3.2.1 Síntesis de sacarosa en el citosol.....	10
2.3.3 Almidón.....	10
2.3.3.1 Almidón de reserva.....	11
2.3.3.2 Almidón transitorio.....	12
2.3.4 Relación fuente-sumidero (sink-source).....	13
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15

3.1. Localización.....	15
3.2 Material genético.....	15
3.3 Diseño experimental.....	15
3.3.4 Manejo agronómico.....	17
3.4.1 Preparación de terreno.....	17
3.4.2 Siembra.....	17
3.4.3 Riegos.....	17
3.4.4 Fertilización.....	17
3.4.5 Control de plagas.....	17
3.4.6 Control de Malezas.....	18
3.5 Características agronómicas evaluadas.....	18
3.5.1 Floración masculina (FM).....	18
3.5.2 Floración femenina (FF).....	18
3.5.3 Altura de planta (AP).....	18
3.5.4 Altura de mazorca (AM).....	18
3.5.5 Cobertura de mazorca (COB).....	19
3.5.6 Permanencia en verde (Stay Green).....	19
3.5.7 Cosecha.....	19
3.5.7.1 Longitud de mazorca (LMz).....	19
3.5.7.2 Numero de hileras (NH).....	19
3.5.7.3 Numero de granos/hilera (NGH).....	20
3.5.7.4 Diámetro de mazorca (DMz).....	20
3.5.7.5 Peso de campo (REN).....	20
3.6 Determinación de carbohidratos no estructurales.....	20
3.6.1 Azúcares solubles.....	20
3.6.1 Almidón.....	22
3.7 Análisis estadísticos.....	23
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
4.1 Carbohidratos no estructurales.....	24
4.1.1 Hexosas (Glucosa y Fructuosa).....	30
4.1.2 Sacarosa (SUC).....	30

4.1.3 Almidón (ALM).....	31
4.2 Características Agronómicas.....	32
4.2.1 Floracion masculina (FM).....	35
4.2.2 Floracion femenina (FF).....	35
4.2.3 Altura de Planta (AP).....	35
4.2.4 Altura de mazorca (AMz).....	35
4.2.5 Cobertura de Mazorca (COB).....	35
4.2.6 Permanencia en verde (<i>Stay Green</i>).....	36
4.2.7 Longitud de mazorca (LMz).....	36
4.2.8 Número de hileras (NH).....	36
4.2.9 Número de granos/hilera (NGH).....	36
4.2.10 Diámetro de mazorca (DMz).....	36
4.2.11 Rendimiento (REN).....	37
V. CONCLUSIONES.....	40
VI. LITERATURA CITADA.....	41
VII. APENDICE.....	47
VIII. ANEXOS.....	49

INDICE DE CUADROS

Cuadro 3.1 Genealogía de mestizos generados por los probadores CML 495 y CML 496.....	16
Cuadro 3.2 Genealogía de los testigos utilizados en el ensayo	16
Cuadro 4.1 Análisis de varianza, significancia estadísticas y coeficiente de variación (CV) para las variables evaluadas en los genotipos de maíz en el periodo de verano 2011	33
Cuadro 4.2 Valores medios de mestizos y testigos sobresalientes. UAAAN-UL...	34

INDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Fijación de CO ₂ por la planta de maíz	7
Figura 2. 2 Metabolismo del Carbono en las hojas de las plantas	8
Figura 3.1 Sistema de Enzimas Acopladas para determinar el contenido de hexosas y sacarosa.....	20
Figura 4. 1 Niveles de glucosa en el tallo de mestizos de maíz, en el estado del grano lechoso-masoso, a 80 dds	25
Figura 4.2 Niveles de fructosa en el tallo de mestizos de maíz, en el estado del grano lechoso-masoso, a 80 dds	26
Figura 4.3 Niveles de sacarosa en el tallo de mestizos de maíz, en el estado del grano lechoso-masoso, a 80 dds	28
Figura 4.4 Niveles de almidón en el tallo de mestizos de maíz, en el estado del grano lechoso-masoso, a 80 dds	29

I. INTRODUCCIÓN

En la Comarca Lagunera, el maíz es de suma importancia económica por ser una de las cuencas lecheras más grandes e importantes de México (Figuroa, *et al.*, 2001), es por eso que la producción de maíz para granos y forrajes bajo condiciones de riego ocupa un lugar importante, debido a su alta eficiencia en el uso del agua en comparación con el cultivo de alfalfa, que comúnmente es utilizado en esta región, pero su demanda de agua es superior. A la vez, el maíz resulta eficiente en la producción de materia seca por hectárea, por lo que se le considera como un forraje alternativo. La magnitud de este sistema de producción plantea la necesidad de estrategias para la producción de forraje para la manutención del ganado, con menor uso del recurso hídrico. Sin embargo existe el debate, en lo que se refiere a si los híbridos de maíz desarrollados para grano, también son apropiados para la producción de forrajes, en algunos casos se ha observado una relación positiva entre el rendimiento de grano y la producción de forrajes (Vattikonda y Hunter, 1983) pero no siempre es así. Los rendimientos que se pueden obtener varían según el híbrido, fertilidad del suelo, edad de corte y la densidad de siembra, entre otros factores, normalmente los híbridos de porte alto son los de mayor rendimiento de biomasa (Aldrich y Leng 1974). La falta de híbridos para la Comarca Lagunera, representa un problema actual, pues no existe un programa de mejoramiento permanente en esta región, donde predominan híbridos introducidos y, que en general se utilizan para producción de grano (Espinoza *et al.*, 2003). Es por ello, que existe la necesidad de contar con un mayor número de genotipos de maíz superiores en potencial de producción y adaptación a la región, además de contar con mejores características cualitativas. Además de las características agronómicas y rendimiento, cuantificar los carbohidratos no-estructurales (CNE) presentes en el tallo del maíz y su dinámica, será una herramienta útil para la selección de maíces de calidad.

1.1 Objetivos

General

Caracterizar y seleccionar los genotipos, por adaptación, características agronómicas y, potenciales de rendimiento de grano y forraje.

Cuantificar el perfil y dinámica de los carbohidratos No-estructurales.

Relacionar características agronómicas y rendimiento de grano y forraje con los carbohidratos de carbono no-estructurales.

Específicos

- Evaluar sus características agronómicas.
- Cuantificar el contenido de Carbohidratos no-estructurales (azúcares: Glucosa, fructosa y sacarosa) en el jugo del tallo.
- Cuantificar el contenido de almidón en el jugo del tallo.

1.2 Hipótesis

Ho: Los genotipos actúan de manera diferente; bioquímica y agronómicamente, determinado por el ambiente donde se desarrollan y su origen genético.

Ha: Los genotipos actúan de manera similar; bioquímica y agronómicamente.

1.3 Metas

- Identificar los materiales con mejores características agro-morfológicas.
- Identificar los materiales más sobresalientes para rendimiento de grano y forraje.
- Detectar los genotipos con mejor combinación de carbohidratos no-estructurales.
- Incorporar los mejores genotipos a un programa de mejoramiento genético.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

El maíz es uno de los tres primeros cereales más importante a nivel mundial después del arroz y el trigo (FAO, 2001), con una producción mundial de 751 millones de toneladas, superando a estos en producción en el 2008 (FAO, 2009). La producción de maíz se destina predominantemente al consumo humano y, en menor medida, pero con volúmenes crecientes a lo largo de los años para el consumo pecuario e industrial (Andow *et al.*, 2004), y proporciona como fuente básica de alimento a la población, cerca de la mitad de las calorías requeridas, (Morris y López 2000). El maíz además, es materia prima de actividades industriales, en cuyos procesos hacen posible la ocupación de un buen número de trabajadores, sin tomar en cuenta los que directamente laboran en el campo en la producción del grano.

2.1 Mejoramiento genético

El mejoramiento genético del maíz ha evolucionado a través del tiempo por selección natural, selección aplicada por los agricultores-mejoradores durante miles de años y, por los mejoradores profesionales en los últimos 150 años. El mejoramiento genético de maíz en México en el trópico húmedo, tiene sus inicios en 1943 donde organismos antecesores del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, han tenido como objetivo fundamental generar variedades, híbridos y sintéticos de alto potencial de rendimiento y adaptación. Los enfoques y metodologías de investigación utilizados por el programa se han adecuado a través del tiempo y han permitido obtener ganancias en rendimiento e incorporar características agronómicas favorables (Sierra *et al.*, 2005).

Existen muchos avances en el mejoramiento genético, donde la explotación de la heterosis ha resultado favorable, generando con ello híbridos simples, lo cual dio un gran auge en el aumento del rendimiento por hectárea, resultando exitoso para las empresas semilleras quienes comercializan esto, a los productores agrícolas. Este proceso de obtención de híbridos tiene sus desventajas, entre las cuales destacan el precio de la semilla, esto debido al tiempo de selección y la poca semilla que se genera al término de este, lo cual significa un mayor precio para los productores, por lo cual se optó por la generación de híbridos dobles y triples (Paliwal *et al.*, 2001).

2.1.1 Heterosis

Heterosis o vigor híbrido se conoce como la superioridad de un híbrido en la media de sus dos padres homocigotos, ha sido objeto de intensa investigación por más de un siglo, sin embargo, los mecanismos básicos que causan o contribuyen a la heterosis no están claros todavía (Coors y Pandey, 1999). A pesar de esta falta de comprensión, los fitomejoradores han manipulado la heterosis con bastante éxito para aumentar el vigor de muchas especies domesticadas y así contribuir con el aumento en los rendimientos por hectárea de muchos cultivos de interés (Springer y Stupar, 2007). En el maíz, se estima que el uso de híbridos aumenta los rendimientos un 15% anual debido a la heterosis (Duvick, 1999, citado por Lqbal, *et al.*, 2010)

2.1.2 Híbridos simples

Ramírez (2006) define que un híbrido simple es el que se obtiene cruzando dos líneas puras. Estas líneas puras se obtienen de sucesivas autofecundaciones y selecciones hasta obtener plantas homocigotas; para ello se requieren 5 – 7 generaciones sucesivas. La semilla de híbridos (F_1) es la que se vende a los agricultores para la siembra, por lo común los híbridos simples son más uniformes y tienden a presentar un mayor potencial de rendimiento en condiciones ambientales favorables (Chávez y López, 1995). Tiene el inconveniente de que produce un rendimiento muy bajo de semilla lo cual tiende a incrementar su costo de producción y sucesivamente la semilla resulta más cara para los productores.

2.1.3 Híbridos dobles

Un híbrido doble se obtiene del cruzamiento entre dos híbridos simples. Por tanto en su composición intervienen cuatro líneas puras diferentes. Son más variables que los simples pero presentan una mayor adaptación (Ramírez, 2006). Tiene un rendimiento muy bueno de semilla de calidad, debido a que las plantas vigorosas suelen producir polen en abundancia.

2.1.4 Híbridos triples.

Es una cruce de tres líneas; se lleva a cabo cruzando un híbrido de cruce simple, con una tercera línea pura. Su principal valor se deriva de que los primogénitos tienen buena capacidad de rendimiento (Harold y Rucker, 1984). También se denomina híbrido tres vías y es el resultado del cruzamiento de un híbrido simple, como parental femenino, y una línea consanguínea como macho. Como el híbrido doble, tiene mayor plasticidad que el híbrido simple y menor variabilidad que el doble (Ramírez, 2006).

2.1.5 Cruzas dialélicas

Una cruce dialélica consiste en todos los cruces posibles entre un número de variedades. Cruzamientos recíprocos, y la autofecundación de los padres, puede o no, ser omitido. Como un conjunto de cruzamientos es, obviamente, de interés para el mejorador de plantas, pero la información obtenida puede ser de utilidad, o no valer la pena el trabajo de realizar las cruzas (Gilbert, 1958).

2.1.6 Los mestizos o cruzas de prueba

Estos esquemas esencialmente comprenden: (1) autofecundación y simultáneamente cruzamiento de cada planta con un probador; (2) evaluación de los cruzamientos en ensayos ejecutados en distintos ambientes, y (3) recombinación de las semillas autofecundadas restantes correspondientes a los *top crosses* seleccionados para empezar el próximo ciclo (Paliwal, *et al.*, 2001).

El uso de estos probadores en el mejoramiento ha sido sugerido por varios investigadores (Davis, 1927, Paz *et al.* 1973) debido a que ha sido útil para medir la aptitud combinatoria de un grupo de líneas endocriadas. Esta práctica se ha generalizado y se puede decir ha sustituido al de cruzas dialélicas, ello quizás sea porque en mestizos es más económico hacer los cruzamientos (Castañón *et al.*, 1998).

2.2 Perspectivas actuales

Actualmente existen diversos factores que influyen en el desarrollo, crecimiento y rendimiento final del grano en el cultivo de maíz. Por un lado tenemos el estrés

abiótico; el cual está conformado por temperatura, luz, CO₂, y la disponibilidad del agua. La sequía es una de las principales limitaciones para la producción de alimentos en todo el mundo. Es decir las temperaturas extremas y la baja disponibilidad de agua frecuentemente limitan el crecimiento y la productividad de las especies de cultivos importantes, como los cereales (BarnabÁS *et al.*, 2008). Las altas temperaturas a menudo se acompañan con el bajo suministro de agua. El principal objetivo del mejoramiento de los cereales, debe ser el desarrollo de cultivares que toleren estos dos tipos de estrés (Tester y Bacic, 2005).

En segundo lugar, pero con la misma importancia, está el estrés biótico; causado principalmente por plagas y enfermedades. Por lo cual es necesario conocer las características bioquímicas, además de los estudios agronómicos realizados normalmente. En este caso, el comportamiento de los carbohidratos no estructurales presentes en el tallo, debido al poco estudio realizado en este órgano que comúnmente es clasificado como un soporte, conductor de azúcares y elementos nutritivos (Andrews, CJ *et al.*, 2000; Juarez y Tiessen, 2011).

2.3 Fotosíntesis

La vida en la tierra depende finalmente de la energía derivada del sol. La fotosíntesis es el único proceso de gran importancia biológica que puede captar esta energía. Además, una gran parte de los recursos energéticos del planeta resulta de la actividad fotosintética (combustibles fósiles) (Blankenship, 2002). Donde sólo el 5% de la energía solar total incidente es convertida en carbohidratos (Fig. 2.3) (Taiz y Zeiger, 2002).

El tejido fotosintético más activos en las plantas superiores es el mesófilo de las hojas. Las células del mesófilo tienen muchos cloroplastos, que contienen los pigmentos especializados que absorben la luz verde, la clorofila. En la fotosíntesis, la planta utiliza la energía solar para oxidar el agua, liberando así el oxígeno, y para reducir el dióxido de carbono, para formar compuestos de carbono grandes, principalmente los azúcares (fig.2.1).

La fotosíntesis consiste en los procesos fotoquímicos que ocurren en la presencia de la luz (fig. 2.1), los procesos puramente enzimáticos que no requieren de luz (llamadas reacciones oscuras), y los procesos de difusión que producen el intercambio de dióxido de carbono y oxígeno entre los cloroplastos y el aire exterior. Cada uno de estos subprocesos está influido por factores internos y externos, y puede limitar el rendimiento de los procesos en general.

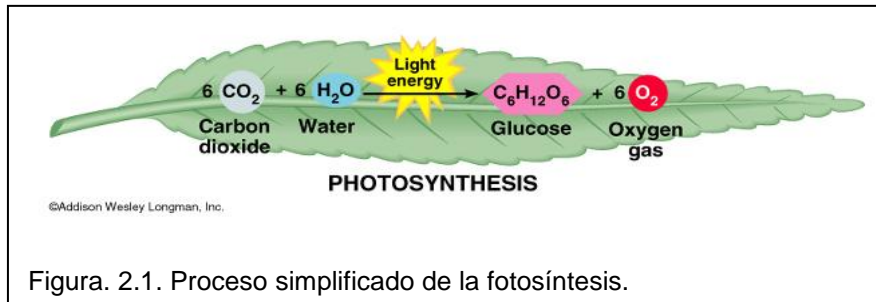


Figura. 2.1. Proceso simplificado de la fotosíntesis.

La fijación de carbono por parte de las plantas se lleva a cabo por tres mecanismos (C_3 , C_4 y CAM). Dentro de los tipos C_4 existen tres subtipos bioquímicos basados en el sitio y la reacción enzimática de descarboxilación que varían en la forma en que captan el Carbono, NADP-ME, NAD-ME y PEP-CK (Weber y Von Caemmerer, 2010).

El maíz es una planta clasificada entre los tipos C_4 y la fijación de carbono la realiza de acuerdo al subtipo NADP-ME, que es Enzima Málica dependiente de NADP.

La planta de maíz cuenta con una estructura que se denomina de Anatomía de Kranz, que consiste en dos tipos de células morfológicamente y bioquímicamente diferentes que están implicadas en la fijación del carbono: las células del mesófilo y las células de la vaina (Fig. 2.2) (Edwards y Walker, 1983).

Las células del mesófilo tienen como características que contiene cloroplastos con granas, donde se realiza el transporte lineal de electrones y se fotoreduce el NADP. Caso contrario las células de la vaina no contienen grana y en ellas se realiza la mayoría de las reacciones del ciclo de Calvin.

Para fijación de carbono, dentro de las células del mesófilo una molécula de CO_2 se une al Fosfoenolpiruvato para formar Oxalacetato, que permite mantener un

flujo constante de dióxido de carbono y de esta forma hacer más eficiente la fotosíntesis en este tipo de plantas.

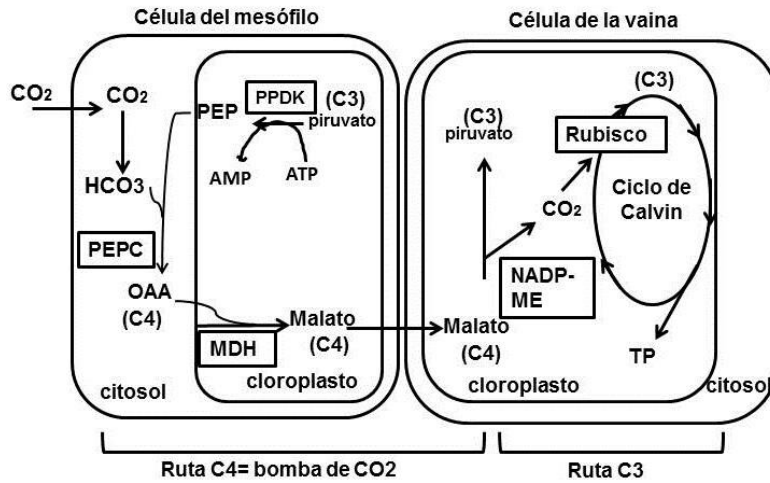


Fig. 2.2. Ilustración simplificada de la ruta fotosintética C4, del tipo de plantas C4 NADP-ME. En la ruta C4, una molécula de CO_2 es transportada desde el citosol de la célula del mesófilo hacia el cloroplasto de la célula de la vaina donde se encuentra el Rubisco.

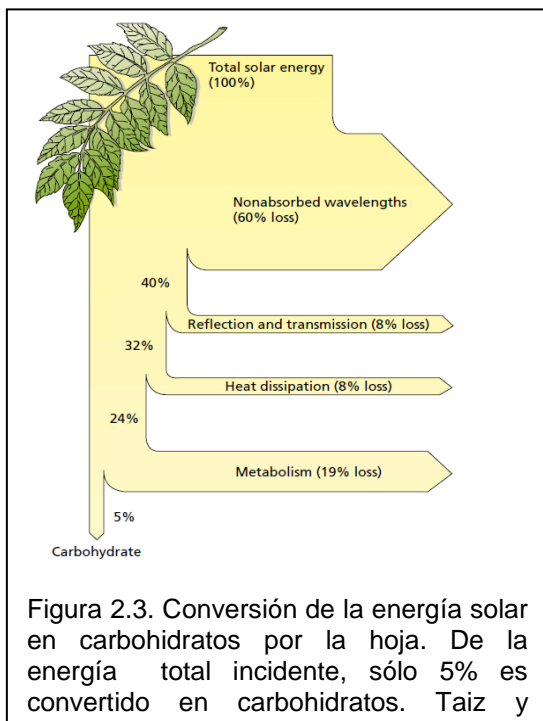


Figura 2.3. Conversión de la energía solar en carbohidratos por la hoja. De la energía total incidente, sólo 5% es convertido en carbohidratos. Taiz y

2.3.1 Carbohidratos no estructurales

Como bien sabemos los carbohidratos en plantas superiores se dividen en dos grupos: carbohidratos estructurales y no estructurales (CNE), los primeros forman parte de la pared celular (celulosa, hemicelulosa y pectina), y están involucrados

en la estructura rígida de la planta. Éstos son causantes de la fibrosidad de las plantas, no están disponibles para el metabolismo energético de la planta, son insolubles en agua. El segundo grupo está compuesto por: monosacáridos como glucosa y fructosa, disacáridos como sacarosa y maltosa, polisacáridos como almidón y fructanos, los cuales se almacenan en órganos vegetativos como: raíces, rizomas, estolones y en el tallo (McLaughlin y Boyer, 2004; Tofiño *et al.*, 2006).

En trigo, se ha reportado que los carbohidratos se acumulan temporalmente en los tallos en la fase de crecimiento temprano, principalmente en carbohidratos solubles en agua (WSC, por sus siglas en inglés) y posteriormente son removilizados durante el llenado de granos, en el cual contribuyen en un 10-12% del rendimiento final del grano en condiciones normales y más del 40% bajo condiciones de estrés hídrico (Khan *et al.*, 1994), además se ha sugerido un papel para el almidón en el almacenamiento temporal de carbono en los tejidos de tallo y vainas, que sirven en la provisión de carbono en el desarrollo temprano de las estructuras reproductivas (Scofield, *et al.* 2009). En el cultivo de papa Zheng, *et al.* (2009), sugieren que los carbohidratos no estructurales (CNE) almacenados en la base del tallo se suministra a los tubérculos en condiciones de estrés, como soporte en el ensanchado de los tubérculos.

En maíz existen avances en éste ámbito donde, Juárez y Tiessen (2011), sugieren que el tallo además de fungir como soporte y conductor de nutrientes y azúcares, es un reservorio dinámico de carbohidratos no estructurales (CNE) los cuales se ven afectados por diferentes condiciones tales como etapas de desarrollo, sequía y por la remoción de órganos fuentes y consumidores. Pero falta mucho camino por recorrer, además de un análisis riguroso y evaluaciones en distintos ambientes, para llegar a conclusiones contundentes y de interés para el mejoramiento de esta importante especie.

2.3.2 Sacarosa

El principal producto de la fotosíntesis es la sacarosa (Singh and Maclachlan, 1983; Zheng *et al.*, 2009), la cual juega un papel importante en el crecimiento de las plantas, al ser la forma generalizada en que se moviliza el carbono de los tejidos fuente a los tejidos sumideros (Chiou and Bush, 1998) siendo la principal molécula de suministro de carbono.

2.3.2.1 Síntesis de sacarosa

Los análisis enzimáticos han demostrado que la sacarosa se sintetiza en el citosol, a partir de triosas fosfato, en una ruta similar a la de almidón, es decir, a través de fructosa-1,6-bisfosfato y glucosa-1-fosfato (fig. 2.4) (Taiz y Zeiger, 2002).

En la síntesis de sacarosa, la glucosa-1-fosfato es convertida a UDP-glucosa a través de una vía específica de UDP-glucosa pirofosforilasa que es análoga a la ADP-glucosa pirofosforilasa de los cloroplastos. En esta etapa, dos reacciones consecutivas completan la síntesis de sacarosa (Huber y Huber, 1996). En primer lugar, la sacarosa-6-fosfato sintasa cataliza la reacción de la UDP-glucosa con fructosa-6-fosfato para producir sacarosa-6-fosfato y UDP. En segundo lugar, la sacarosa-6-fosfato fosfatasa (fosfohidrolasa) rompe el fosfato de sacarosa-6-fosfato, produciendo sacarosa. La última reacción, que es esencialmente irreversible, inicia primeramente en la dirección de la síntesis de sacarosa (Taiz y Zeiger, 2002).

2.3.3 Almidón

El almidón es un glucano insoluble compuesto por dos polímeros de glucosa, amilosa y amilopectina. Es el carbohidrato de reserva más abundante de las plantas superiores (Geigenberger, 2011) y se encuentra en distintos tejidos: hojas, tallos y raíces así como flores, frutos y semillas (Tofiño, *et al.*, 2006), en los cuales se utiliza como fuente de energía durante periodos de dormancia, estrés o reinicio de crecimiento (Geigenberger, 2011). Además es de gran importancia industrial para usos alimentarios y no alimentarios (Geigenberger, 2003).

El almidón es una reserva de carbohidratos insoluble estable que está presente en casi todas las plantas. Tanto el almidón y la sacarosa se sintetiza a partir de la triosa fosfato que es generada por el ciclo de Calvin (Beck y Ziegler 1989).

2.3.3.1 Síntesis del almidón en el cloroplasto

El almidón es sintetizado a partir de triosa fosfato a través de la fructosa-1,6-bisfosfato. La glucosa-1-fosfato intermedio se convierte en ADP-glucosa a través de ADP-glucosa pirofosforilasa en una reacción que requiere ATP y genera pirofosfato (fig.2.4).

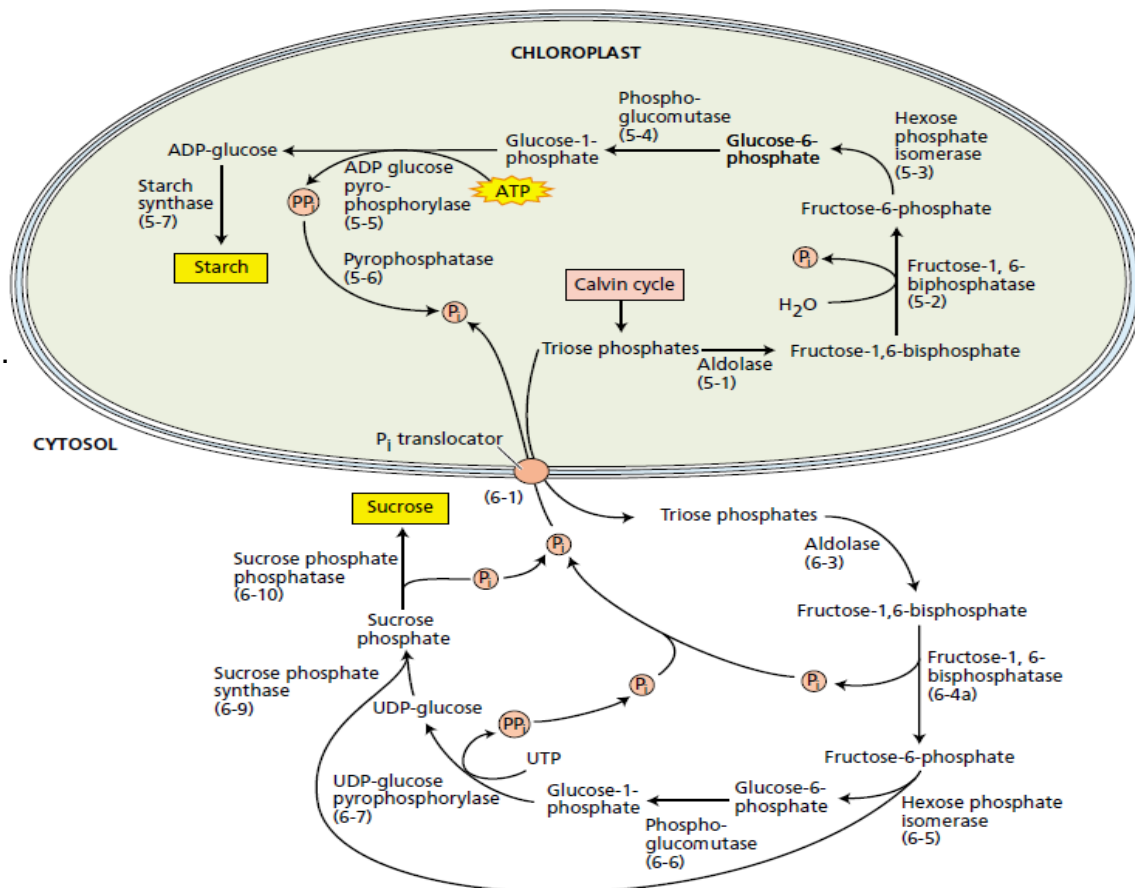


Figura 2.4. La síntesis de almidón y sacarosa compiten en procesos que ocurren en los cloroplastos y el citosol, respectivamente. Cuando la concentración citosólica de P_i es alta, el fosfato triosa del cloroplasto es exportado al citosol a través del P_i a cambio de P_i , la sacarosa se sintetiza. Cuando la concentración citosólica de P_i es baja, el fosfato triosa se mantiene dentro de los cloroplastos, y el almidón se sintetiza.

Al igual que en muchas reacciones biosintéticas, el pirofosfato se hidroliza a través de una pirofosfatasa inorgánico específico a dos ortofosfato (P_i) moléculas impulsando así la reacción hacia la síntesis de ADP-glucosa.

Finalmente, la fracción de glucosa de la ADP-glucosa se transfiere al extremo no reductor (carbono 4) de la glucosa en la terminal de una cadena de almidón de crecimiento, completando así la secuencia de reacciones

2.3.3.2 Almidón de reserva

El almidón sintetizado en los amiloplastos, se denomina almidón de reserva ya que se acumula durante largos periodos de tiempo, y se moviliza rápidamente en situación de demanda (Sivak y Preiss, 1998).

Por otro lado, el almidón de reserva también se caracteriza porque los procesos de síntesis y degradación del mismo tienen lugar en fases de desarrollo diferentes, de manera que las enzimas implicadas en la degradación del almidón pueden no estar presentes durante la fase de acumulación del almidón (Zeeman, *et al.*, 2002).

Los tejidos donde se han llevado a cabo la mayor parte de los estudios sobre el almidón de reserva son el endospermo de semillas de cereales, como arroz o trigo, y el tubérculo de papa, debido a su importancia económica. La función de este endospermo es la de proveer los esqueletos carbonados y la energía necesaria para la germinación del embrión. En las semillas de las gramíneas, el almidón constituye normalmente entre el 65 y el 75% del peso seco del grano maduro, mientras en las semillas de leguminosas tienen un porcentaje menor de sólo el 30% de almidón.

Además de reserva de energía, como se ha visto en cereales y tubérculos, el almidón sintetizado en los amiloplastos puede intervenir en la respuesta gravitacional de raíces y tallos (Sivak y Preiss, 1998).

2.3.3.2 Almidón transitorio

A diferencia del almidón de reserva, el almidón transitorio se acumula en los cloroplastos de las células fotosintéticas. Este almidón se acumula como gránulos

en los cloroplastos durante la fijación fotosintética del CO₂ atmosférico durante el día y se degrada durante la noche, asegurando una disponibilidad constante de fotoasimilados al resto de la planta. La síntesis durante el día y la degradación durante la noche de este tipo de almidón en los cloroplastos son procesos mucho más dinámicos que los que tienen lugar en los amiloplastos, por lo que es denominado almidón transitorio.

En contraste con el almidón de reserva, el almidón transitorio es movilizado cada noche y las enzimas apertura y cierre de estomas (Caspar *et al.*, 1985, 1991; Bernier *et al.*, 1993; Eimert *et al.*, 1995), así como el proceso de relleno de la semilla (Schulze *et al.*, 1994), responsables de la degradación del almidón están presentes y pudieran ser activas en el cloroplastos durante la síntesis diurna del almidón por el día (Zeeman *et al.*, 2002).

La función primordial del almidón acumulado en las hojas durante el día es la de cubrir los requerimientos de carbono y energía por parte de la planta, cuando el proceso fotosintético no es activo. Además de esta función, se ha propuesto que la síntesis y degradación del almidón transitorio afecta a procesos como la tasa de crecimiento y el tiempo de floración.

2.3.4 Relación fuente-sumidero (*Sink-Source*)

Los términos fuente y sumidero se usan para señalar la dirección del flujo de fotosintetizados entre ciertos órganos y depende de la fase de desarrollo de la planta. En general, la fuente corresponde a los órganos de suministro y sumidero a los órganos de recepción (Kohashi, 1990). Desde el punto de vista metabólico se puede definir a la fuente como los órganos productores de fotoasimilados en el proceso de fotosíntesis y los órganos sumideros los que los consumen (Wilson, 1972; Charles-Edwards *et al.*, 1986).

El rendimiento de grano es afectado por procesos complejos, pero la disponibilidad de asimilados de la fuente y sumidero para la acumulación de dichos asimilados, junto con la translocación de los mismos, son los factores que

se conocen de mayor importancia en la determinación del rendimiento final de los cereales.

En el cultivo de maíz, se ha tratado de entender las relaciones entre la fuente de asimilados y el sumidero, constituida por las mazorcas o más específicamente los granos en la mazorca, esto con el fin de explicar si el rendimiento de grano es limitado por el suministro de fotosintetizados, o bien por la capacidad del grano para almacenar los asimilados trasladados (Tollenaar, 1977; Tollenaar y Daynard, 1978; Hay y Walker, 1989).

Se han realizados diversos estudios para obtener información sobre la fuente y el sumidero como posibles limitantes del rendimiento. Existe cierta controversia en cuanto a las investigaciones realizadas en este ámbito, muchos autores señalan la importancia de la fuente, y las hojas como las principales aportadoras de fotosintetizados a la mazorca, en este caso la que determina el rendimiento final (Tanaka y Yamaguchi 1972; Priul y Schwebel-Dugué, 1992; Wolfe *et al.*, 1988), mientras tanto otros estudios evidencian que la tasa de fotosíntesis está relacionada con la demanda de asimilados, es decir que la fotosíntesis está controlada por la concentración de asimilados en la hoja, si la fuerza del sumidero es baja, en la hoja se acumulan azúcares y almidón reduciendo su actividad, esto como si ya hubieran sido satisfechas las necesidades de órgano sumidero (Hay y Walker, 1989).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización

El trabajo se realizó en el campo experimental de la “Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro” Unidad Laguna, localizada en Periférico y Carretera Santa Fe, en Torreón Coahuila, ($101^{\circ} 40'$ y $104^{\circ} 45'$ LO, y $25^{\circ} 05'$ y $26^{\circ} 54'$ LN), al norte de México (Schmidt, 1989).

3.2 Material genético

El experimento consistió en la evaluación de 39 mestizos provenientes del programa CIMMYT-CINVESTAV y 11 testigos de los cuales 3 fueron híbridos comerciales, Cuadros 3.1 y 3.2.

3.3 Diseño experimental

El diseño experimental consistió en la siembra en surco simple, utilizándose una distribución de tratamientos en Alfa Látice con 20 bloques y 10 tratamientos por bloque, con dos repeticiones, la parcela experimental fue de 5 m de largo y 0.75 m entre surcos, y una distancia entre planta y planta de 0.20 m, para una densidad poblacional de 66,500 plantas/ha.

Cuadro 3.1. Genealogía de 39 mestizos generados por los probadores CML 495 y CML 496.

T	NOMBRE	GENEALOGIA	T	NOMBRE	GENEALOGIA
4	OPVDAW	OPVDroughtAxeIW-5-1-2/CML495	45	OPVDTPLPS	OPVDTPLPS-1-1-2/CML495
6	OPVDAW	OPVDroughtAxeIW-5-2-1/CML495	46	OPVDTPLPS	OPVDTPLPS-1-1-3/CML495
7	OPVDAW	OPVDroughtAxeIW-6-2-2/CML495	49	OPVDTPLPS	OPVDTPLPS-4-1-1/CML495
9	OPVDAW	OPVDroughtAxeIW-6-4-1/CML495	50	OPVDTPLPS	OPVDTPLPS-4-1-2/CML495
13	OPVDAW	OPVDroughtAxeIW-10-2-1/CML495	51	OPVDTPLPS	OPVDTPLPS-4-1-3/CML495
17	OPVDAW	OPVDroughtAxeIW-12-2-2/CML495	55	OPVDTPLPS	OPVDTPLPS-8-3-1/CML495
18	OPVDAW	OPVDroughtAxeIW-12-3-1/CML495	57	OPVDTPLPS	OPVDTPLPS-8-3-3/CML495
20	OPVDAW	OPVDroughtAxeIW-12-4-1/CML495	58	OPVDTPLPS	OPVDTPLPS-9-1-1/CML495
21	OPVDAW	OPVDroughtAxeIW-12-4-2/CML495	59	OPVDTPYTL	OPVDTPLPS-9-1-2/CML495
22	OPVDAW	OPVDroughtAxeIW-14-1-1/CML495	60	OPVDTPYTL	OPVDTPYTL-3-1-3/CML496
23	OPVDAW	OPVDroughtAxeIW-14-1-2/CML495	62	OPVDTPYTL	OPVDTPYTL-4-1-1/CML496
26	OPVDAW	OPVDroughtAxeIW-BULK-1-1/CML495	63	OPVDTPYTL	OPVDTPYTL-4-1-2/CML496
28	OPVDAY	OPVDroughtAxeIY-2-1-2/CML496	65	OPVDTPYTL	OPVDTPYTL-5-2-3/CML496
29	OPVDAY	OPVDroughtAxeIY-2-2-1/CML496	68	OPVDTPYTL	OPVDTPYTL-6-2-1/CML496
69	OPVDTPYTL	OPVDTPYTL-7-1-1/CML496	73	OPVDTPYTL	OPVDTPYTL-8-2-1/CML496
72	OPVDTPYTL	OPVDTPYTL-7-1-4/CML496	78	OPVDTPYTL	OPVDTPYTL-11-2-1/CML496
32	OPVDAY	OPVDroughtAxeIY-6-1-2/CML496			
41	OPVDAY	OPVDroughtAxeIY-10-1-1/CML496			
84	Africasequ	[[AzulXoxocotlaxCML343]]/CML444/CML444]]/CML444]-B-B/CML495			
85	CML312SrQC ML312SrQ	[[AzulXoxocotlaxLPSC7-F103-2-6-1-1-BB]]/CML312]]/(CLQ-RCWQ83/CML312SR//CML312)xCML312sr)-2-6-b]]/(CLQ-RCWQ83/CML312SR//CML312)xCML312sr)-2-6-b]-B-B/CML495			
87	Tester ATester A	[[AzulXoxocotlaxLPSC7-F103-2-6-1-1-BB]]/CML494//CML494]]/CML494]-B-B/CML495			

T= Numero de tratamiento.

Cuadro 3. 2. Genealogía de 11 Testigos utilizados en el ensayo.

T	NOMBRE	GENEALOGIA
89	Testigo1	CML494xCML495
90	Testigo2	CML451xCML496
91	Testigo3	CML491xCML492
92	Testigo4	Puma
93	Testigo5	Oso
94	Testigo6	Leopardo
96	Testigo8	(LPSC7-F10-3-1-1xCML449)xDTPWC9-F32-1-5-1-BB
97	Testigo9	LPSC7-F64-2-6-2-2-BBxCML495
98	Testigo10	LPSC7-F86-3-1-1-1-BBxCML449
99	Testigo11	DTPWC9-F16-1-1-1-1-BBxCML495
100	Testigo12	DTPYC9-F74-1-1-1-1-BBxCML451

T = Numero de tratamiento.

3.3.4 Manejo agronómico

El manejo del cultivo fue el recomendado por INIFAP (2006) para la Comarca Lagunera.

3.4.1 Preparación de terreno

La preparación del terreno consistió en un barbecho, rastra, nivelación y trazos de los surcado e instalación de sistema de riego usando cintilla como modelo de irrigación.

3.4.2 Siembra

La siembra se realizó en forma manual el 6 de junio del 2011. Esto se realizó sembrándose una semilla por golpe a 20 cm entre planta y planta y a una profundidad de 2 a 3 cm.

3.4.3 Riegos

Para el periodo de verano se efectuó el riego con el uso del sistema de riego por cintillas el cual se realizó de acuerdo a las necesidades del cultivo y modificando el tiempo de riego de acuerdo a las diferentes etapas de desarrollo.

3.4.4 Fertilización

La fórmula de fertilización utilizada fue de 200-100-00 realizándose la primera aplicación todo el fósforo y el 50% del nitrógeno al momento de la siembra y el resto fue aplicado en las diferentes etapas críticas del desarrollo del cultivo.

3.4.5 Control de plagas

El control de plagas se realizó según la presencia y/o la infestación de plagas, presentándose el gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) aplicando Cipermetrina 100g de I.A./ha y Clorpirifos etil 720g de I.A./ha, para el control de la plaga de la araña roja (*Tetranychus sp.*) Se aplicó Abamectina 9g de I.A./ha. En los dos periodos hubo las mismas presencias de plagas excepto en el verano del 2011 en

la cual se tuvo la presencia de la pulga negra (*Chaetocnema pulicaria*) la cual se controló con la aplicación de Clorpirifos etil 720g de I.A./ha.

3.4.6 Control de Malezas

Para mantener el cultivo libre de malas hierbas se realizó una escarda mecánica a los 35 días, y conforme se presentó la maleza se eliminó manualmente, además se aplicó 2-4 D-amina para maleza de hoja ancha.

3.5 Características agronómicas evaluadas

Estas variables fueron evaluadas en base al Manejo de los ensayos e informe de los datos para el Programa de Ensayos Internacionales de Maíz del CIMMYT (CIMMYT, 1995).

3.5.1 Floración masculina (FM)

Sé registró los días transcurridos desde la siembra hasta la fecha en la cual el 50% de las plantas de la parcela comenzaron con la emisión de polen.

3.5.2 Floración femenina (FF)

Se registró el número de días transcurridos desde la siembra hasta la fecha en la cual el 50% de las plantas de la parcela tienen estigmas de 2-3 cm de largo.

3.5.3 Altura de planta (AP)

La altura de planta se realizó midiendo con un estadal graduado cinco plantas seleccionadas al azar, donde se midió la distancia desde la base de la planta hasta el punto donde comienza a dividirse la espiga (panoja) y se registró la altura en centímetros.

3.5.4 Altura de mazorca (AM)

La altura de mazorca se realizó en las mismas cinco plantas cuya altura se midió, determinando la distancia en centímetros desde la base de la planta hasta el nudo

con la mazorca más alta. Las cuales se midió entre las 2 ó 3 semanas posteriores a la floración, inmediatamente antes de la cosecha.

3.5.5 Cobertura de mazorca (COB)

La cobertura de mazorca se registró antes de la cosecha cuando presentaron alguna parte expuesta de la mazorca. Esto con la siguiente escala de calificación; 1) Excelente: Las brácteas cubren apretadamente la punta de la mazorca y se extienden más allá de ella. 2) Regular: Cubren apretadamente la punta de la mazorca. 3) Puntas expuestas: Cubren flojamente la mazorca hasta la punta. 4) Grano Expuesto: Las brácteas no cubren la mazorca adecuadamente y dejan la punta algo expuesta. 5) Completamente Inaceptable: Cobertura deficiente; la punta está claramente expuesta.

3.5.6 Permanencia en verde (*Stay green* “SG”)

Se registró los genotipos que presentaron la característica de “*Stay Green*” el cual consiste en la permanencia de la planta en verde, cuando la mazorca ha completado su desarrollo; uno: para los genotipos que si presentaron y dos: para los que no.

3.5.7 Cosecha

La cosecha se realizó en el campo experimental de la universidad (UAAAN-UL) el día 29 octubre del 2011. Esto se realizó de forma manual, cosechando todas las plantas por cada parcela y colocando en frente de cada surco para posteriormente calificar las mazorcas. Estas mazorcas, se utilizaron para cuantificar las características de la mazorca como:

3.5.7.1 Longitud de mazorca (LMz). La longitud se tomó con una regla graduada en centímetros el largo, de tres mazorcas y se obtuvo la media, esto para cada parcela.

3.5.7.2 Número de hileras (NH). El número de hileras se tomó de tres mazorcas contando individualmente las hileras de cada una y con ello obtener el promedio, esto para cada parcela.

3.5.7.3 Número de granos/hilera (NGH). Se contabilizó el número de granos de una hilera por cada una de las tres mazorcas, esto para cada parcela.

3.5.7.4 Diámetro de mazorca (DMz). El diámetro se obtuvo midiendo tres mazorcas en la mitad con un vernier graduado en centímetros, se capturó y se obtuvo el promedio. Esto para cada una de las parcelas.

3.5.7.5 Peso de campo (REN). El peso de campo se registró en kilogramos, pesando las mazorcas con olotes, cuando el contenido de humedad osciló entre 15%. Para después transformarlo en kg ha^{-1} .

3.6 Determinación de carbohidratos no estructurales

La metodología para la determinación de azúcares solubles en los órganos y tejidos vasculares está basada en un sistema de enzimas acopladas (Angeles-Núñez and Tiessen, 2010; 2011), el cual consiste en la medición de absorbancia de cada molécula de NADPH generado por la conversión de Glucosa hasta 6-Fosfogluconato, a 340nm (figura 3.1).

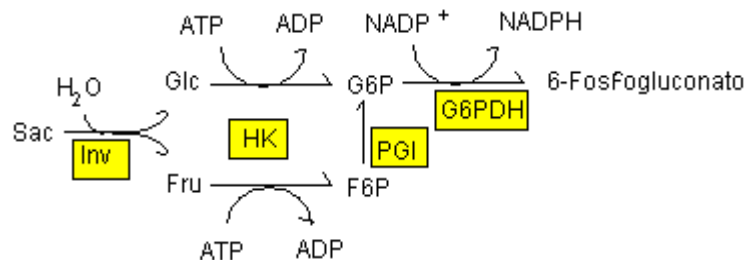


Figura 3.1 Sistema de Enzimas Acopladas para determinar el contenido de hexosas y sacarosa. El principio de la medición de azúcares consiste en el acoplamiento enzimático de la Hexocinasa y la Glucosa-6-Fosfato-Deshidrogenasa (G6PDH). Las azúcares son convertidas estequiometricamente a Glucosa-6-Fosfato y después a 6-Fosfogluconato. Por cada mol de hexosas se produce un mol de NADPH. Por cada mol de sacarosa se producen dos moles de NADPH.

3.6.1 Azúcares solubles

La determinación se realizó a partir de 1mL de jugo de tallo de maíz (Tiessen, 2010; 2011). Las muestras fueron centrifugados a Velocidad máxima (4000 rpm) por 15 minutos en la Mega-centrífuga Sorvall®, el sobrenadante se retiró a otra microplaca deepwell (El sobrenadante se usa para leer Azúcares y la pastilla se conserva en la placa deepwell), aproximadamente 800µL, de la cual fue extraído 5µL para hacer la dilución en otra microplaca DeepWell (ver anexo 1). Se coloca en una microplaca de 384 pozos (Sarstedt®) 90µL de solución de reacción (ver anexo 1) y 10µL de la mezcla diluida (sobrenadante), se agitó en un termomixer® a temperatura ambiente por 10s (900rpm), para cada muestra biológica se realiza una réplica técnica.

Se leyó a 340nm en el lector de microplacas Bio-Tek ©: en el protocolo de Sugar Assay384 (Ver anexo). Para obtener los valores de las hexosas y sacarosa, se lee la absorbancia a 340nm y se mide la tasa de cambio a través del tiempo. Inicialmente se hace una lectura blanco (End blanco); una vez estabilizada se agrega 1µL de Hexoquinasa (HK) (anexo 7.1) para la medición de la glucosa libre, una vez estabilizada la lectura esta se considerara como “end HK”. En un segundo momento estabilizada la lectura anterior, se agrega 1µL de Fosfoglucoasa Isomerasa (PGI) (anexo 7.1) para la determinación de fructosa libre estabilizada la lectura se considerara como “end PGI”. Finalmente para determinar la sacarosa libre, cuando se haya estabilizado la lectura anterior se agrega 1µL de Invertasa (INV) (anexo 7.1) y una vez estabilizada la lectura se considerara como “end INV”.

Cálculos

Las lecturas correspondientes a “end Blanco”, “end HK”, “end PGI” y “end Inv” se vierten en Excel, para los cálculos, 17.7 se sustituye por 49.7 en la formula en el caso de placa de 384 pozos.

$$Glucose\left(\frac{mmol}{L}\right) = \frac{\Delta abs}{17.7 \mu mol^{-1}} * \frac{1}{V_{sampleDIL} (\mu L)} * FD * \frac{1mmol}{1000\mu mol} * \frac{10^6 \mu L}{1L}$$

$$Glucose\left(\frac{g}{L}\right) = X_{Glc} \left(\frac{mmol}{L}\right) * \frac{180.16mg}{1mmol_{Glc}} * \frac{1g}{1000mg} \quad FD= \text{factor de dilución}$$

VsampleDIL= volumen de sobrenadante que se añade a la mezcla de reacción (10µL)

Donde el cambio de absorbancia se calcula mediante la diferencia en las lecturas, así para la glucosa será “end HK”-“end blanco”, para la fructosa “end PGI”-“end HK” y para la sacarosa “end INV”-“end PGI”.

En el caso de la sacarosa para obtener su concentración se utiliza la fórmula anterior, pero finalmente multiplicado por el factor de 0.5, ya que si observamos la fig. 3 la invertasa rompe la sacarosa en glucosa y fructosa, lo que al final nos va a dar un doble NADPH formado generando el doble de absorbancia, por lo tanto necesitamos conocer la cantidad micromoles de sacarosa y no de glucosa y fructosa.

3.6.3 Almidón

Para la determinación se utilizó la pastilla que quedó en la separación del sobrenadante que se usó para los análisis de azúcares (Tiessen, 2010 “anexo”). La pastilla se lavó con EtOH 80%, donde se añadieron 500µL usando el dispensador (Dispenssette®), la placa se selló con tapas de silicón (AXIMAT) y se agitó vigorosamente hasta suspender la pastilla en el solvente. Se niveló y centrifugó la microplaca a velocidad máxima (4000 rpm) por 15 minutos, se desechó el sobrenadante, nuevamente se añadió 500µL de EtoH 80% y se repitieron los pasos anteriores.

Teniendo la pastilla limpia, añadimos 500µL de KOH 10mM (con Dispenssette®) (anexo 1), agitando vigorosamente para suspender bien la pastilla, para que quedara expuesta al KOH 10mM, luego la placa se selló bien con cinta de aluminio e incubó a 99° C con 700 rpm en termomixer por 3 hrs. Después retiramos la microplaca y se colocó en un baño de hielo para bajar la temperatura. Añadimos 700µL de la mezcla de degradación (ver protocolo “anexo”) usando la pipeta

multicanal (200+200+200+100µL), después se incubó a 37° C toda la noche (8-16 hrs). Se centrifugó a velocidad máxima (4000rpm) por 15 minutos y recuperamos el sobrenadante en otra microplaca deepwell. Se colocó en una microplaca de 384 (Sarsted©) 90µL de mezcla de reacción (ver protocolo), y 10µL del sobrenadante, se agitó en un termomixer a temperatura ambiente por 10s (1000rpm) y se leyó a 340nm en el lector de microplacas Bio Tek © en el protocolo de 384. Inicialmente se hace una lectura blanco (end blanco), una vez estabilizada se agrega 1µL de Hexoquinasa (HK) (ver anexo 2) para la medición de la glucosa libre, una vez estabilizada la lectura esta se considerara como “end HK”.

Cálculos

Las lecturas correspondientes al valor final “end Blanco” y “end HK” se vierten en Excel y con la siguiente fórmula para placa 384, se hacen los cálculos.

$$Glu\ cos\ e\left(\frac{mmol}{L}\right) = \frac{\Delta abs}{49.7\ \mu mol^{-1}} * \frac{1}{V_{sample\ DIL}\ (\mu L)} * \frac{V_{total\ DE\ extraccion}\ (\mu L)}{1\ mL\ jugo} * FD * \frac{1\ mmol}{1000\ \mu L} * \frac{1000\ mL}{1\ L}$$

FD= factor de dilución

VsampleDIL= volumen de sobrenadante que se añade a la mezcla de reacción (10µL)

VtotalDEextracción= KOH (µL) + MezclaDegradación (µL)= 500+700 = 1200µL

Para la determinación de la cantidad de almidón, será medida en base a la cantidad de glucosa liberada en la reacción. De igual forma para obtener el contenido de almidón se sustituirán los valores de absorbancia en la fórmula de las hexosas que darán el contenido en µmol/L.

3.7 Análisis estadístico.

Se realizó el análisis estadístico con el paquete SAS V9.0, los datos se sometieron a un análisis de ANOVA, Correlación mediante el método de Pearson y la prueba de medias por Tukey.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Carbohidratos no estructurales

Las hexosas (glucosa y fructosa) juegan un importante rol en el transporte de carbono, en el metabolismo y señalización de las plantas superiores (Roitsch y González, 2004). Para conocer el perfil de hexosas en el tallo del maíz, se extrajo jugo del tallo y se cuantificó el contenido de hexosas libres durante la fase de llenado de grano (estado lechoso-masoso “80 dds”). En la figura 4.1 y 4.2 se pueden observar los resultados obtenidos en el contenido de glucosa y fructosa respectivamente.

Los niveles de glucosa y fructosa presentaron diferencias altamente significativas al $p < 0.001$ en los genotipos; en ambos metabolitos se observa la misma tendencia, lo cual se explica por su correlación alta y significativa ($r = 0.69$). Aunque en el presente estudio, los niveles de estos metabolitos son bajos debido al periodo de muestreo (80 DDS), pues los niveles disminuyen conforme avanza el tiempo y las reservas del tallo son translocados a la mazorca para el llenado de grano (Scofield, *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 1994,). En la figura 4.1 se observa la magnitud de los diferentes genotipos donde el nivel más alto lo presenta el genotipo 59 con $33 \mu\text{mol/L}$ de glucosa, estadísticamente diferentes, seguido por 10 genotipos con niveles de $22 \pm 27 \mu\text{mol/L} \pm \text{EE} = \text{Error Estándar}$.

La fructosa, mostró la misma tendencia en los genotipos comparativamente con la glucosa; también con niveles bajos al igual que la glucosa, Figura 5. Los niveles se sitúan entre 8 a $16 \mu\text{mol/L} \pm \text{EE}$ (Error Estándar), donde el genotipo 84 mostró el mayor contenido ($16 \mu\text{mol/L}$) estadísticamente superior al resto; en contraste cuatro genotipos presentan el contenido más bajo (78, 69, 50 y 100 respectivamente), con valores cercanos a $4 \mu\text{mol/L} \pm \text{EE}$ de fructuosa. No presentó correlación con el rendimiento de grano.

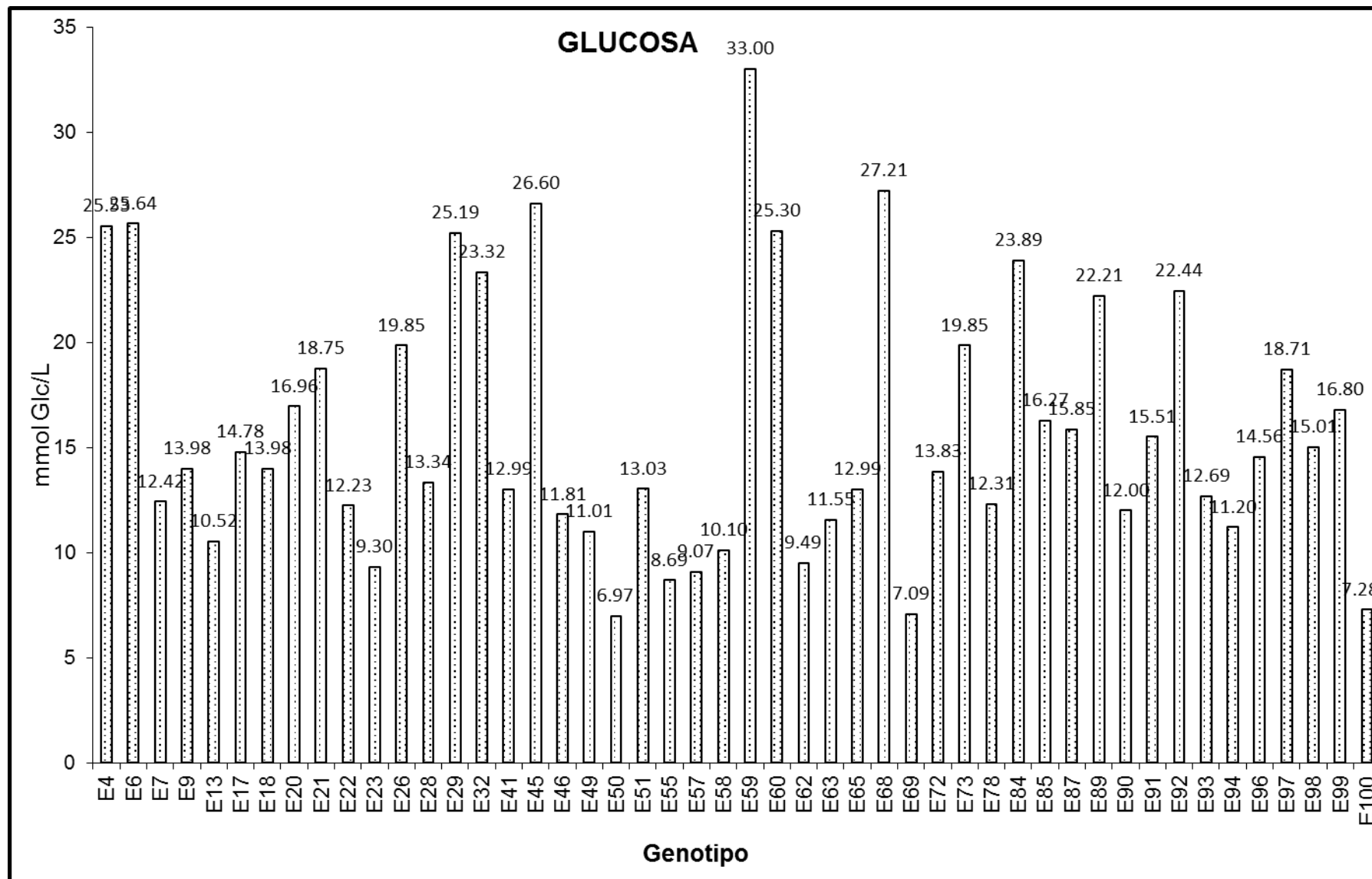


Figura 4.1 Niveles de glucosa en tallo de mestizos de maíz, a 80 dds en etapa de grano lechoso-masoso.

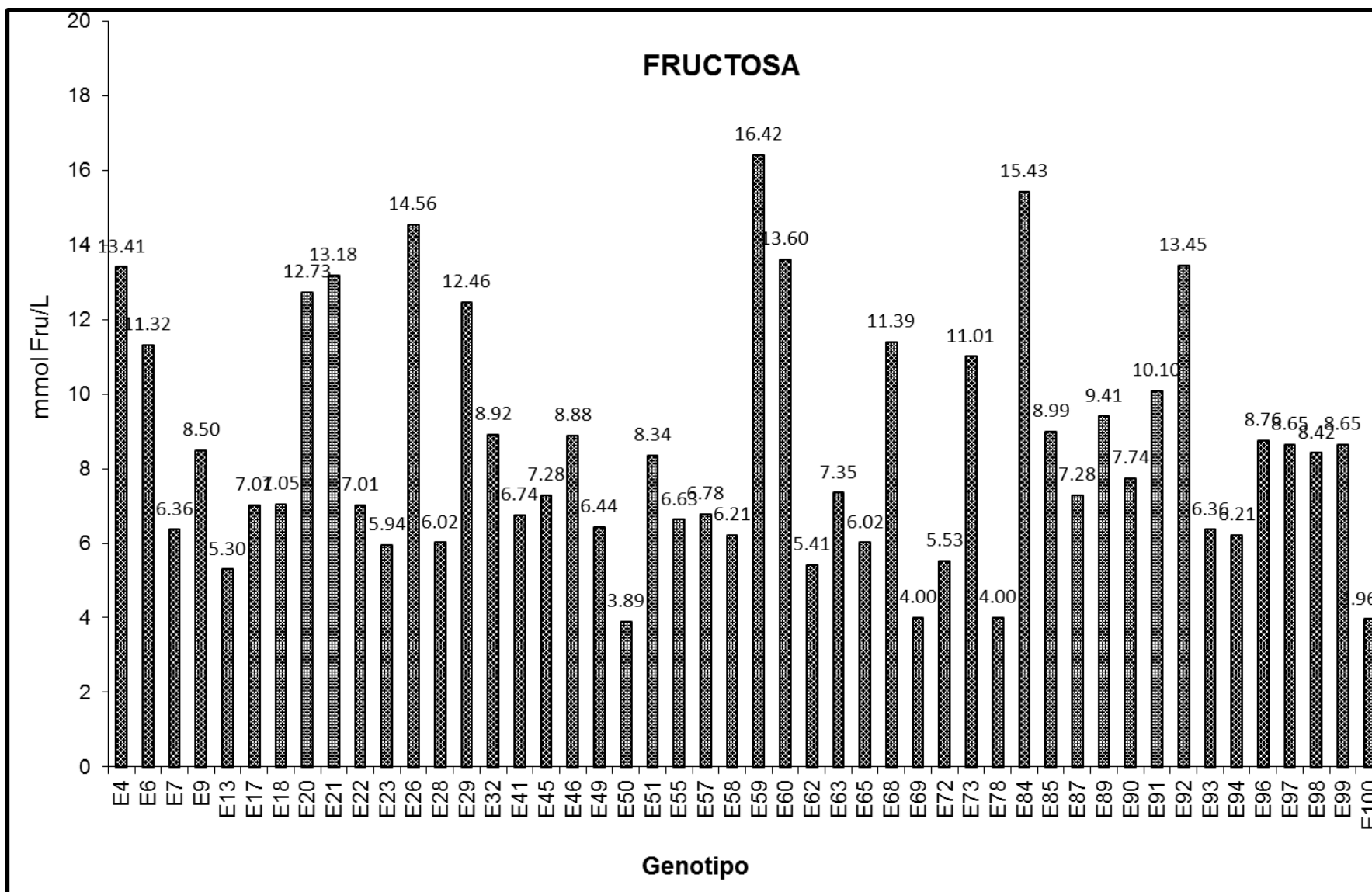


Figura 4.2. Niveles de fructosa en el tallo de mestizos de maíz, en el estado lechoso-masoso a 80 dds.

La sacarosa es la molécula más importante en el transporte del carbono, desde los tejidos fuente hasta los tejidos de demanda para mantener el desarrollo y crecimiento heterotrófico o para en su caso almacenarse como sacarosa o como almidón (Singh and Maclachlan 1983; Zheng *et al.*, 2009; Chiou y Bush 1998)

El contenido de sacarosa (Figura 4.3), los genotipos fueron estadísticamente diferentes ($p < 0.001$). En la mayoría de los genotipos se observa que su contenido se encuentra entre 15.62-37.30 $\mu\text{mol/L}$, destacando sólo nueve genotipos con un contenido de 37.91-46.60 $\mu\text{mol/L} \pm$ Error Estándar, tal es el caso del genotipo 4, 6, 26, 29, 32, 59, 60, 63, 68 y 92 respectivamente.

Dentro de las hexosas, el contenido de sacarosa fue superior, lo cual es común ya que este metabolito se mantiene conforme avanza el desarrollo del cultivo de maíz, como principal transporte de carbono (Zheng *et al.*, 2009; Juárez y Tiessen, 2011).

El almidón es un compuesto importante de energía y de carbono para las células, tanto para las células fotosintéticas (almidón transitorio) y para las células de órganos heterotróficos como el grano (almidón de reserva) (Zeeman, *et al.*, 2002; Sivak y Preiss, 1998).

El contenido de almidón en todos los genotipos fue muy bajo (0.03-0.8 $\mu\text{mol/L}$), lo cual es muy lógico ya que las reservas del tallo en este periodo, se degradan para ser translocados a la mazorca, debido a las necesidades para el llenado final del grano (Figura 4.4). El genotipo 58 presentó el mayor contenido de almidón ($P < 0.05$) pero con menor rendimiento de grano, debido al menor número de plantas y mazorcas presentes en la parcela.

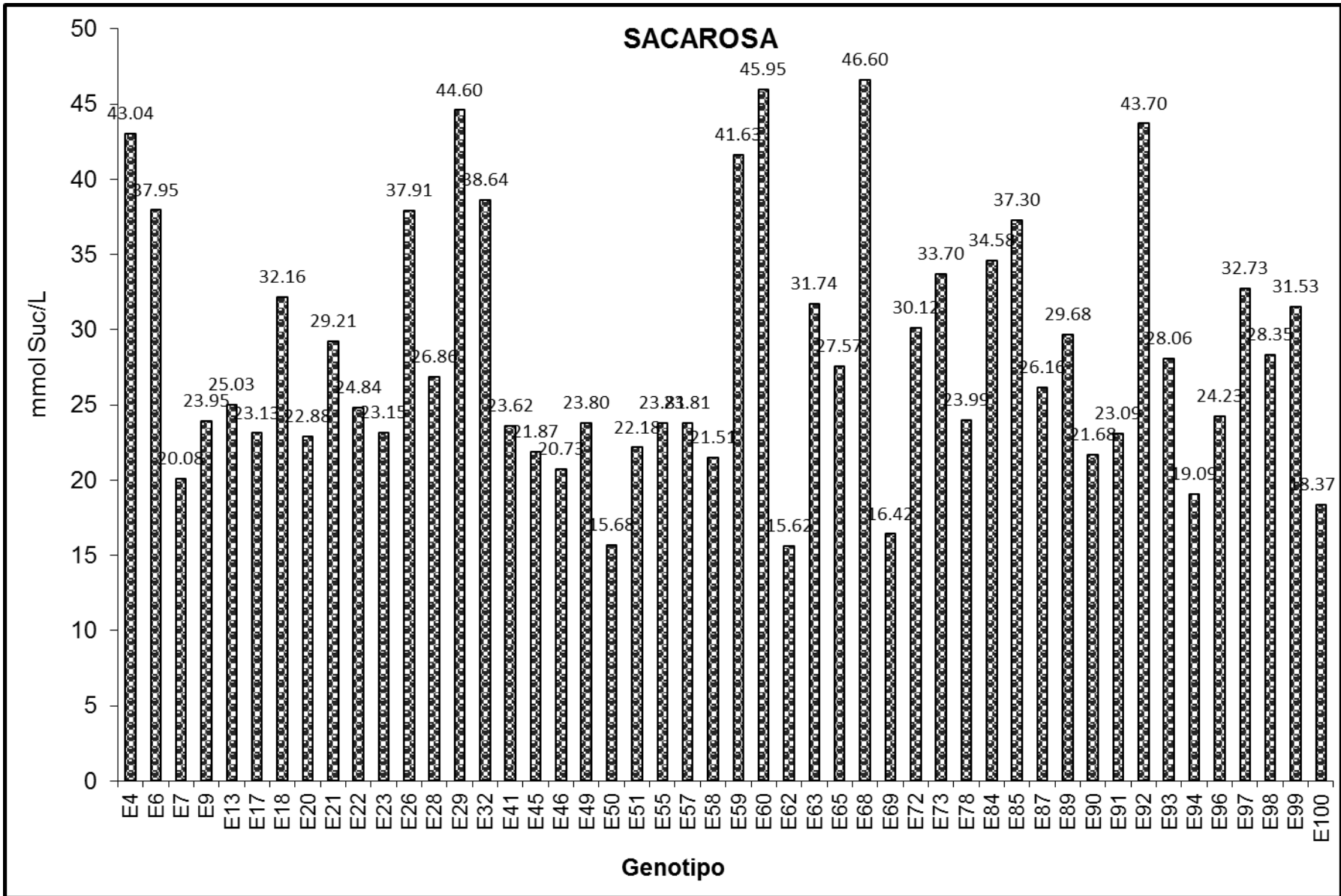


Figura 4.3. Niveles de sacarosa en el tallo de mestizos de maíz, después del periodo de floración, justo cuando el grano se encontraba en el estado lechoso-masoso a 80 dds.

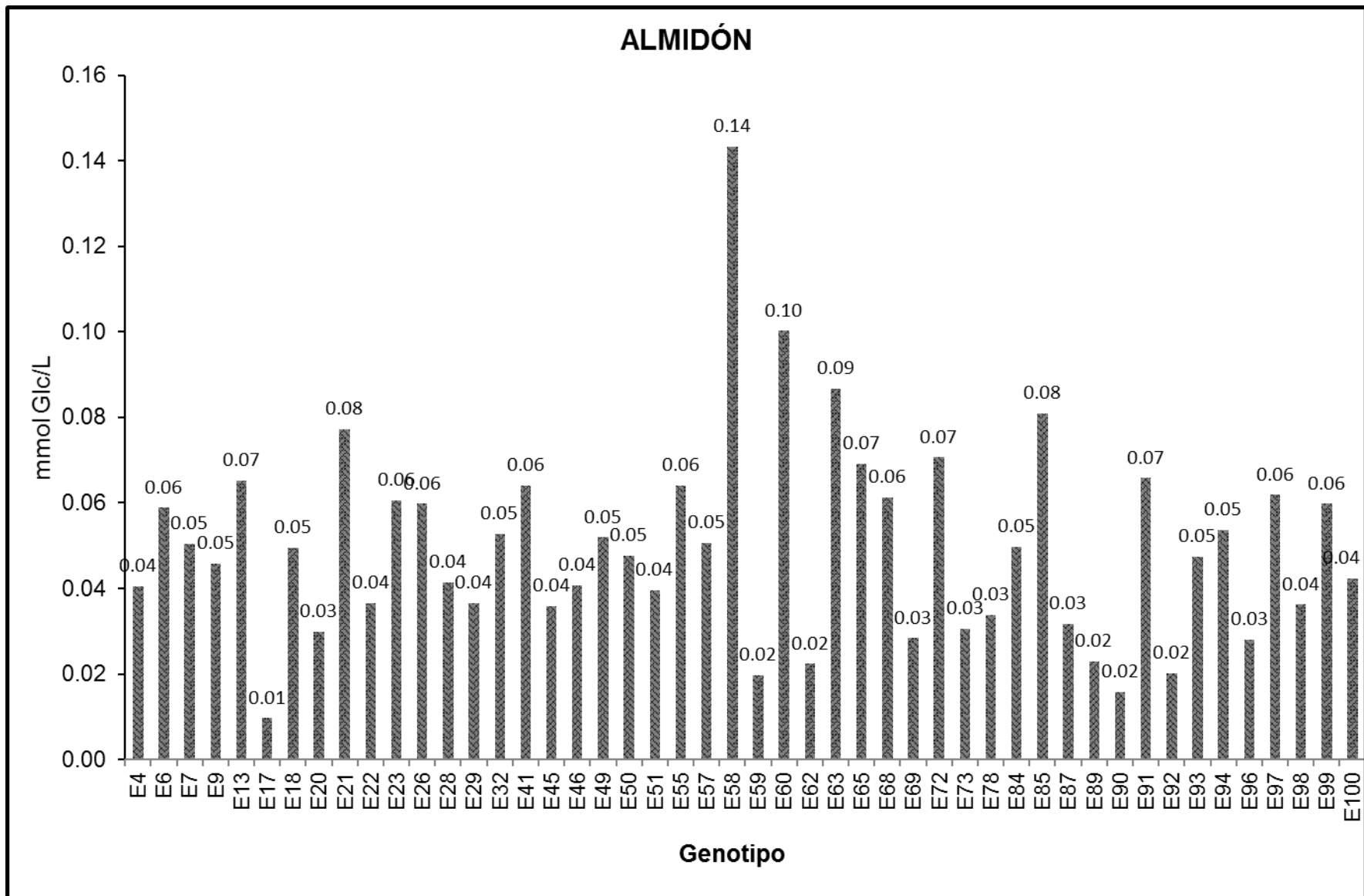


Figura 4.4. Niveles de almidón en el tallo de mestizos de maíz, después del periodo de floración, justo cuando el grano se encontraba en el estado lechoso-masoso a 80 dds.

4.1.1 Hexosas (Glucosa y Fructosa)

Los mejores genotipos del grupo de seleccionados por rendimiento, presentan niveles de glucosa por encima de los 12mmol/L, donde el genotipo que ocupa el cuarto lugar (59) presenta un nivel de 33mmol/L siendo el único que presenta buen nivel de glucosa y rendimiento de grano además del genotipo 60 que presenta buen nivel de glucosa (25mmol/L) pero ocupa el lugar 14 en cuanto a rendimiento, el mejor genotipo para rendimiento es el testigo 93, el cual es un híbrido comercial que presenta un contenido de glucosa de 12mmol/L fig.4.5. El contenido de fructosa presento la misma tendencia aunque los niveles estuvieron por debajo de la glucosa en la mayoría de los genotipos (4-10mmol/L), el genotipo 59 nuevamente presentó el mayor contenido con 16mmol/L, además de ocupar el cuarto lugar en cuanto a rendimiento (fig.4.5).

4.1.2 Sacarosa (SUC)

Para el caso de la sacarosa, presentaron diferencias altamente significativas al $p < 0.001$ donde el contenido en la mayoría de los genotipos seleccionados, estuvo por encima de los 22mmol/L, presentando la misma tendencia que las hexosas, sólo que en este caso, el genotipo 60 presentó el mayor contenido con 46mmol/L seguidos por el genotipo 59, 97, 18, 93 y 22 con 42, 32, 32, 28 y 24mmol/L respectivamente, el genotipo 93 se encuentra en el quinto lugar respecto esto (fig. 4.3).

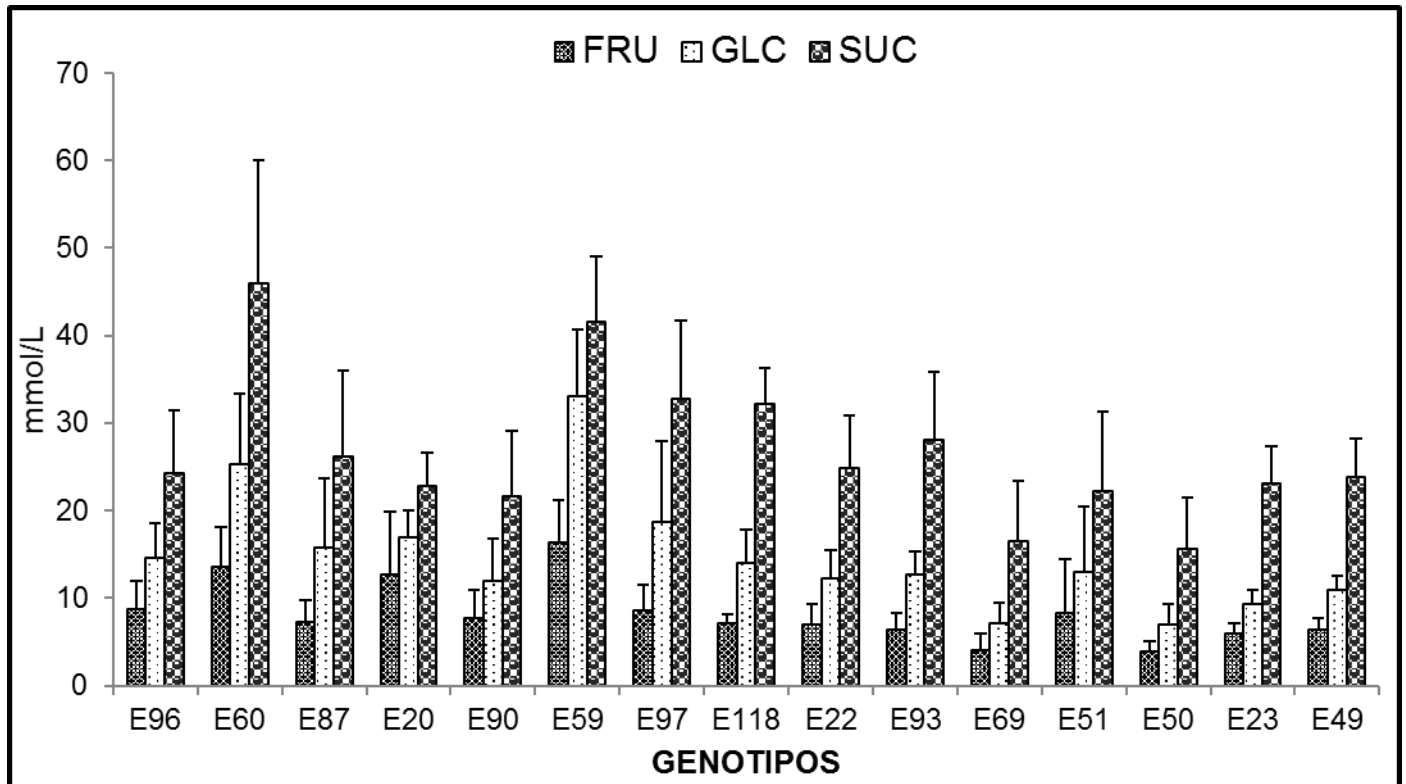


FIGURA 4.5. Contenido de hexosas (glucosa fructosa) y sacarosa en los 15 genotipos con mayor rendimiento de grano. Barras, EEM, N=4.

4.1.3 Almidón (ALM)

Los niveles de almidón en los genotipos seleccionados por rendimiento, fueron estadísticamente igual ($p < 0.05$), distribuidos en un rango de 0.01-0.14mmol/L (fig. 4.4); el genotipo 58 presento el mejor contenido para este metabolito con 0.14mmol/L. El genotipo 93 que fue el mejor en cuanto a rendimiento de grano, presentó un contenido de 0.047mmol/L (fig. 4.6).

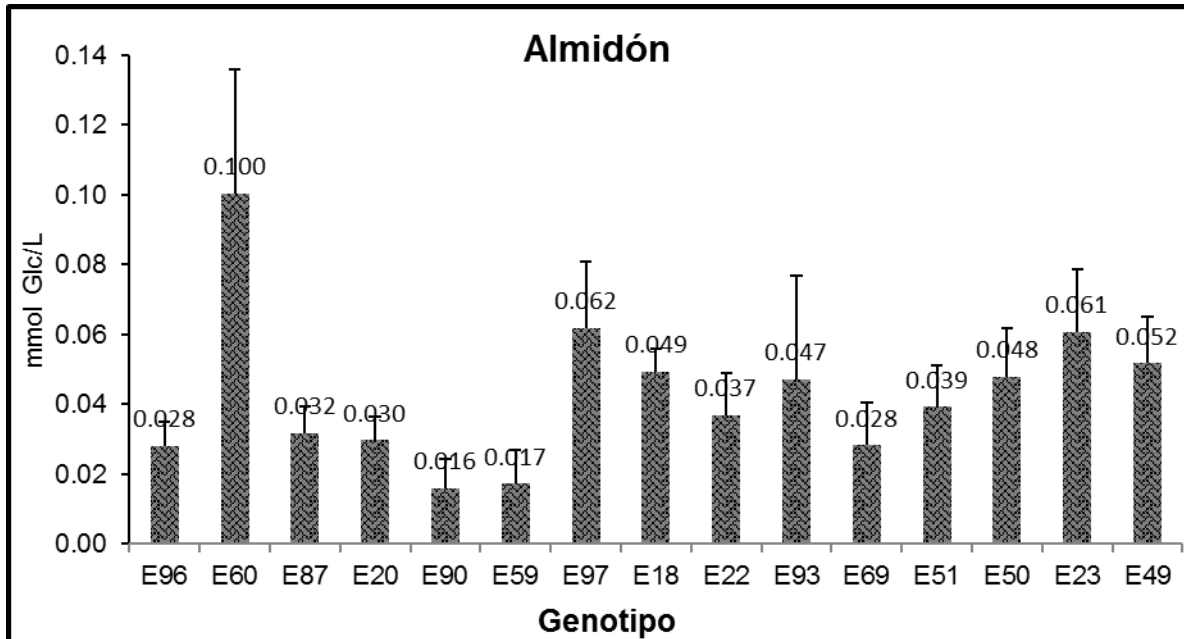


FIGURA 4.4. Contenido de almidón en los 15 genotipos con mayor rendimiento de grano. Barras, EEM, N=4

4.2 Características Agronómicas

En el Cuadro 4.1, se muestran el resumen del análisis de varianza de 37 mestizos y 11 testigos de los cuales 3 son híbridos comerciales. Las repeticiones fueron diferentes estadísticamente en 4 de las 11 variables evaluadas, quizás influenciado por el reducido número de grados de libertad, lo cual se observa también en la fuente de variación Bloc(Rep) donde cuatro variables fueron significativas.

Respecto a tratamientos (Trat), se observa que tanto el grupo de mestizos y los testigos presentaron diferencias estadísticas ($P < 0.01$). Estas diferencias se aprecian en todas las características agronómicas, como también en los carbohidratos no estructurales. La explicación a estas diferencias es a la diversidad presente en los 48 tratamientos donde en principio los 37 mestizos tiene diferente probador y aunado a la diversidad de los testigos utilizados.

Cuadro 4.1. Análisis de varianza, significancia estadística y coeficiente de variación (CV) para las variables evaluadas en los genotipos de maíz en el periodo de verano 2011.

F.V	Rep	Bloc(Rep)	Trat	Error	C.V.%
G.L.	3	4	47	137	
FM(días)	0.03	2.54	23.18**	2.10	2.44
FF(días)	0.69	1.14	23.55**	1.5	1.9
AP(Cm)	57.51	12.77	744.90**	77.8	4.2
AMz(Cm)	0.34	8.15	372.06**	44.2	5.5
COB(1-5)	1.0**	0.0	1.07**	0.2	19.0
SG(1-2)	0.01	0.011	0.70**	0.0	6.7
LMz(Cm)	2.61	4.05**	5.18**	1.1	6.6
NH	1.92	0.60	5.44**	1.9	9.9
NGH	13.99	14.66	39.24**	11.2	9.0
DMz(Cm)	0.14	0.18	0.27**	0.1	6.5
Glc(mmol/L)	431.15**	598**	152.68**	59.9	48.5
Fru (mmol/L)	90.91**	274.45**	41.72**	13.0	42.7
Suc (mmol/L)	74.5	1243.84**	276.63**	110.7	37.0
Alm (mmol/L)	0.005**	0.002*	0.002**	0.0	61.5
REN(x10⁵)	1.44	16.87	88.33**	9.8	16.7

FV= fuente de variación; GL= grados de libertad; FM= floración masculina; FF= floración femenina; AP= altura de planta; AMz= altura de mazorca; COB= cobertura; SG= Stay green; LMz= longitud de mazorca; NH= número de hilera; NGH= número de grano de hilera; DMz= diámetro de mazorca; Glc= glucosa; Fru= fructosa; Suc= sacarosa; Alm= almidón; REN= rendimiento grano; *, ** Significativo al 0.05 y 0.01 de probabilidad.

Los coeficientes de variación (CV) estuvieron en los rangos aceptables, a excepción de los carbohidratos no-estructurales, lo cual se debe a la manipulación en el laboratorio, para realizar los análisis.

En el cuadro 4.2, se presentan los valores medios de 11 variables agronómicas y 4 bioquímicas, de los mejores genotipos, donde se incluye 11 mestizos de los cuales, nueve (9) corresponden al probador CML495, dos (2) al probador CML496, además de cuatro (4) de los testigos.

Cuadro 4.2. Valores medios de mestizos y testigos sobresalientes en rendimiento. UAAAN-UL, 2011.

TRAT	FM	FF	AP	AMz	COB	SG	LMz	NH	NGH	DMz	GLC	FRU	SUC	ALM	REN
49(495)	60	62	223	120	3.0	1	17	14	40	4.6	11	6	24	0.05	7925
59(495)	56	58	223	115	2.0	1	17	14	39	4.7	33	16	42	0.02	7743
22(495)	60	63	221	126	2.0	2	18	15	35	4.7	12	7	25	0.04	7634
23(495)	60	63	216	127	2.0	2	17	13	35	4.5	9	6	23	0.06	7544
18(495)	59	62	228	132	2.0	1	17	14	37	4.5	14	7	32	0.05	7362
87(495)	61	63	215	123	2.0	1	16	15	36	4.7	16	7	26	0.03	7235
20(495)	59	62	214	126	2.0	2	16	14	33	4.6	17	13	23	0.03	7181
50(495)	61	64	202	114	2.5	1	16	14	39	4.7	7	4	16	0.05	7108
51(495)	60	62	211	117	3.5	1	16	15	38	5.0	13	8	22	0.04	6818
M	59	62	216	122	2.3	1.3	16	14	37	4.6	13	7.7	25	0.04	7387
69(496)	59	61	214	124	3.5	1	16	13	38	4.3	7	4	16	0.03	7399
60(496)	61	64	219	137	2.0	1	17	13	37	4.5	25	14	46	0.10	6819
M	60	62	216	130	2.6	1	16	13	37	4.4	13	7.4	27	0.05	7103
93(t)	59	62	235	132	3.5	1	19	16	42	5.4	13	6	28	0.05	8142
97(t)	57	59	202	117	2.5	2	18	14	43	4.5	19	9	33	0.06	8106
96(t)	62	64	217	137	2.5	1	16	13	37	4.5	15	9	24	0.03	7508
90(t)	60	62	200	123	2.0	1	18	14	36	4.4	12	8	22	0.02	6855
Mt	59	61	213	127	2.6	1.2	18	14	39	4.7	14	7.8	26	0.03	7634
MG	59	62	210	121	2.3	1	16	14	37	4.5	16	8	28	0.04	5928
MS	59	62	216	124	2.4	1.2	17	14	37	4.6	14	7.7	26	0.04	7413
DMS (5%)	2	2	12	9.3	0.6	0.1	1.5	2	4.7	0.4	12	6.3	17	0.04	1384

TRAT= tratamiento; FM= floración masculina; FF= floración femenina; AP= altura de planta; AMz= altura de mazorca; COB= cobertura; SG= Permanencia en verde; LMz= longitud de mazorca; NH= número de hilera; NGH= número de grano de hilera; DMz= diámetro de mazorca; GLC= glucosa; FRU= fructosa; SUC= sacarosa; ALM= almidón; REN= rendimiento grano; DMS = diferencia mínima significativa. t = testigo; Mt, MG y MS=Medias de testigos, general y de los selectos.

Tanto mestizos como testigos presentaron diferencias estadísticas ($P < 0.05$) respecto al período de floración, altura de planta y mazorca, número de hileras, granos por hileras y diámetro de mazorca. Con respecto a los carbohidratos no-estructurales valores altamente significativos ($p < 0.05$), a excepción del almidón quien no presenta diferencias, entre los genotipos.

Ocho de los mestizos presentaron la característica permanencia en verde (SG), dos del grupo CML496 y seis del grupo CML495, además de tres de los testigos.

En promedio tanto mestizos como testigos fueron estadísticamente iguales, pues oscilaron de 7387, 7103 y 7634kg/ha para mestizos de los probadores CML495, CML496 y testigos respectivamente. Los grupos son estadísticamente diferentes a la media general (5928 kg/ha). El testigo 93 comercial “oso” fue el de mayor rendimiento.

4.2.1 Floración masculina (FM)

Para esta variable, se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$). La media general oscilo en 59 días, el genotipo que presentó mayor tiempo fue el testigo 96 con 62 días respectivamente. El genotipo 59 con 56 días fue el de menor tiempo. .

4.2.2 Floración femenina (FF)

Al igual que la FM, presentó diferencias significativas ($p < 0.05$), tanto la media general y la de selección fue de 62 días, los genotipo 50, 60 y 96 presentaron el mayor tiempo, con 64 días. Y el genotipo 59 con 58 días fue del menor tiempo.

4.2.3 Altura de planta (AP)

Se observaron que tanto el grupo de los mestizos con el probador 495 y 496 y los seleccionados presentaron media similar con 216cm respectivamente. El grupo de los testigos presento una AP de 213cm. Todos los grupos presentaron mayor, aunque estadísticamente existieron diferencias para esta variable.

4.2.4 Altura de mazorca (AMz)

Se detectó que el grupo de mestizo con el probador (495 y 496) junto con el grupo de los testigos fue superior a la media general (121cm), con 122cm, 130 y 127cm respectivamente. El genotipo que presento mayor AMz fueron el mestizo 60 y el testigo 96 con 137cm superando a la media general (121cm).

4.2.5 Cobertura de Mazorca (COB)

La COB de los materiales fue buena, para el grupo 495 presento una media de 2.2, similar al grupo de los testigos que presentaron buena cobertura (2), el grupo

de los mestizos 496 presento una media de 2.6. En general se observó que la buena COB es muy importante ya que los materiales que presentaron mala cobertura fueron más propensos a ataques de aves.

4.2.6 Permanencia en verde (*Stay Green* “SG”)

Esta característica se presentó en 6 genotipos del grupo de mestizos 495; 49, 59, 18, 87, 51 y 50 respectivamente. En los testigos 93, 96, 90 y en los dos genotipos del grupo del probador 496.

4.2.7 Longitud de mazorca (LMz)

No se observaron diferencias significativas entre los materiales seleccionados, la media para los grupos de mestizos y testigos es de 18, 16 y 18cm respectivamente, relativamente superior a la media general (16cm).

4.2.8 Número de hileras (NH)

El número de hileras osciló en 14, para mestizos y testigos, similar a la media general.

4.2.9 Número de granos/hilera (NGH)

Para esta variable no se observaron diferencias significativas, las medias de mestizos osciló en 37 granos/hilera, similar a la media general pero superado por la media de los testigos (39), lo cual es notorio ya que presento el mayor rendimiento.

4.2.10 Diámetro de mazorca (DMz)

Similar que la variable de NGH, nuevamente los testigos tienen la mejor media (4.7cm), relativamente superior al grupo de mestizos 495 y 496 con una media de 4.6 y 4.4cm respectivamente, ambos grupos (testigos y mestizos 495) superaron la media general de 4.5cm

4.2.11 Rendimiento (REN)

Respecto al rendimiento, el promedio para mestizos y testigos presentaron diferencias estadísticas aunque no significativas, pues oscilaron de 7387, 7103 y 7634kg/ha para mestizos de los probadores CML495, CML496 y testigos respectivamente. Dentro de los grupos se advierten diferencias altamente significativas, diferente a la media general (5928 kg/ha). El testigo 93 comercial (oso) fue el de mayor rendimiento.

En el cuadro 4.3. Se presenta los coeficientes de correlación de las variables evaluadas y su significancia.

Se encontró una alta correlación positiva, tanto en la floración masculina y femenina (0.90); entre altura de planta y mazorca (0.68); así mismo, en las variables: número de granos/hilera (NGH) y longitud de mazorca (LMz) con 0.55; diámetro de mazorca(DMz) y número de hileras(NH) con 51.

Rendimiento de grano (REN), correlacionó positiva y altamente significativa con las variables AP, AMz, COB, LMz y NGH con 0.35, 0.39, 0.31, 0.43 y 0,34 respectivamente.

Para el caso de los carbohidratos no estructurales, se encontró correlación positiva y significativa entre la glucosa(GLC) con fructosa(FRU) y (0.69); y sacarosa (SUC) con 0,69 y 0.76 respectivamente; al igual sucedió entre la sacarosa y fructosa 0.72 El almidón (ALM) correlaciona con la SUC con un valor muy bajo (0.24) aunque significativo ($P < 0.01$).

De los cuatro metabolitos evaluados sólo el almidón presentó una correlación negativa con el rendimiento de grano (-0.16**), aunque fue muy bajo.

Cuadro. 4.3. Análisis de correlación de 15 variables evaluadas en 48 genotipos de maíz, en el periodo de verano 2011.

	FM	FF	AP	AMZ	COB	SG	LMz	NH	NGH	DMZ	GLC	FRU	SUC	ALM	REN
FM	1	0.90**	0.15*	0.08	-0.05	0.08	-0.11	-0.01	-0.06	-0.13	-0.06	0.07	-0.003	0.24**	-0.17*
FF		1	-0.16*	0.08	-0.12	0.03	-0.18**	0.004	0.12	-0.16*	0.04	0.09	-0.01	0.17**	-0.19**
AP			1	0.68**	0.16*	-0.007	0.21**	0.06	0.09	0.24**	0.13	0.13	0.23**	0.005	0.35**
AMZ				1	0.14*	-0.07	0.15*	-0.1	-0.06	0.07	0.1	0.06	0.20*	0.02	0.39**
COB					1	-0.14*	0.11	-0.05	0.16*	0.08	-0.19**	-0.07	-0.014	0.006	0.31**
SG						1	0.18**	-0.01	0.08	-0.04	-0.03	0.05	-0.018	0.08	0.02
LMZ							1	0.07	0.55**	0.33**	-0.02	-0.07	0.03	0.08	0.43**
NH								1	0.03	0.51**	0.04	0.05	0.007	-0.04	0.04
NGH									1	0.27**	0.03	-0.05	-0.006	0.05	0.28**
DMZ										1	-0.06	0.01	-0.07	-0.03	0.34**
GLC											1	0.69**	0.76**	-0.06	-0.04
FRU												1	0.72**	0.09	-0.07
SUC													1	0.24**	-0.02
ALM														1	-0.16*
REN															1

*,** significativo al 0.05 y 0.01 respectivamente

V. CONCLUSIONES

De los resultados anteriores se puede concluir:

- Las diferencias de los mestizos fueron altamente significativos en 8 de las 15 características evaluadas inclusive, rendimiento de grano.
- Los 11 mestizos selectos por rendimiento también presentaron características agronómicas deseables (COB, LMz, NH, DMZ y NGH). Además, superaron estadísticamente a la media general en rendimiento de grano (5928kg/ha).
- El testigo comercial “OSO” fue el de mayor rendimiento con 8142 kg/ha.
- El contenido de Glucosa fue el doble en la media general en los genotipos con respecto a la fructosa, con 16mmol/L y 8mmol/L) respectivamente, aunque con la misma tendencia.
- La sacarosa se presentó en mayor cantidad con 28mmol/L (media general), en todos los genotipos con respecto a las hexosas, se presentó la misma tendencia en los genotipos seleccionados por rendimiento de grano, a excepción de algunos genotipos los cuales presentaron diferencias aunque no tan acentuadas, esto a pesar de que la fecha de muestreo fue en una época de gran demanda por parte de la mazorca para el llenado del grano.
- Para el caso del almidón, los niveles bajos obtenidos en la cuantificación son debido a la degradación de este importante polisacárido de reserva.
- Los genotipos seleccionados por rendimiento también presentaron niveles aceptables de carbohidratos no-estructurales, además de buenas características agronómicas.
- Con los datos obtenidos se concluye que la relación que existe entre el rendimiento de grano y la características cualitativas, pueden asociarse, dependientes del genotipo y las condiciones donde se desarrollan.

VI. LITERATURA CITADA

- Andow, *et al.*, (2004). Agrowin concert protecting the food supply in an era of pharmaceutical and industrial crops. Union of Concern Scientists. USA.
- Aldrich, S.R.; Leng, E.R. 1974. Producción moderna de maíz. Editorial Hemisferio Sur. Argentina. 308 p Andrews, CJ *et al.* (2000). Canadian Journal of Plant Science. 80:87-95.
- Barnabás, B., Jäger, K., Fehér, A. (2008). The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant, Cell & Environment* 31, 11-38.
- Beck, E., and Ziegler, P. (1989) Biosynthesis and degradation of starch in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40:95–118.
- Blankenship, R. E. (2002) *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*. Blackwell Science, Oxford.
- Bernier, G., Have lange, A., Houssa C., Pertitjean A. y Lejeune, P. (1993). Physiological Signals That Flowering. *Plant Cell* 5: 1147-1155.
- Castañón G, Jeffers Dan, Hidalgo H. y Tosquy H. (1998). Prueba de Mestizos de Maíz en el Estado de Veracruz, México. *Agronomía Mesoamericana* 9(2): 89-96.
- Caspar T. Huber, S. C. y Somerville, C. (1985). Alterations in Growth, Photosynthesis, and Respiration in a Starch Less Mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Deficient in Chloroplast Phosphoglucomutase Activity. *Plant Physiol.* 79:11-17.
- Caspar T., Lin, T. P. Kakefuda G., Benbow., L., Preis, J. y Somerville, C. (1991). Mutants of *Arabidopsis* with Altered Regulation of Starch Degradation. *Plant Physiol.* 95: 1181-1188.
- Chiou, T.J., Bush, D.R. (1998). Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4784-4788.

- CIMMYT. (1995). Manejo de los ensayos e informes de los datos para el Programa de Ensayos Internacionales de Maíz del CIMMYT. México. D.F.
- CIMMYT. (2010). CIMMYT Maize Inbred Lines (CML). http://apps.cimmyt.org/english/wps/obtain_seed/cimmytCMLS.htm
- Chávez A., J. L. y López E. 1995. Mejoramiento de plantas 1. UAAAN. México. 158 p.
- COORS J.G., S. PANDEY. (1999). Genetics and exploitation of heterosis in crops. Crop Sci. Soc. Amer. Madison, WI.
- Charles-Edwards, D.A., Doley, D. y Rimmintong, G. M. (1986). Modelling Plant Growth and Development. Academic Press, London.
- FAO (2001). Organización Mundial para la Alimentación y la Agricultura.
- FAO (2009). Organización Mundial para la Alimentación y la Agricultura.
- Figueroa C.J.D., M. G., Acero-Godínez, N. L. Vasco-Mendez, A. Lozano-Guzmán, C. M. Flores-Acosta, J. Gonzales-Hernández (2001). Fortificación y Evaluación de Tortilla de Nixtamal. Arch. Latinoam. Nutricion 51 (3) 293-302.
- Geigenberger, P. (2003). Regulation of sucrose to starch conversion in growing potato tubers. J Exp Bot 54, 457-465.
- Geigenberger, P. (2011). Regulation of starch biosynthesis in response to a fluctuating environment. Plant Physiol 155, 1566-1577.
- Gilbert, N.E.G. (1958). Diallel cross in plant breeding. Heredity 12, 477-492.
- Hay, R.K.M. and A.G. Walker. (1989). An Introduction to Physiology of Crop Yield. Longman Scientific and Technical, Essex, UK.

- Huber, S. C., and Huber, J. L. (1996) Role and regulation of sucrose phosphate synthase in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 431–444.
- Harold K. W. y A. C. Rocker. 1984. Producción de cosechas. Ed. Continental. México.
- INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias). (2006). Maíz forrajero de alto rendimiento y calidad nutricional. Libro Técnico. Ed. INIFAP. Torreón, Coah., México
- Iqbal, M., Khan, K., Rahman, H., Khalil I, H., Sher, H., Bakht, J. (2010). Heterosis For Morphological Traits In Subtropical Maize (*Zea Mays L.*). *Maydica* 55, 41-48.
- Juarez-Colunga, S; Tiessen, A. (2011). The stem as a dynamic carbohydrate reservoir in maize. *Maize Genetics Conference Abstracts*. 53:P058
- Khan, A.H., M.Y. Ashraf, S.S.M. Naqvi and K.A. Siddiquie. (1994). Redistribution of stem carbohydrate in drought resistant and susceptible wheat cultivars under water stress conditions. *Acta Physiol. Plant.* 16(3): 193-198.
- Kohashi, S. J. (1990). Aspectos de la morfología y fisiología del frijol (*Phaseolus vulgaris L.*) y su relación con el rendimiento. Centro botánica. Colegio de postgraduados. Montecillos, México.
- López L M y Espinoza B A. (2003). El Cultivo de Maíz en México y la Contribución del Fitomejorador Para Favorecer la Autosuficiencia. *Rev. Mexicana. Agronegocios*. 12, 596-605.
- Lund, J. E., Ashton, A. R., Hatch, M. D., and Heldt, H. W. (2000) Purification, molecular cloning, and sequence analysis of sucrose-6F-phosphate phosphohydrolase from plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 12914–12919.

- McLaughlin JE, Boyer JS. 2004. Glucose localization in maize ovaries when kernel number decreases at low water potential and sucrose is fed to the stems. *Annals of Botany* 94, 75–86.
- M. R. Vattikonda, R. B. Hunter (1983). Comparison of grain yield and whole-plant silage production of recommended corn hybrids. *Canadian Journal of Plant Science*, 63:601-609
- Morris, L; López, MA. (2000). Impactos del mejoramiento de maíz en América Latina 1966-1997. México D.F. CIMMYT 45 p.
- Paliwal Ripusudan L. Gonzalo Granados, Honor Renée Lafitte y Alejandro D. Violic., (2001). Maíz en los trópicos: mejoramiento y producción. FAO, Organización Mundial para la Alimentación y la Agricultura.
- Paz, J. R.; Molina, G. J.; Bucio, A. L. (1973). Variedades de bajo rendimiento contra variedades de alto rendimiento como probadores para medir la aptitud combinatoria general de las líneas autofecundadas de maíz. *Agrociencia* 11: 43-55.
- Piperno DR, Ranere AJ, Holst I, Dickau R, Iriarte J (2009) Starch grain and phytolith evidence for early ninth millennium B.P. maize from the Central Balsas River Valley, Mexico. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:5019–5024.
- Ramírez L. 2006. Mejora de plantas alógamas. Universidad Pública de Navarra. España. 34 p.
- Ranere AJ, Piperno DR, Holst I, Iriarte J, Dickau R (2009). The cultural and chronological context of early Holocene maize and squash domestication in the Central Balsas River Valley, Mexico. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:5014–5018.
- Roitsch T, Gonzalez MC (2004). Function and Regulation of Plant Invertases: Sweet Sensations. *Trends Plant Sci.* 9: 606-613.

- Salerno, G. L., Echeverria, E., and Pontis, H. G. (1996) Activation of sucrose-phosphate synthase by a protein factor/sucrose-phosphate phosphatase. *Cell. Mol. Biol.* 42: 665–672.
- Scofield, G., Ruuska, S., Aoki, N., Lewis, D., Tabe, L., & Jenkins, C. D. (2009). Starch storage in the stems of wheat plants: localization and temporal changes. *Annals of Botany*, 103(6), 859-868.
- Sierra-Macias, M.; Cano-Reyes, O; Palafox-Caballero, A; Tosquy-Valle, OH; Espinosa-Calderón, A; Rodríguez-Montalvo, FA. (2005). Progreso del mejoramiento genético de maíz (*Zea mays* L.) en el trópico húmedo de México. *Agricultura Técnica en México*, enero-junio, 21-32.
- Springer N.M., R.M. Stupar, (2007). Allelic variation and heterosis in maize: How do two halves make more than a whole? *Genome Res.* 17: 264-275.
- Stitt, M. (1990). Fructose-2,6-bisphosphate as a regulatory molecule in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41: 153–185.
- Singh, R., G. Machlachlan, (1983). Transport and metabolism of sucrose vs hexoses in relation to growth in etiolated pea stem. *Plant Physiol.*, 71, 531–535.
- Shulze W., Shulze, E.D. Stadler, J., Heilmerer, H., Stitt, M. y Mooney, H. A. (1994). Growth and reproduction of *Arabidopsis thaliana* in relation to storage of starch and nitrate in the wild-type and in starch-deficient and nitrate uptake-deficient mutants, *Plant, Cell and Environment* 17:795-809.
- Preiss, J. y Sivak, M. N. (1998) *Genet. Eng.* 20, 177–223.
- Priul, J. L. y Schweber-Dugué, (1992). Source-sink manipulations and carbohydrate metabolism in maize. *Crops Science* 32:751-756.
- Samuel C. Zeeman, Axel Tiessen, Emma Pilling, K. Lisa Kato, Athene M. Donald, y Alison M. Smith, (2002). Starch Synthesis in *Arabidopsis*. Granule Synthesis, Composition, and Structure. *Plant Physiol.* 129: 516-529

- Tester M. y Bacic M. (2005). Abiotic stress tolerance in grasses. From model plants to crop plants. *Plant Physiology* **137**, 791–793.
- Tollenaar M. (1977). Sink-source relationships during reproductive development in maize. *A Review Maydica* 22:49-75.
- Tollenaar M. y Daynard (1978). Leaf senescence in short-season maize hybrids can *J. Plan Sci.* 58:869-874
- Tanaka, A. y J. Yamaguchi (1972). Producción de Material seca, componentes de Rendimiento y Rendimiento del Grano en Maiz. Traducido por J. Kodashi, Centro Botánica, Colegio de Postgraduados. Chapingo. México
- Weber, A.P., and von Caemmerer, S. (2010). Plastid transport and Metabolism of C3 and C4 plants—Comparative Analysis and Possible Biotechnological exploitation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13: 257–265.
- Wolfe D. W., D. W. Henderson, T.C. Hsiao y A. Alvino. (1988). Interactive Water and Nitrogen Effects on Senescence of Maize I. Leaf Area Duration, Nitrogen Distribution, and Yield. *Agronomy Journal* 80:859-864.
- Wilson, J. W. (1972). Control of Crop Processes. In: *Crop Processes Incontrolled Enviroments*. A. R. Rees (ed.) Academic Press. New York, EUA pp. 7-30.
- Xu Zheng, Yutaka Jitsuyama, Takayoshi Terauchi and Kazuto Iwama. (2009) “Effects of Drought and Shading on Non-structural Carbohydrate Stored in the Stem of Potato (*Solanum tuberosum* L.)”. *Plant Production Science*, Vol. 12, pp.449-452

VII. APENDICE

T	FM	FF	AP	AMZ	COB	SG	LMZ	NH	NGH	DMZ	GLC	FRU	SUC	ALM	REN
93	59	62	235	132	3.5	1	19	16	42	5.4	13	6	28	0.05	8142
97	57	59	202	117	2.5	2	18	14	43	4.5	19	9	33	0.06	8106
49	60	62	223	120	3.0	1	17	14	40	4.6	11	6	24	0.05	7925
59	56	58	223	115	2.0	1	17	14	39	4.7	33	16	42	0.02	7743
22	60	63	221	126	2.0	2	18	15	35	4.7	12	7	25	0.04	7634
23	60	63	216	127	2.0	2	17	13	35	4.5	9	6	23	0.06	7544
96	62	64	217	137	2.5	1	16	13	37	4.5	15	9	24	0.03	7508
69	59	61	214	124	3.5	1	16	13	38	4.3	7	4	16	0.03	7399
18	59	62	228	132	2.0	1	17	14	37	4.5	14	7	32	0.05	7362
87	61	63	215	123	2.0	1	16	15	36	4.7	16	7	26	0.03	7235
20	59	62	214	126	2.0	2	16	14	33	4.6	17	13	23	0.03	7181
50	61	64	202	114	2.5	1	16	14	39	4.7	7	4	16	0.05	7108
90	60	62	200	123	2.0	1	18	14	36	4.4	12	8	22	0.02	6855
60	61	64	219	137	2.0	1	17	13	37	4.5	25	14	46	0.10	6819
51	60	62	211	117	3.5	1	16	15	38	5.0	13	8	22	0.04	6818
28	59	62	211	131	2.5	1	15	13	36	4.3	13	6	27	0.04	6746
63	61	64	202	134	2.5	1	16	14	39	4.7	12	7	32	0.09	6728
29	60	62	214	122	3.0	1	17	13	35	4.2	25	12	45	0.04	6691
94	56	58	218	115	1.5	1	17	16	38	5.3	11	6	19	0.05	6438
89	61	63	210	122	1.5	1	15	15	33	4.6	22	9	30	0.02	6419
26	62	64	227	118	2.0	1	17	14	37	4.4	20	15	38	0.06	6401
57	59	61	206	116	2.5	2	16	12	39	4.6	11	6	25	0.04	6401
73	59	62	202	122	3.0	1	16	15	37	4.3	20	11	34	0.03	6401
62	60	63	187	118	2.0	1	17	12	38	4.3	10	5	16	0.02	6329
85	62	59	221	127	3.0	2	19	13	38	4.5	16	9	37	0.08	6202
100	59	62	185	103	2.0	2	19	13	44	4.4	7	4	18	0.04	6075
17	57	60	207	120	2.0	1	16	13	36	4.8	15	7	23	0.01	6039
41	63	65	205	136	2.5	1	16	13	39	4.2	13	7	24	0.06	5876
98	56	57	202	116	2.0	1	15	15	36	4.9	15	8	28	0.04	5839
78	56	59	203	125	2.0	1	16	13	33	4.2	12	4	24	0.03	5730
46	57	59	186	104	2.5	1	14	14	37	4.5	12	9	21	0.04	5640
72	59	62	219	130	3.0	1	15	14	36	4.3	14	6	30	0.07	5603
6	58	61	235	130	2.5	2	17	16	41	4.6	26	11	38	0.06	5513
68	56	59	204	118	2.5	1	17	13	40	4.3	27	11	47	0.06	5495
9	60	64	232	137	2.0	1	15	14	34	4.5	14	9	24	0.05	5477
32	59	62	215	129	2.0	1	16	12	37	4.1	23	6	39	0.05	5368
7	60	63	209	119	2.0	1	16	17	37	4.5	12	6	20	0.05	4878
55	60	62	199	113	2.0	2	15	14	40	4.6	9	7	24	0.06	4878
13	59	62	226	127	1.5	1	16	14	32	4.5	11	5	25	0.07	4588
4	58	61	233	133	1.5	2	16	15	32	4.5	26	13	43	0.04	4479

99	59	61	194	114	2.0	1	16	14	44	4.5	17	9	32	0.06	4189
21	61	63	218	124	2.0	2	16	12	36	4.2	19	13	29	0.08	4062
84	66	68	196	121	2.0	1	16	14	41	4.7	24	15	35	0.05	3863
91	68	70	172	100	1.5	2	15	16	37	4.3	16	10	23	0.07	3754
92	62	65	198	111	2.5	1	13	15	26	4.2	22	13	44	0.02	3210
45	56	59	195	101	2.0	1	16	15	40	4.4	27	7	22	0.04	3192
65	64	66	212	127	2.0	1	16	14	35	4.5	13	6	28	0.07	2557
58	60	63	195	101	1.5	1	15	14	31	4.3	10	6	22	0.14	2122
MG	59	62	210	121	2.3	1	16	14	37	4.5	16	8	28	0.04	5928
MI	56	57	172	100	2	1	13	12	26	4.1	7	4	16	0.01	2122
MX	68	70	235	137	3.5	2	19	17	44	5.4	33	16	47	0.14	8142
DMS(5%)	2	2	12	9.3	1	0.1	1	2	4.7	0.4	12	6.3	17	0.04	1384

FV= fuente de variación; GL= grados de libertad; FM= floración masculina; FF= floración femenina; AP= altura de planta; AMz= altura de mazorca; COB= cobertura; SG= Stay green; LMz= longitud de mazorca; NH= número de hilera; NGH= número de grano de hilera; DMz= diámetro de mazorca; Glc= glucosa; Fru= fructosa; Suc= sacarosa; Alm= almidón; REN= rendimiento grano; MG= media general; MIN= mínima; MAX= máxima; DMS= diferencia menos significativa.

VIII. ANEXOS

8.1 Protocolo de Determinación de Azúcares



Determinación de azúcares en tallo

LAB PROTOCOLS

Dr. Axel Tiessen**

Laboratorio de Metabolómica y Fisiología Vegetal
Cinvestav Campus Guanajuato

Determinación de AZÚCARES en JUGO de TALLO de maíz

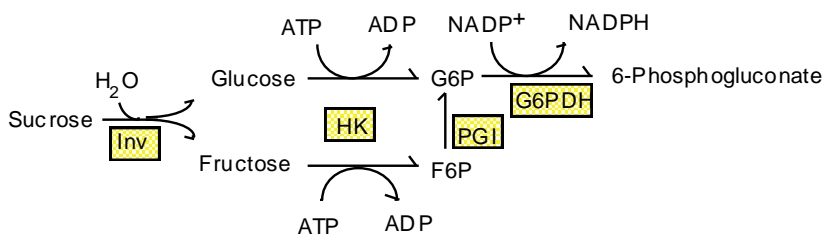
MARCO TEÓRICO

The principle of measurement consists in enzymatically coupling the hexokinase reaction with Glucose-6-P-dehydrogenase (G6PDH) reaction and measuring absorbance at 340nm versus 405nm (Microplatte).

Microplatte thickness of well (1ml = 2.85 cm)

Microplatte coefficient for NADPH at 340nm (ref. 405nm) = 17.7 $1/\mu\text{mol}$

The sugars are stoichiometrically converted to G6P and later to 6-phosphogluconate. For each mol of hexose one mol of NADPH is produced. For each mol of sucrose two moles of NADPH are produced. This is later considered in the calculations by dividing the sucrose signal by two. The increase of absorbance at 340nm is quantified in the microplatte reader (Anthos HtII).



After measuring and monitoring the blind value (should be constant) the reaction is started with hexokinase. After completion of the reaction phosphoglucose-isomerase is added and after completion Invertase is finally added.

** 2010 Cinvestav Irapuato Lab Protocols Dr Axel Tiessen

To ensure that the assay is not limited by cofactors, the values should be linear in respect to amount of extract used (2µl - 40µl). Always include two blank wells without extract but adding enzyme. The hepes buffer is used as substitute for Imidazole (classical assay). Imidazole is a reducing agent and will yield a signal if stored for too long at 4°C.

REACTIVOS

⇒ Sugar Assay. Esta solución puede congelarse para usos posteriores. A continuación se presenta una tabla resumen para preparar diferentes volúmenes.

"Sugar Assay"	p/ 20mL	40	100	120	150
Buffer Hepes+Mg (mL)	19.8	39.6	99	118.8	148.5
NADP+ (mg)	12	24	60	72	90
ATP (mg)	20	40	100	120	150
G6PDH Yeast Roche (uL)	20	40	100	120	150

⇒ Enzimas. Preparar en eppis' 2mL

"Enzimas"	Abrev	Cantidad	V hepes
Hexocinasa	HK	50 uL	1500 uL
Fosfogluco Isomerasa	PGI	50 uL	1500 uL
Invertasa	Inv	83mg	1500 uL

NOTA: Originalmente se diluía 1:10, ahora aquí diluyo 1:30

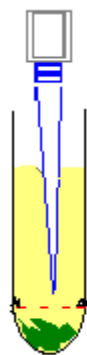
* Preparar en eppi's 1.5 ó 2

METODOLOGÍA

El siguiente protocolo está adecuado para jugo almacenado en microplaca DeepWell, y el uso de micropipetas multicanal. Si la placa se almacenó en Revco, descongele a T_{amb}.

- 1) La determinación se realiza a partir de 1mL de jugo de maíz.
- 2) Centrifugue a V_{máx} x 15 min.
 - a) Necesita los adaptadores Sorvax ® para las microplacas en la Mega-centrífuga.

- b) Nivele el peso de las microplacas usando cinta adhesiva
 - c) Procure usar tapas del mismo material, sellar bien la microplaca.
- 3) Retire el sobrenadante en otra microplaca DeepWell, aprox 800uL.
- a) Al pipetear, baje las puntas máximo hasta donde las celdas comienzan a ser cóncavas



Conviene apoyar la pipeta hacia cualquier lado de la microplaca. Donde se señala, hay un borde que ayuda a no bajar más de lo necesario. Si no se apoya, se corre el riesgo de bajar hasta la pastilla y esto puede generar interferencias al leer en el espectro.

- b) Realizar una dilución 1:50 en buffer 100mM HEPES pH7 + 3mM MgCl₂.
 - i) En una microplaca Sarsted ©:

5uL sobrenadante

+

245uL buffer HEPES

- 4) Mezcla de reacción:

En placa 96'	En placa 384'
+200 SugarAssay	+ 70-100 Sugar Assay
+ 10-20 uL muestra diluída	+ 10 uL muestra diluída
Protocolo: SugarAssay1	Protocolo: SugarAssay384Placa

* NOTA: Al pipetear la muestra, introduzca bien las puntas en los pozos que ya contienen el reactivo anterior, y antes de vaciarla por completo, resuccione y libere suavemente la muestra. Y después de 2-3 veces, libérela por completo, a pesar que se formen burbujas. Si se forman burbujas, con la misma agitación se rompen, o puede ayudarse de una aguja fina.

- 5) Agitar en termoblock a T_{amb} x 10s (900rpm)

- 6) Leer a 340nm en el lector de microplacas Bio Tek ©: protocolo correspondiente
 - a) Leer el Blanco y esperar a que se estabilice en el tiempo
- 7) Añadir la enzima Hexocinasa (HK), agitar x 10s, Leer nuevamente y esperar a que deje de crecer la curva y se estabilice. Valor “end HK”
- 8) Retirar la microplaca y añadir la enzima Fosfo-Gluco-Isomerasa (PGI), agitar x 10s, Leer nuevamente y esperar a que deje de crecer la curva y se estabilice. Valor “end PGI”
- 9) Retirar la microplaca y añadir la enzima Invertasa (Inv), agitar x 10s, Leer nuevamente y esperar a que deje de crecer la curva y se estabilice. Valor “end Inv”

RESULTADOS

Las lecturas correspondientes a “end Blanco”, “end HK”, “end PGI” y “end Inv” se vierten en Excel a la plantilla **Sugar (Muster_JUGO TALLO)**

Para los cálculos, el volumen total en la celda no es relevante, sólo se necesita saber el volumen de muestra en cada celda; 17.7 se sustituye por 49.7 en el caso de placa de 384 pozos.

$$Glucose\left(\frac{mmol}{L}\right) = \frac{\Delta abs}{17.7\ \mu mol^{-1}} * \frac{1}{V_{sampleDIL}\ (\mu L)} * FD * \frac{1mmol}{1000\mu mol} * \frac{10^6\ \mu L}{1L}$$

$$Glu\ cos\ e\left(\frac{g}{L}\right) = X_{Glc}\left(\frac{mmol}{L}\right) * \frac{180.16mg}{1mmol_{Glc}} * \frac{1g}{1000mg}$$

NOTAS adicionales:

- * Las enzimas se añaden a la microplaca con la pipeta **Auto Rep** (RAINNI) en la posición 1, usando una punta de 200uL; se añaden por columnas.
- * La pastilla que queda después de centrifugar se usa para cuantificar almidón.
- * El sobrenadante (aprox. 800uL) se usa para otros ensayos; de lo contrario, almacénelo a -40°C por si hay necesidad de repetir algunas muestras.

- * El diseño de acomodar las muestras en las microplacas depende de usted, del número de muestras, del número de repeticiones. Haga al menos una repetición para cada celda original
- * Las repeticiones en placa de 384' se hacen en la misma placa hacia abajo.
- * Procure mantener las enzimas en baño de hielo, y el "Sugar Assay" a T_{amb}
- * Los valores son confiables a una OD max=2.0 ya que después la mezcla de reacción podría estar saturada y dar siempre una misma lectura pareciendo que es porque ya está estabilizada, cosa que pudiera deberse a falta de reactivos.
- * Si requiere hacer dilución mayor a 50, use placa DeepWell. El mínimo volumen recomendado para pipetear es 5uL.

REFERENCIAS

-

8.2 Protocolo de Determinación de Almidón



Determinación de almidón en tallo

LAB PROTOCOLS

Dr. Axel Tiessen**

Laboratorio de Metabolómica y Fisiología Vegetal
Cinvestav Campus Guanajuato

Determinación de almidón en jugo de tallo de maíz

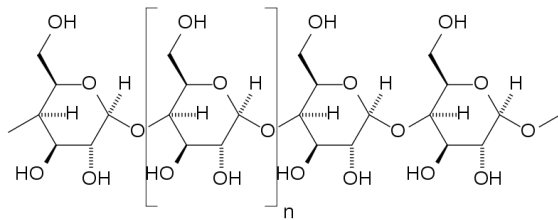
MARCO TEÓRICO

El almidón es un polisacárido de reserva alimenticia predominante en las plantas, constituido por amilosa y amilopectina.

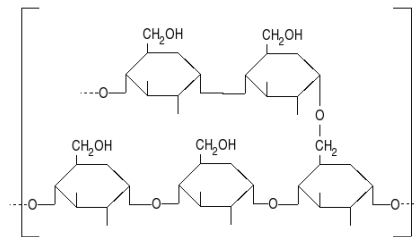
La amilosa es el producto de la condensación de D-glucopiranosas por medio de enlaces glucosídicos $\alpha(1,4)$, que establece largas cadenas lineales con 200-2500 unidades y pesos moleculares hasta de un millón; es decir, la amilosa es una α -D-(1,4)-glucana cuya unidad repetitiva es la α -maltosa. Tiene la facilidad de adquirir una conformación tridimensional helicoidal, en la que cada vuelta de hélice consta de seis moléculas de glucosa.

La amilopectina se diferencia de la amilosa en que contiene ramificaciones que le dan una forma molecular a la de un árbol; las ramas están unidas al tronco central (semejante a la amilosa) por enlaces α -D-(1,6), localizadas cada 15-25 unidades lineales de glucosa. Su peso moleculares muy alto ya que algunas fracciones llegan a alcanzar hasta 200 millones de daltones. La amilopectina constituye alrededor del 75% de los almidones más comunes. Algunos almidones están constituidos exclusivamente por amilopectina y son conocidos como céreos.

** 2010 Cinvestav Irapuato Lab Protocols Dr Axel Tiessen



Amilopectina



Amilosa

La amiloglucosidasa o glucoamilasa es una enzima que tiene la capacidad de hidrolizar tanto los enlaces $\alpha(1,4)$ como los $\alpha(1,6)$ de las glucanas; su acción prolongada puede causar la ruptura total del almidón, por lo que se emplea en la fabricación los jarabes de glucosa.

La amilasa, denominada también ptialina o tialina, es un enzima hidrolasa que tiene la función de digerir el glucógeno y el almidón para formar azúcares simples, se produce principalmente en las glándulas salivares y en el páncreas. Tiene un pH de 7. Las α -amilasas son enzimas dependientes de cloruro, completamente afuncionales en ausencia de iones de cloruro. Actúan a lo largo de cualquier punto de la cadena de los carbohidratos, descomponiéndolos en dextrina desde la amilopectina. Dado que puede actuar en cualquier punto de la cadena es más rápida que la β -amilasa. En los animales es una enzima digestiva mayor y su pH óptimo está entre 6.7 y 7.2

REACTIVOS

⇒ Mezcla de degradación. Esta solución debe prepararse el mismo día que se va a utilizar. La siguiente tabla muestra las cantidades para diferentes volúmenes

	p/ 1mL (5muestras)	5 (25muestras)	10 (50muestras)	20 (100muestras)	40 (200muestras)
Amilo glucosidasa (Fluka)	1.7	8.5	17	34	68
α -amilasa (Sigma)	2	10	20	40	80
α -amilasa (Fluka)	2	10	20	40	80
Buffer Acetatos (sin dil)	1	5	10	20	40
Buffer Acetatos (dil 2:5)	3.5	17.5	35	70	140

⇒ Sugar Assay (igual que para azúcares)

⇒ Enzimas. Sólo se necesita Hexocinasa (HK). Es la misma que para azúcares.

METODOLOGÍA

El siguiente protocolo está adecuado para jugo almacenado en microplaca DeepWell, y el uso de micropipetas multicanal. Si la placa se almacenó en Revco, descongele a T_{amb} .

10) La determinación se realiza a partir de 1 mL de jugo de maíz.

11) Centrifugue a $V_{m\acute{a}x}$ x 15 min.

- a) Necesita los adaptadores Sorvax ® para las microplacas en la Mega-centrífuga.
- b) Nivele el peso de las microplacas
- c) Procure usar tapas del mismo material, sellar bien la microplaca.

12) Retire el sobrenadante en otra microplaca DeepWell, aprox 800 uL.

- a) Al pipetear, baje las puntas máximo hasta donde las celdas comienzan a ser cóncavas



Conviene apoyar la pipeta hacia cualquier lado de la microplaca. Donde se señala, hay un borde que ayuda a no bajar más de lo necesario. Si no se apoya, se corre el riesgo de bajar hasta la pastilla y esto puede generar interferencias al leer en el espectro.

- b) El sobrenadante se usa para leer AZÚCARES y la pastilla se conserva en la placa deepwell.

13) Lavar la pastilla con EtOH 80%,

- a) Añada 500 uL usando el dispensador (Dispensette ®)
- b) Selle bien la placa con las tapas de silicón (AXYMAT) y agite vigorosamente hasta suspender completamente la pastilla en el solvente.

- c) Si hay pastillas que no se resuspenden, abra la placa y remuévalas con una aguja o jeringa.
- d) Nivele y centrifugue las microplaca a Vmax por 15min.
- e) Abra la placa; en la tarja, inviértala suavemente para desechar el sobrenadante.
- f) Añada nuevamente 500uL EtOH 80% y repita los pasos anteriores hasta tener una pastilla limpia.

14) Pastilla limpia:

- a) Añadir 500uL de KOH 10mM (con pipeta o Dispenssette ®) procure añadir la cantidad indicada, ya que este volumen SÍ influye en los cálculos. Agite vigorosamente para que la pastilla quede bien expuesta al KOH.
- b) Incubar a 99°C a 7000rpm en termomixer x 2.5 hrs. Selle la placa con cinta Al en todos sus bordes.
- c) Retirar la microplaca y poner en baño de hielo para bajar la T

15) Añadir 700uL mezcla degradación diluída 2.5 veces

- i) Use pipeta multicanal (200+200+200+100)

16) Incubar a 37 °C toda la noche (8-16hrs)

17) Centrifugar a Vmax x 15min

18) Recuperar sobrenadante en otra microplaca deepWell

19) Mezcla de reacción:

En placa 96'	En placa 384'
+200 SugarAssay	+ 70-100 Sugar Assay
+ 10 -20 uL muestra sobrenadante	+ 10 uL muestra sobrenadante
Protocolo: SugarAssay1	Protocolo: SugarAssay384Placa

* NOTA: Al pipetear la muestra, introduzca bien las puntas en los pozos que ya contienen el reactivo anterior, y antes de vaciarla por completo, resuccione y libere suavemente la muestra. Y después de 2-3 veces, libérela por completo, a pesar que se formen burbujas. Si se forman burbujas, con la misma agitación se rompen, o puede ayudarse de una aguja fina.

- 20) Agitar en termoblock a T_{amb} x 10s (1000rpm)
- 21) Leer a 340nm en el lector de microplacas Bio Tek © en el protocolo elegido (96' ó 384')
- a) Leer el Blanco y esperar a que se estabilice en el tiempo
- 22) Añadir la enzima Hexocinasa (HK), agitar x 10s, leer nuevamente y esperar a que deje de crecer la curva y se estabilice. Valor "end HK"

RESULTADOS

Las lecturas correspondientes a "end Blanco" y "end HK" se vierten en Excel a la plantilla **Starch (Muster_JUGO TALLO)**

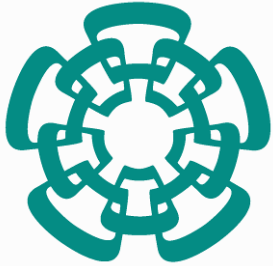
La siguiente fórmula es para placa 384, si fuera el caso de placa de 96' sólo se sustituye "49.7" por "17.7".

$$Glu\ cos\ e\left(\frac{mmol}{L}\right) = \frac{\Delta abs}{49.7\ \mu mol\ l^{-1}} * \frac{1}{V_{sample\ DIL}\ (\mu L)} * \frac{V_{total\ DE\ extraccion}\ (\mu L)}{1\ mL\ jugo} * FD * \frac{1\ mmol}{1000\ \mu L} * \frac{1000\ mL}{1\ L}$$

FD= factor de dilución

VsampleDIL= volumen de sobrenadante que se añade a la mezcla de reacción (10uL)

VtotalDEextracción= KOH (uL) + MezclaDegradación (uL)= 500+700 = 1200uL



8.3 Protocolo de extracción de jugo del tallo de maíz

LAB PROTOCOLS

Dr. Axel Tiessen**

Laboratorio de Metabolómica y Fisiología Molecular

Cinvestav Campus Guanajuato

EXTRACCIÓN de JUGO de TALLO de MAÍZ

- 1) **Preparar el lugar donde se va a realizar la extracción.** En este caso es el invernadero. Disponer o contar con lo siguiente:
 - a) Una mesa larga
 - b) Ensamblar el molino extractor de jugo, conectar las extensiones necesarias para la toma de electricidad
 - c) Fijar con diurex la cinta métrica sobre la mesa
 - d) 2 balanzas (precisión +/-1 es suficiente), verificar que estén calibradas con la pesa respectiva (200g). Preferentemente que sean de pila, que no haya necesidad de conectarlas a la luz, porque el extractor hace que la corriente varíe mucho y las balanzas no se estabilizan en ese caso.
 - e) Disponer de 2 cubetas. Una se usa para coleccionar el bagazo que sale de la molienda, y la otra para coleccionar el jugo que se deshecha
 - f) Disponer de un balde grande o carretilla para depositar la basura orgánica que se vaya generando.
 - g) Microplacas DeepWell 2mL de 96 pozos limpias y con su respectiva tapa. Marcarlas previamente con Sharpie. Se recomienda utilizar una nomenclatura establecida y que sea consecutiva (Placa 1 A, fecha, experimento, nombre tesista, asesor... Placa 2 A..... Placa 3A). Obtener 2 repeticiones (placa A y B). Marcar los encabezados de las placas previamente, ya que cuando se ponen en hielo los rótulos en columnas e hileras se nublan.
 - h) Hielo seco. Con 2kg es suficiente para 2 microplacas 96' durante unas 6 horas. Se podría usar N liq; sin embargo éste se evapora muy rápido y es un gasto mayor, sobre todo si son muchas plantas las que se van a moler. Considerar también el tipo de análisis que se realizará con el jugo.

** 2011 Cinvestav Irapuato Lab Protocols Dr Axel Tiessen

- i) 1 cuchillo, franela, sanitas; tijeras de podar para trozar los tallos más rápido
- j) 2 vasos de precipitado de peso muy similar (+/-0.2g), pipeta 1000uL, puntas para pipeta (se recomienda trozarle la ‘puntita’ a la punta que se va a usar, para evitar se tape al succionar la alícuota)
- k) Disponer del Libro de Campo y Formato para anotar los parámetros físicos: “Libropaco.xls” es el borrador, y éste se puede adaptar a las necesidades de los parámetros que se vayan a medir, por ejemplo “Libropaco_sheila 5 híbridos”.

2) Sobre las muestras que se van a coleccionar:

- a) Tratar de moler las plantas al tiempo que se vayan cortando. Si es un número de plantas mayor a 10 quizá convenga cortar por grupos, no todas al mismo tiempo, para evitar se deshidraten o sufran cambios apreciables en el contenido de metabolitos.
- b) Si las plantas están lejos del lugar de trabajo, quizá convenga desde el día anterior marcar las que se van a cortar para evitar perder tiempo en su selección. Esto es importante para evitar variaciones por la hora del día, es decir tratar de trabajar en un mismo rango de horario.

3) Una vez colectadas, dependiendo de los parámetros físicos que se vayan a medir, puede ser más o menos tardado. Considerando que se tomarán los sigs, entonces

W tallo+hojas (g)	Largo Hoja Bandera (cm)	W espiga (g)	Num Jilotes / planta	W Total Jilotes (g) / planta	W total Totomoxtle (g) / Planta	W total Elotes (g) / Planta	Num Hojas tallo floral	W tallo ENTERO con vainas(g)	W tallo MOLER con vainas (g)	W jugo (g)
-------------------	-------------------------	--------------	----------------------	------------------------------	---------------------------------	-----------------------------	------------------------	------------------------------	------------------------------	------------

- a) Retire la espiga 1cm aproximadamente por encima de la hoja bandera y pésela = [W espiga (g)].
- b) Retire los jilotes (con todo y pedúnculo) y anote número de jilotes y su peso total = [Num Jilotes / planta]; y [W Total Jilotes (g) / planta]
- c) Pese el resto de la planta (tallo + hojas) = [W tallo+hojas].
- d) Elimine hojas foliares y pese el tallo (incluye vainas) = [W tallo ENTERO con vainas (g)].
- e) Identifique el nudo donde estaba atado el jilote más grande. El segmento de tallo que se molerá será contando 2 entrenudos por encima de dicho nudo y 2 por debajo del mismo (= 5 entrenudos). Corte con tijeras de una mano (usadas para podar). El peso de este segmento será = [W tallo MOLER con vainas (g)].
- f) Separe totomoxtle (incluye el pedúnculo) del resto del elote, y pese por separado los tejidos = [W total totomoxtle (g) / planta]; y [W total elotes (g) / planta]. Elimine los pelos del elote, su peso se saca por diferencia posteriormente.
- g) Obtenga el promedio del número de hojas de totomoxtle de los jilotes = [Num Hojas tallo floral].
- h) Muela el segmento de los 5 entrenudos y obtenga el peso de jugo [W jugo (g)].

4) **Consideraciones adicionales**

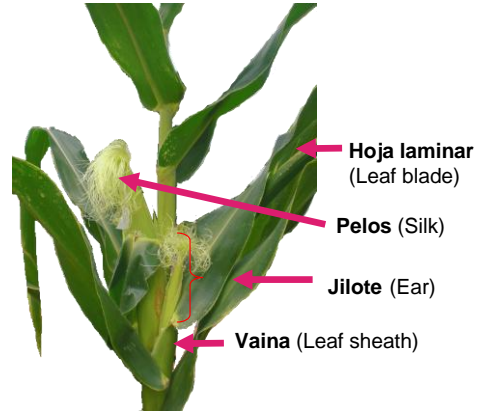
- a) Si el extractor se 'atora' al moler el tallo, introdúzcalo como moviéndolo y metiéndolo diagonalmente. Si los tallos son muy gruesos y duros, parte de ellos se pueden partir longitudinalmente.
 - b) El jugo se colecta en los vasos de precipitado de peso similar. Ladeé el molino para que escurra el jugo más rápido. El recipiente donde se colecta debe estar en un baño frío (una hielera pequeña con hielo normal o seco), para conseguir bajar la temperatura (a 4°C idealmente) y disminuir posibles cambios metabólicos, enzimáticos, etc.
 - c) Tomar alícuotas de 1mL de jugo. Una vez extraído, mover el jugo en círculos al derecho y al revés para tratar de homogeneizar. Tomar un primera alícuota y desecharla (funciona como un lavado de la punta), volver a homogeneizar y tomar una segunda alícuota y ésta sí depositarla en la celda correspondiente (placa A). Tomar la tercer alícuota (en placa B). Desechar el jugo restante.
 - d) Las placas Deep Well o los recipientes donde se vayan a almacenar las muestras deben estar en un baño de hielo seco o N liq.
 - e) Cada que se muele un tallo, abrir el extractor y retirar el bagazo.
 - f) Cada 3 tallos aprox, o cada que cambies de genotipo abrir completamente el extractor (retirar el cedazo) para evitar que se "taponee" y que se mezcle jugo de diferentes muestras.
 - g) El vaso se limpia y seca con franela y/o sanitas.
- 5) **Una vez colectadas las muestras**, se lava y limpia el extractor, y se recoge todo el material usado.
- 6) **Almacenamiento muestras.** Se recomienda que las microplacas A se guardan a -40°C ó a -20°C, las placas B se congelan a -80°C

ANEXOS

Anexo 1. Pasos secuenciales en la toma de muestra y extracción de jugo de tallo de maíz.

PROCESO MUESTREO Y EXTRACCIÓN DE JUGO DE TALLO DE MAÍZ

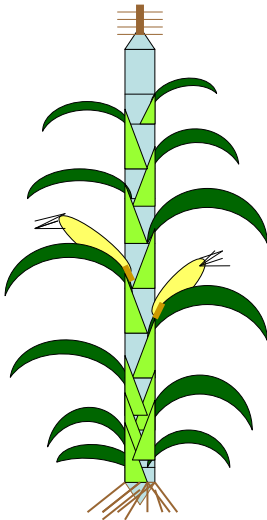
Partes y Tejidos en una planta de maíz



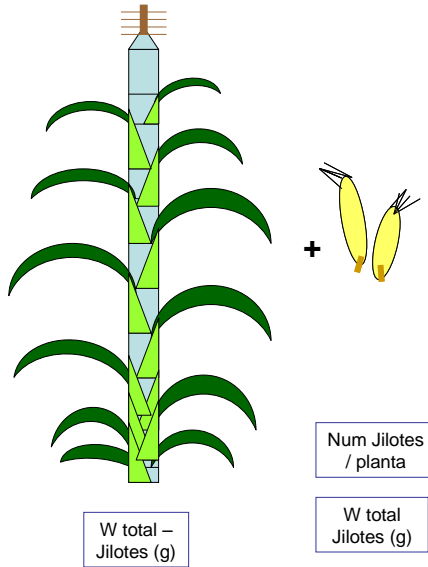
Parámetros a registrar

W total - Jilotes (g)	Largo Hoja Bandera (cm)	W espiga (g)	Num Jilotes / planta	W Total Jilotes (g) / planta	W total Totomoxtle (g) / Planta	W total Elobes (g) / Planta	Num Nudos tallo floral	W tallo ENTERO con vainas(g)	W tallo MOLER con vainas (g)	W jugo (g)
-----------------------	-------------------------	--------------	----------------------	------------------------------	---------------------------------	-----------------------------	------------------------	------------------------------	------------------------------	------------

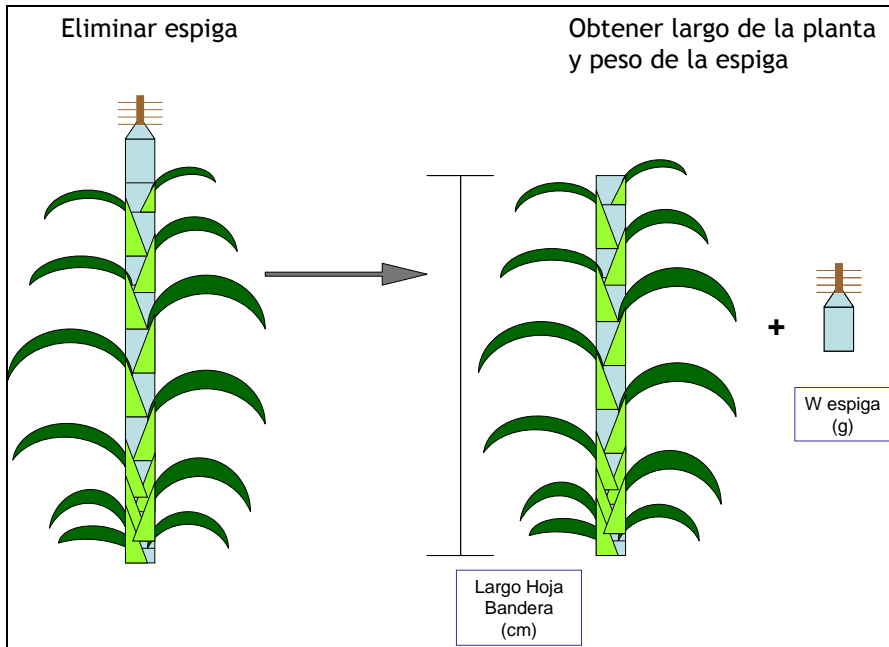
Cortar la planta a nivel del suelo



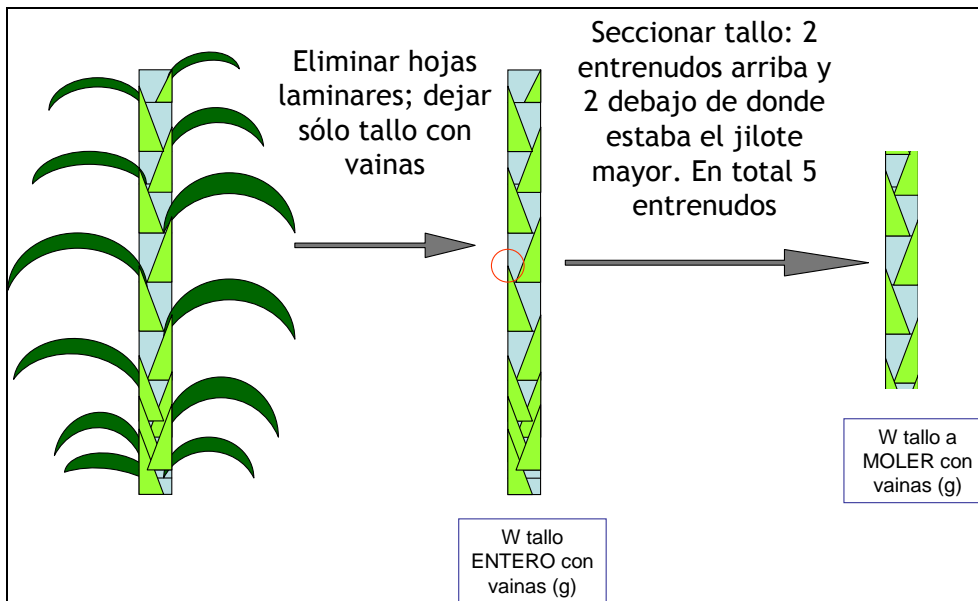
Separar Jilotes y obtener los pesos como se muestra



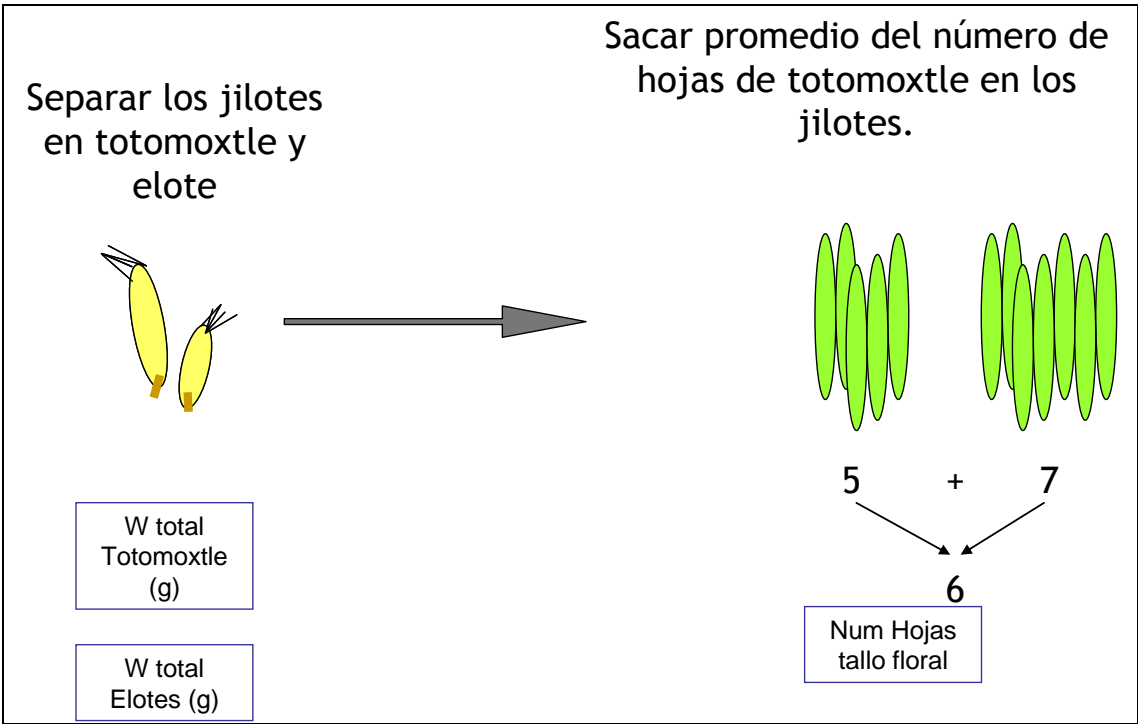
...



...

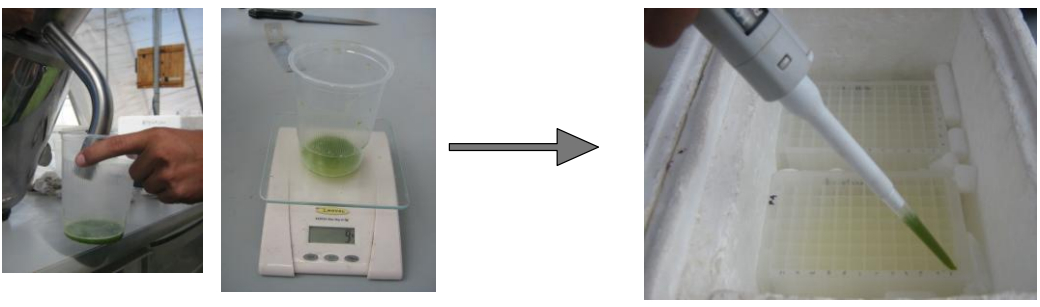


....



Moler sección tallo y coleccionar jugo

Tomar aliquotas en microplaca y su respectiva repetición. Congelar en baño de hielo seco o N liq



W jugo (g)