



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN  
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGIA  
CAMPUS TUXTEPEC

“Estudio del perfil de carbohidratos reductores durante la germinación de *Zea mays* VS-  
536.”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Ingeniero en Biotecnología.

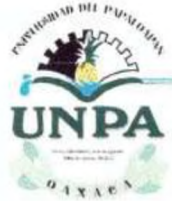
PRESENTA:

DANIEL ARNULFO SÁNCHEZ FELIX

Director: Dra. Alma Xóchil Ávila Alejandre

Codirector: M en BE Alejandro Hernández López

SAN JUAN BAUTISTA TUXTEPEC, OAXACA 2021



**UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN**  
CAMPUS TUXTEPEC

Tuxtepec, Oaxaca, a 23 de junio de 2021  
Oficio No. JCIB/007/06/2021

**Lic. Yesenia Barrientos Arenal**  
Jefe de Servicios Escolares  
Universidad del Papaloapan

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis del alumno **Daniel Arnulfo Sánchez Félix** titulado "**Estudio del perfil de carbohidratos reductores durante la germinación de Zea mays VS-536**". Para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciado en **Ingeniería en Biotecnología**, toda vez que cumple satisfactoriamente con la reglamentación establecida para tal fin.

El Jurado de Examen Profesional estará compuesto por los siguientes profesores:

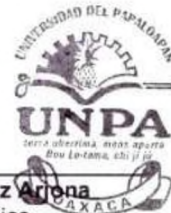
Presidente: Dr. Óscar Núñez Gaona  
Secretario: Dr. Óscar Abelardo Ramírez Marroquín  
Vocal: Dra. Priscila Guerra Ramírez  
Primer Suplente: Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa  
Segundo Suplente: Dr. Julián Mario Peña Castro

Sin más por el momento le envío un cordial saludo.

**Atentamente**  
*Terra uberrima, mens aperta*  
*Bou Lo-tama, chi ji jú*



*J.M.P.C.*  
**Dr. Julián Mario Peña Castro**  
Jefe de Carrera de Ingeniería en  
Biotecnología  
Universidad del Papaloapan



*H.L.*  
**Vo.Bo. M.C. Héctor López Arjona**  
Vice Rector Académico  
Universidad del Papaloapan

c.c.p. Dra. Alma Xochil Avila Alejandre. Director de tesis, Para su conocimiento  
c.c.p. M en BE Alejandro Hernández López, co-Director de tesis, Para su conocimiento  
c.c.p. Daniel Arnulfo Sánchez Félix, Alumno, Para su conocimiento  
c.c.p. Archivo



**UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN**  
CAMPUS TUXTEPEC

**ACTA DE REVISIÓN DE TESIS**

En la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 06 de agosto de 2020 a las 13 hr, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la Jefatura de Carrera de la Ingeniería en Biotecnología se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada "Estudio del perfil de carbohidratos reductores durante la germinación de *Zea mays* VS-536" presentada por el alumno Daniel Amulfo Sánchez Félix, con número de matrícula 11090025, aspirante al título de Licenciatura.

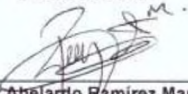
Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron que la tesis **satisface** los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes, otorgando su **aprobación** para que el aspirante pueda proceder con el proceso de titulación.

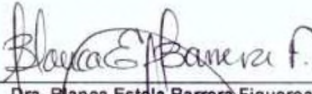
Tuxtepec, Oaxaca, a 06 de agosto de 2020

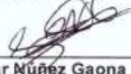
ATENTAMENTE  
LA COMISIÓN REVISORA

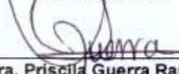
  
\_\_\_\_\_  
Dra. Alma Xochil Avila Alejandro  
Profesor Investigador  
Universidad del Papaloapan  
Director de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
M en BE Alejandro Hernández López  
Labriett  
co-Director de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Oscar Abelardo Ramírez Marroquín  
Profesor Investigador  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa  
Profesor Investigador  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Oscar Muñoz Gaona  
Profesor Investigador  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Priscila Guerra Ramírez  
Profesor Investigador  
Universidad Autónoma de Chapingo  
Revisor de Tesis

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la **Universidad del Papaloapan** para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.

## **AGRADECIMIENTOS.**

Al laboratorio de Químico –Biológico y al Taller de Alimentos de la Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec.

Se agradece a LABIOTT, el apoyo técnico y material para la realización de este trabajo.

## **DEDICATORIA.**

A mis asesores, Alejandro Hernández López y Alma Xochil Ávila Alejandre, por haber confiado en mí para realizar este trabajo y ayudarme en la elaboración del mismo. Por su paciencia y comprensión sin sus consejos y enseñanzas no estaría ahora finalizando esta Tesis de Licenciatura.

Al Rector Héctor López Arjona, no tengo palabras usted vio potencial en mí y no permitió que me diera de baja en el momento en que yo daba por perdida la carrera.

A todos los profesores de la carrera de biotecnología por todas sus enseñanzas y consejos

A mis padres Jesús Felix Verdugo, Noel Sánchez Carrera y Zenaida Sánchez Carrera por todo el apoyo recibido en los buenos y malos momentos por no permitir que abandonara los estudios universitarios y motivarme hasta este punto que es la terminación de la Tesis.

A mis hermanos Stefani Sánchez Felix, Luis Uribe Espejo Galicia y Roberto Espejo Galicia por estar incondicionalmente conmigo y brindarme muchos consejos y buenos deseos.

A mis amigos Jael Jarim, Ángel de Jesús, Adriana Ramírez, Keyla Mauleón, Rosa María, Felipe Alan, Antonio, Erick, Guadalupe Cristina, Abril, Marcelo Adrián y a mis compañeros de la generación 2011-2016. Por todo lo que vivimos durante los 5 largos años de estudio alegrías y tristezas.

Y especialmente a Dios quien con su ayuda me ha permitido ver terminado esta difícil labor.

Al final todo lo que inicia tiene que terminar y este trabajo no es la excepción.

## CONTENIDO.

### INDICE DE TABLAS

### INDICE DE FIGURAS

### ABREVIATURAS

### RESUMEN

### ABSTRACT

### INDICE DEL CONTENIDO

1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 Germinación de la semilla .....	4
2.2 Fases de la germinación. ....	5
2.2.1 Imbibición. ....	5
2.2.2 Germinación <i>sensu stricto</i> . ....	7
2.2.3 Crecimiento. ....	7
2.3 MOVILIZACIÓN DE RESERVAS. ....	8
2.4 TRANSPORTADORES EN CÉLULAS VEGETALES.....	9
2.4.1 Transportadores de Sacarosa (SUTS).....	10
2.4.2 Transportadores de hexosas. ....	15
2.5 MAÍZ, GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO .....	16
2.5.1 Estructura. ....	16
2.5.2 El maíz variedad VS-536. ....	17
2.6. CARBOHIDRATOS. ....	19
2.6.1 Métodos de determinación de Azúcares reductores. ....	22
2.6. 2 REACTIVO DE BENEDICT .....	25
2.6.2.1 Fundamento de la técnica. ....	25
2.6.3. Métodos de extracción de azúcares. ....	26
3 JUSTIFICACIÓN. ....	32
4 HIPÓTESIS.....	33
5 OBJETIVO PRINCIPAL.....	33
5.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS.....	33
6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	34
7 MATERIALES Y MÉTODOS.....	35

7.1. Material Biológico. ....	35
7.2 Caracterización de la germinación de maíz vs-536.....	35
7.2.1 Germinación en rollo húmedo (“taco”).....	35
7.2.2. Determinación del volumen ideal de agua para la germinación de semillas de maíz.....	36
7.2.3 Dinámica del peso seco.....	36
7.3 Establecimiento de las condiciones para la determinación cuantitativa de azúcares usando el método de Benedict. ....	37
7.3.1 Determinación de concentraciones adecuadas de sulfato cobre para el método de Benedict. ....	37
7.3.2 Preparación de curvas de calibración de azúcares. ....	37
7.4 Extracción de azúcares en embriones de maíz a diferentes horas de germinación y postgerminativas.....	38
7.5 Análisis estadístico. ....	39
8 RESULTADOS Y DISCUSION. ....	40
8.1 CARACTERIZACIÓN DE LA GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS DE MAÍZ VARIEDAD VS-536 DE ACUERDO A LA ISTA 2017 (Método del taco). ....	40
8.2 ESTABLECIMIENTO DEL MÉTODO DE BENEDICT EN CONDICIONES CUANTITATIVAS.....	51
8.2. 1 COMPARACIÓN CONTRA ACIDO DINITROSALICILICO (DNS).....	55
8.3 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES DURANTE LA GERMINACIÓN. ....	57
9 CONCLUSIONES.....	63
10. BIBLIOGRAFÍA.....	64
ANEXOS.....	77

## ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1 Transportadores de Sacarosa en plantas monocotiledóneas, su sistema de expresión, así como su afinidad por el sustrato. Tomado de la base de datos GenBank del NCBI ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a> ) .....	14
Tabla 2 Aspecto de las mazorcas y características de las semillas VS-536 (Tomado de Sierra-Macías <i>et al.</i> , 2016).....	18
Tabla 3 Métodos de Determinación Cuantitativa de Azúcares .....	23
Tabla 4 Métodos de Determinación Cualitativa de Azúcares.....	24
Tabla 5 Preparación de Curvas patrón de diferentes azúcares .....	38
Tabla 6 Porcentaje de germinación de semillas de maíz marca PROASE y TERRA. Se muestra el porcentaje final y el tiempo de germinación 50. ....	42
Tabla 7 Comparación del porcentaje de germinación acumulada y tiempo 50 para 2 lotes de maíz marca PROASE.....	44
Tabla 8 Porcentaje de germinación en caja de semillas de maíz y tiempo 50 .....	47
Tabla 9 Valores del establecimiento del rango dinámico del reactivo de Benedict.....	53
Tabla 10 Valores de R <sup>2</sup> de curvas estándar de azúcar .....	55

## INDICE DE FIGURAS.

<b>Figura 1</b> Morfología del crecimiento de semillas. ABA (Ácido abscísico) DFP (días post fertilización, por sus siglas en inglés). (Elaborado por el autor).....	1
<b>Figura 2.</b> Fases de la germinación (Modificado de Nonogaki 2010).....	6
<b>Figura 3</b> Estructura de la semilla de maíz (Tomado de Avila Alejandre et al., 2013). ....	17
<b>Figura 4</b> Estructura de los disacáridos (Modificado de Murray, 2010).....	20
<b>Figura 5</b> Estructura de la A) celulosa, B) hemicelulosa y C) lignina (Modificado de Murray, 2010).....	21
<b>Figura 6</b> Grupo Hemicetal y Acetal (modificado de Murray, 2010) .....	22
<b>Figura 7</b> Reacción de Benedict paso a paso (Modificado de Cristancho-Cruz y Monroy-Soler, 2014). ....	26
<b>Figura 8</b> Cambios en la coloración de la reacción de Benedict cualitativa dependiendo de la concentración (Elaborado por el autor).....	26
<b>Figura 9</b> Reacción de la hidrólisis ácida (Tomado de <a href="https://www.ecured.cu/Hidrólisis">https://www.ecured.cu/Hidrólisis</a> ).	28
<b>Figura 10</b> Ejemplo de Espectro de absorción (Modificado de Salisbury - Ross, 1999)....	29
<b>Figura 11</b> Ley de Lambert. ....	29
<b>Figura 12</b> Ley de Beer. ....	30
<b>Figura 13</b> Ley de Lambert y Beer.....	30
<b>Figura 14</b> Curva espectral. ....	31
<b>Figura 15</b> Material biológico. Semillas marca PROASE.....	40
<b>Figura 16</b> Germinación de semillas de maíz VS-536 lavadas, marca PROASE vs TERRA. Porcentaje de germinación acumulada (%TGA). n=3.....	41

<b>Figura 17</b> Germinación de semillas de maíz VS-536 no lavadas, PROASE vs TERRA. Porcentaje total de germinación acumulada (%TGA). n=3 .....	42
<b>Figura 18</b> Porcentaje de germinación diaria acumulada marca PROASE nuevo lote vs PROASE viejo lote. ....	43
<b>Figura 19</b> Comparación del peso del internodo, coleoptilo y radícula a las 0 h vs 72 h. Los resultados por ANOVA de una sola vía y Tukey como prueba ad hoc para diferencias entre parejas $p < 0.05$ . ....	45
<b>Figura 20</b> Proceso de germinación y etapas postgerminativas de la semilla de maíz se observa la morfología normal en todas las semillas. Elaboración propia. ....	46
<b>Figura 21</b> % TGA de semillas de maíz en caja de 0 h hasta las 72 h.....	47
<b>Figura 22</b> Gráfica del porcentaje de germinación en caja petri de semillas PROASE utilizando tres volúmenes conocidos de agua. Letras diferentes muestran diferencias significativas en el porcentaje de germinación entre volúmenes a un tiempo dado $p < 0.05$ . ....	49
<b>Figura 23</b> Comparación del peso del endospermo, internodo, coleóptilo y radícula a las 0,24,48,72 y 96 h analizados por ANOVA de una sola vía Tukey como prueba ad hoc para diferencias entre parejas (*diferencias significativas en el endospermo;** diferencias significativas entre las partes). ....	50
<b>Figura 24</b> Espectro de absorción del reactivo de Benedict. Se muestra absorbancia a 740 nm a) Sin diluir, b) Dilución 1:10 .....	52
<b>Figura 25</b> Curvas estándar utilizando reactivo de Benedict con distintas concentraciones de sulfato de cobre. ....	53
<b>Figura 26</b> Curva estándar de glucosa a una concentración de sulfato de cobre de 2.59 % analizado por ANOVA de una sola vía Tukey como prueba ad hoc para diferencias significativas entre parejas (*) indican diferencias significativas y se muestra el coeficiente de determinación $R^2$ $p < 0.05$ . ....	54
<b>Figura 27</b> Curva patrón de glucosa por el método de DNS en el rango de concentración de 0 a 0.4 mg/ml. ....	57
<b>Figura 28</b> Contenido de $Cu_2SO_4$ residual tras la reacción de determinación de carbohidratos en las semillas a diferentes horas de germinación. ....	58
<b>Figura 29</b> Gráfica del peso del embrión a diferentes horas de germinación y etapas post-germinativas. ....	60
<b>Figura 30</b> Gráfica de la relación de la cantidad de azúcares con respecto al peso seco presente a diferentes horas de germinación y etapas post-germinativas.....	62
<b>Figura 31</b> Gráfica que representa el contenido de azúcares libres con respecto a los ml de alcohol a diferentes horas de germinación y etapas post-germinativas. ....	59

## **ABREVIATURAS**

rpm: Revoluciones por minuto

BETL: Capa de transferencia basal de endospermo

pH: Potencial de Hidrógeno

SUTs: Transportadores de sacarosa

CA: Células acompañantes

VC: Vasos cribosos

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

SS: Sacarosa sintasa

mM: Milimolar

$K_m$ : Constante de Michaelis-Mendel

MSF: Super familia de facilitadores de azúcares (por sus siglas en inglés)

AtSTPs: Transportadores de azúcares

DNS: Ácido Dinitro Salicílico

g: Gramos

L: litros

mm: Milímetros

%TGA: Porcentaje total de germinación acumulada

TG50: Tiempo de germinación 50

ml: Mililitros

°C: Grado Celsius

mg: Miligramos

μl: Microlitros

nm: Nanómetros

h: Horas

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura por sus siglas en inglés

ISTA: Asociación Internacional de Análisis de Semillas, por sus siglas en inglés

## RESUMEN.

Cuando se inicia la germinación de las semillas, los nutrientes acumulados durante el desarrollo de la misma, se usan para sostener el reinicio de la actividad metabólica primaria del embrión, lo que da como resultado el desarrollo de la plántula. Esta reserva de energía, en el caso de las semillas de cereales como el maíz, trigo, cebada, etc. está compuesta principalmente por el polisacárido, almidón. Tradicionalmente, se ha considerado que la movilización del almidón se realiza después de completada la germinación. Sin embargo, en reportes recientes se ha relacionado el reinicio del metabolismo primario, con el consumo de reservas de una primera fuente de azúcares libres de los que el embrión se “alimenta” en primer lugar y le permiten comenzar su crecimiento y división celular. Sin embargo, la información en relación al comportamiento de la movilización de reservas energéticas durante las etapas previas a la germinación, es escasa.

El objetivo de este trabajo fue dar seguimiento a la dinámica de la movilización de carbohidratos durante la etapa de germinación y las primeras etapas postgerminativas, en semillas de maíz VS 536, un híbrido diseñado para climas tropicales, para lo cual, se propuso y estandarizó un nuevo método espectrofotométrico de determinación de carbohidratos reductores basado en el método de Benedict y de bajo costo y fácil implementación.

Los resultados muestran que la concentración de azúcares reductores en etapas pre-germinativas es muy baja ( $< 0.3$  mg/ml), y en etapas post-germinativas, el contenido de azúcares libres aumentó (6.034 mg/ml a las 96 h), indicando la actividad metabólica que está experimentando el embrión en los procesos de elongación y división celular durante su diferenciación a plántula.

La técnica de Benedict propuesta aquí, tiene una sensibilidad mínima de 0.133 mg/ml, aunque el rango de detección de azúcares es menor que los reportados para otras técnicas como DNS; debido a los costos, el método modificado en esta tesis puede ser una opción accesible para realizar esa cuantificación en sistemas de semillas.

## **ABSTRACT.**

During germination, the nutrients accumulated during seed development will sustain the reboot of the primary metabolic activity of the embryo, which results in the development of the seedling. This energy reserve, in the case of cereal seeds such as corn, wheat, barley, etc. It is composed mainly of glucose polysaccharide, starch. Traditionally, it has been considered that the mobilization of the starch is carried out after the germination is completed. However, in recent reports the reboot of the primary metabolism has been related to the consumption of reserves of a first source of free sugars from which the embryo is first "fed" and allowed to begin its growth and cell division. However, information regarding the behavior of the mobilization of energy reserves during the stages prior to germination is scarce.

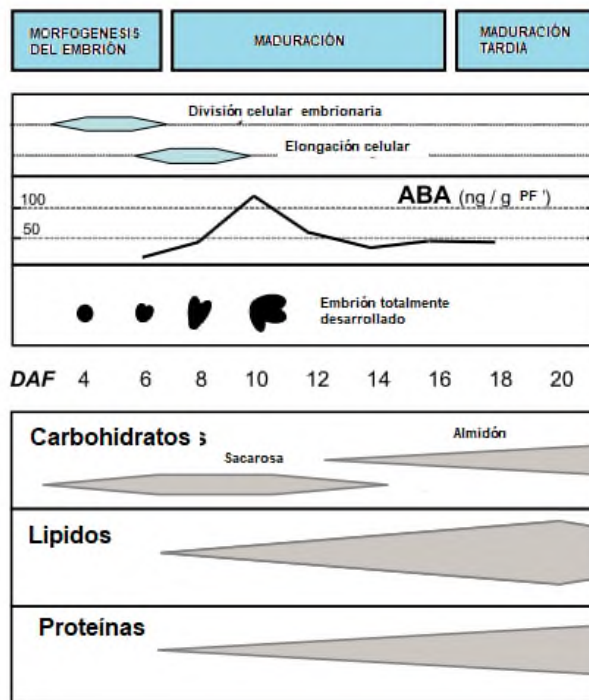
The objective of this work was to follow the dynamics of the mobilization of carbohydrates during the germination stage and the first post-germinative stages, in corn seeds VS 536, a hybrid designed for tropical climates, for which, a new method was standardized of determination of reducing carbohydrates based on the Benedict method and of low cost and easy implementation.

The concentration of reducing sugars remains very low ( $<0.3$  mg / ml) in pre-germinative stages, and in post-germinative stages, the content of free sugars increases (6.034 mg / ml at 96 h), indicating the metabolic activity that is experiencing the embryo in the processes of cell elongation and division during its differentiation to seedling.

The Benedict technique proposed here has a minimum sensitivity of 0.133 mg / ml, although the range of detection of sugars is lower than those reported for other techniques such as DNS; Due to the costs, the modified method in this thesis can be an accessible option to perform that quantification in seed systems.

# 1 INTRODUCCIÓN.

Las angiospermas, es decir, las plantas con semillas son la mayor fuente de calorías humanas. El desarrollo de semillas es una estrategia generada por las plantas en respuesta a la necesidad de incrementar sus posibilidades de propagación, por lo que las semillas se convirtieron en el principal mecanismo de dispersión de las plantas. Son producto de un proceso de doble fertilización durante la reproducción sexual (Lafon-Placette y Kohler, 2014). En general, las semillas están constituidas por un embrión y por compuestos de reserva (glúcidos, proteínas o lípidos), rodeados ambos por las cubiertas seminales provenientes de la planta madre. En la Figura 1 se esquematizan los eventos desde la fecundación hasta la maduración de la semilla, este proceso finaliza sobre la planta madre.



**Figura 1** Morfología del crecimiento de semillas. ABA (Ácido abscísico) DFP (días post fertilización, por sus siglas en inglés). (Elaborado por el autor)

Durante el proceso de maduración, las semillas se desecan, en algunos casos, conservan sólo el 10% de agua libre, lo que induce en ellas en un estado de reposo o quiescencia, caracterizado por la disminución del metabolismo, hasta que se dan las condiciones favorables para su germinación. Este estado persistirá hasta la existencia de condiciones ambientales favorables o por la desaparición de factores que actúan desde las propias semillas y no permiten su germinación (Weitbrecht *et al.*, 2011).

La germinación, es un proceso clave que permite al embrión convertirse en un organismo fotosintético. Comienza con la imbibición de la semilla quiescente y termina cuando una parte del embrión, usualmente la radícula se elonga y rompe las estructuras que lo circundan (Nonogaki, 2018; Bove *et al.*, 2002). Lo anterior está determinado por el balance del potencial de crecimiento del embrión y la resistencia mecánica de los tejidos cubierta tales como el endospermo y la testa; en muchas especies, el endospermo es la barrera final que la punta de la radícula tiene que superar antes de la ruptura de la testa (Nonogaki, 2018).

Entre los eventos físicos y bioquímicos que son la base del proceso de germinación se cuentan: el debilitamiento de las cubiertas de las semillas, el reinicio de la actividad metabólica, la activación de la transcripción de genes, la relajación de las paredes de las células embrionarias, el reensamble y la biogénesis de organelos (Logan *et al.*, 2001). Villa Hernández *et al.*, (2013), sugieren que la biogénesis de ribosomas es llevada a cabo por ARN's ribosomales sintetizados *de novo* y proteínas ribosomales de ARN's almacenados. Estos procesos dependen de la movilización (hidrólisis) de polímeros complejos como el almidón, proteínas o lípidos desde los tejidos de almacenamiento, tales como el endospermo o los cotiledones; que son considerados como las reservas energéticas de las semillas y se usan como fuentes de energía y bloques de construcción para el desarrollo de la planta previo al inicio de la fotosíntesis (Srivastava *et al.*, 2002).

Sin embargo, a pesar de la enorme cantidad de información sobre la fisiología de la germinación (Nonogaki, 2018) y de los avances en la comprensión de sus bases

moleculares (Bove *et al.*, 2002, Dekkers y Smeekens, 2007; Yang *et al.*, 2007; Hynek *et al.*, 2009), dos acontecimientos centrales previos a la emergencia de la radícula siguen sin estar claros:

1. el mecanismo de alargamiento de la radícula (Nonogaki, 2018 y Nonogaki, 2010).
2. la identificación de la fuente de carbono que el embrión utiliza para apoyar la actividad metabólica y la emergencia de la radícula en las horas previas a la germinación. En este sentido, recientemente, se ha postulado que, en maíz, el embrión reinicia su metabolismo a partir de sacarosa proveniente del escutelo, que a su vez es hidrolizada a monosacáridos (Sánchez-Linares *et al.*, 2012; Aguirre *et al.*, 2018).

Estos dos acontecimientos están estrechamente vinculados y confinados en las primeras horas de imbibición de la semilla, la utilización y el transporte de las reservas desde el endospermo o los cotiledones, se describen como dos eventos posteriores a la germinación, ya que se llevan a cabo después de que emerge la radícula y que están regulados por hormonas vegetales como el ácido giberélico y ácido abscísico (Pritchard *et al.*, 2002; Srivastava *et al.*, 2002; Eastmond, 2006). Aunque existen una amplia variedad de datos acerca del proceso de germinación aún no queda claro que eventos son indispensables para completar el proceso (Nonogaki, 2010) y como éstos podrían influenciar el establecimiento posterior de la plántula.

En el presente trabajo se exploró la dinámica de carbohidratos de la planta modelo maíz, con un híbrido de amplio uso comercial, el VS536, utilizando un método modificado que mide la presencia de azúcares reductores.

## 2 MARCO TEÓRICO.

### 2.1 Germinación de la semilla.

La germinación, es un proceso clave que permite al embrión convertirse en un organismo fotosintético. En la mayoría de las plantas esto se visualiza físicamente, como la emergencia de la radícula de la semilla (Nonogaki, 2018).

La rehidratación de la semilla es el paso previo a la germinación (imbibición) y finaliza con la elongación de la radícula. En condiciones de laboratorio, la posterior rotura de las cubiertas seminales por la radícula es el hecho que se utiliza para considerar que la germinación ha tenido lugar. Sin embargo, en condiciones de campo no se considera que la germinación ha finalizado hasta que se produce la emergencia y desarrollo de una plántula normal (criterio agronómico).

La actividad metabólica del embrión es moderada, pero esencial, durante las primeras horas de la absorción de agua (Roberts, 2003), ya que se emplea para proporcionar la energía y precursores para la síntesis de componentes de la célula y para sostener la emergencia de la radícula, el sello distintivo de la germinación. Se ha descrito que la extensión de la radícula implica la división y / o la elongación celular (Antipova *et al.*, 2003; Avila-Alejandre *et al.*, 2013), que exige la incorporación de moléculas que deben ser sintetizadas *de novo* (Villa Hernández *et al.*, 2013) y el transporte de nutrientes desde el exterior hacia el interior del embrión (Aguirre *et al.*, 2018)

En coleóptilos, cuyo crecimiento requiere elongación celular en lugar de la división celular, la ampliación de células se promueve por la relajación de la pared celular, que es facilitado por la acidificación del apoplasto (Hager 2003; Kutschera, 2004). El bajo pH contribuye a aumentar la actividad de varias enzimas que modifican la pared celular tales como expansinas, endoglucanasa, y xiloglucanos-endo-transglucosilasas (Cosgrove, 2005). La evidencia experimental indica que la membrana plasmática ATPasa genera dicha acidificación (Hager, 2003; Kleber *et al.*, 2003, Cosgrove, 2005). Esta enzima cataliza la

hidrólisis de ATP acoplada a la translocación de H<sup>+</sup> del citosol en el apoplasto, construyendo así una diferencia de pH transmembrana o pH (ácido fuera de la célula) y la diferencia de potencial eléctrico o (negativo dentro de la célula) (Sondergaard *et al.*, 2004).

Posterior a la germinación, uno de los procesos que inician el desarrollo de las plántulas, es la movilización de polímeros complejos como el almidón, proteínas y lípidos de los tejidos de almacenamiento tales como el endospermo o los cotiledones. Éstos tejidos varían dependiendo del tipo de semillas y proporcionan las moléculas que se utilizarán en las rutas metabólicas para obtener energía en forma de ATP y poder reductor, así como precursores para la síntesis de metabolitos de la plántula en crecimiento (Roberts y Srivastava, 2003; Aguirre *et al.*, 2018). Este proceso ha sido designado genéricamente como movilización de reservas y está regulado por hormonas vegetales tales como el ácido giberélico y ácido abscísico (Pritchard *et al.*, 2002; Eastmond, 2006).

Existe información que menciona la presencia de ciertos transportadores de carbohidratos durante el desarrollo y germinación de la semilla. Durante su desarrollo se habla de transportadores de sacarosa. En el caso de la germinación, se mencionan a los transportadores de hexosas puesto que la función de estos transportadores es recuperar los azúcares del endospermo derivados de la hidrólisis del almidón (glucosa y maltosa).

## **2.2 Fases de la germinación.**

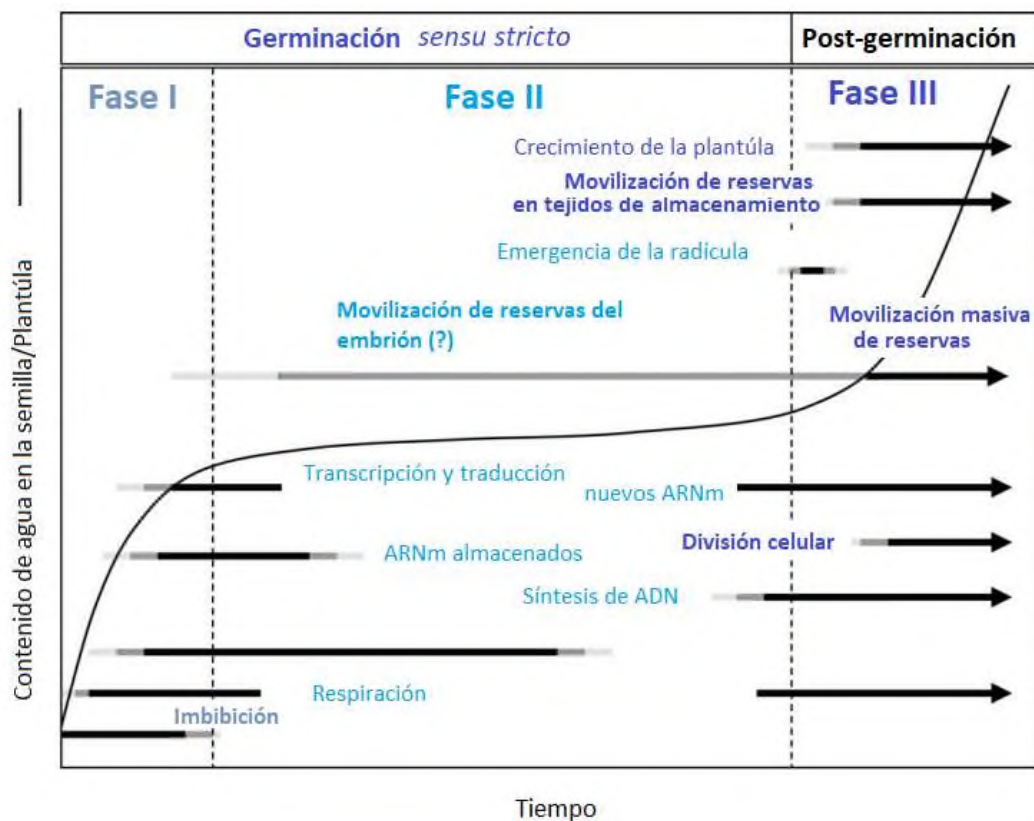
La germinación es un proceso trifásico (Weitbrecht *et al.*, 2011) que puede ser descrito en función de la entrada de agua a la semilla (Figura 2).

### **2.2.1 Imbibición.**

La primera fase de la germinación se inicia con la entrada de agua en la semilla desde el medio exterior (imbibición). La hidratación de los tejidos de la semilla es un proceso físico con una duración variable según la especie considerada. Este proceso está dirigido por el potencial métrico de la semilla y puede ocurrir incluso en semillas muertas (Krishnan *et*

*al.*, 2004). Imágenes de resonancia magnética nuclear con chícharo, tabaco y otras especies demuestran que el punto principal de entrada de agua ocurre en el micropilo y que el progreso de la hidratación difiere entre los diferentes tejidos de la semilla. La hidratación acelerada puede generar daños en los tejidos, por lo que las semillas activan mecanismos de reparación del ADN (Boubriak *et al.*, 2007) y de proteínas (Oge *et al.*, 2008) durante la hidratación.

Una vez que la semilla se ha hidratado, se estabiliza la incorporación de agua y comienzan activarse una serie de procesos metabólicos que son esenciales para que tengan las siguientes etapas de la germinación (Nonogaki, 2018). Existen factores que pueden influir en esta etapa de la germinación: Déficit hídrico, el exceso de agua, la velocidad de hidratación o la temperatura (Weitbrecht *et al.*, 2011).



**Figura 2.** Fases de la germinación (Modificado de Nonogaki 2010).

### **2.2.2 Germinación *sensu stricto*.**

Una vez que la semilla se ha hidratado adecuadamente, se entra en una segunda etapa, la germinación *Sensu stricto*, que se caracteriza entre otras cosas porque se produce una disminución en la velocidad de absorción de agua por las semillas. Aquí se tiene lugar una activación generalizada del metabolismo de la semilla (Gutiérrez *et al.*, 2007).

El metabolismo es reactivado con enzimas que fueron almacenadas durante la maduración de las semillas. Esto se ha demostrado en *Arabidopsis*. La evidencia incluye a las enzimas de las vías de producción de energía, en el caso de la glucólisis, la 6-fosfofructocinasa y la fosfo-glicerato-cinasa ([www.seed-proteome.com](http://www.seed-proteome.com)).

Hacia el final de esta etapa, los eventos metabólicos culminan en la ruptura de los tejidos de la semilla y la emergencia o protrusión de la radícula. A este proceso se le considera germinación *sensu stricto*, solamente aquellas semillas que son viables pueden completar la germinación.

### **2.2.3 Crecimiento.**

En la última fase de la germinación, paralelamente al incremento de la actividad metabólica, se produce el crecimiento y emergencia de la radícula a través de las cubiertas seminales. Las semillas que han alcanzado la fase de crecimiento no pueden volver a etapas anteriores y en el caso de que las condiciones del medio no permitan que esta fase pueda seguir adelante, la semilla morirá. Una vez que la radícula ha roto las cubiertas seminales, se inicia el desarrollo de la plántula (Pérez García y Pita Villamil, 2001; Nonogaki *et al.*, 2013). Esta etapa se prolonga hasta la finalización de las reservas y el establecimiento final de la plántula, este último evento incluye, el inicio de la actividad fotosintética y la formación de hojas verdaderas.

## 2.3 MOVILIZACIÓN DE RESERVAS.

Los compuestos de reserva que se encuentran en las semillas son glúcidos, proteínas y lípidos, en mayor o menor proporción, según la especie considerada. La movilización de estas reservas, durante la etapa post-germinativa, es un proceso esencial que permite la supervivencia de la semilla hasta que la plántula se desarrolla lo suficiente como para poder realizar fotosíntesis.

Las semillas pueden presentar distintos tipos de sustancias de reserva en las angiospermas hay 3 posibilidades: 1.- Semillas endospermadas, las reservas se acumulan en el endospermo originado durante la doble fecundación. Los embriones presentan cotiledones que darán origen a las hojas; el ejemplo más común son las gramíneas como el maíz el trigo etc. 2.- Semillas perispermadas, las reservas se acumulan en el perisperma que es el tejido nucelar que perdura por ejemplo en las amarantáceas. 3.- Semillas exalbuminadas las sustancias de reserva se ubican en los cotiledones (<http://www.biologia.edu.art>).

El almidón constituye la forma más generalizada, aunque no la única, de reserva energética en vegetales. Se encuentra en hojas, diferentes tipos de tallo y raíces, así como en flores, frutos y en semillas se almacena en forma de gránulos utilizada como fuente de energía durante periodos de latencia, estrés o reinicio del crecimiento. Puede llegar a constituir hasta el 70% del peso de granos (maíz y trigo). Los órganos que almacenan almidón son productos alimenticios de importancia (Baguma *et al.*, 2003; Tester *et al.*, 2004). De manera creciente, el almidón es utilizado como recurso energético renovable después de su conversión a etanol y para muchas aplicaciones industriales por su versatilidad, bajo costo y la facilidad con que se alteran las propiedades fisicoquímicas (Jobling, 2004).

El análisis de la estructura del almidón demuestra que es una mezcla de otros dos polisacáridos: la amilosa y la amilopectina, los cuales consisten de cadenas de glucosa

unidos por enlaces  $\alpha$ -1-4 que están periódicamente ramificadas vía enlaces  $\alpha$ -1-6. La amilopectina, es el mayor componente (70-80%) el cual proporciona la cristalinidad del grano y es osmóticamente inactiva. Las cadenas  $\alpha$ -glucanos forman racimos que se extienden para formar una región amorfa que están organizados en 2 tipos de arreglos o alomorfos los tipos A los cuales son creados por cadenas de glucanos cortas empaçadas densa y uniformemente y por lo tanto hidrofóbicas. Los alomorfos tipo B están compuestos de cadenas de glucanos a dispersar y más grandes con formas hexagonales y, por lo tanto, permiten la incorporación de agua. En el caso del maíz tiene principalmente alomorfos tipo A (Mc Neill *et al.*, 2017).

La hidrólisis previa del almidón es imprescindible para obtener, a partir de las moléculas de glucosa que lo constituyen, la energía necesaria para la activación del metabolismo de la semilla.

## **2.4 TRANSPORTADORES EN CÉLULAS VEGETALES.**

Las plantas, poseen mecanismos que regulan la cantidad de nutrimentos que se exportan desde las hojas (tejido fuente) a través del floema, hacia tejidos de poca o nula actividad fotosintética, como raíces, flores, semillas, hojas jóvenes, meristemos, etc. (tejido demandante) (Eschrich, 1975).

Cuando la descarga de los fotosintatos se da a través de la ruta apoplástica (espacio extracelular periférico de las células vegetales por el que fluyen agua y otras sustancias), éstos, se acumulan en todo el espacio intercelular, donde, la célula puede asimilarlos, sin embargo, primero deberá ser capaz de exhibir sus transportadores en la membrana (Padilla Chacón y Martínez Barajas, 2007). El simplasto es la región intracelular de una planta conformada por el citoplasma interconectado de células separadas enlazadas por plasmodesmos en el cual fluye agua y moléculas de bajo peso molecular.

En las células vegetales existen dos tipos de transportadores dependiendo el tipo de carbohidrato. La sacarosa descargada por la ruta apoplástica, es incorporada en las células del tejido demandante, mediante transportadores específicos denominados SUTs

(transportadores de sacarosa). Las hexosas como la glucosa, la fructosa tienen sus propios transportadores.

#### **2.4.1 Transportadores de Sacarosa (SUTs).**

El disacárido sacarosa se emplea para el transporte a larga distancia por toda la planta; algunas familias de plantas transportan rafinosa y estaquiosa o azúcares alcohol, junto a cantidades variables de sacarosa, la mayoría transporta exclusivamente sacarosa (Oner-Sieben, 2015). La llamada carga del floema ocurre en las hojas fuente, y es un proceso que aumenta el contenido de sacarosa en las células acompañantes (CA) y los vasos cribosos (VC) del floema, a niveles muy superiores que las células que los rodean (Lalonde *et al.*, 2003).

La carga del floema en las hojas puede ocurrir por dos mecanismos: la vía simplástica y la apoplástica, en dependencia del paso de la sacarosa por el simplasto o el apoplásto. Si se asume que las células de las plantas están unidas entre sí por los plasmodesmos y conforman un sistema citoplasmático continuo (simplasto) con los vasos cribosos del floema, la sacarosa se distribuiría por la planta de célula en célula, esta sería la vía simplástica.

Se consideraba que la entrada pasiva de la sacarosa al floema de las hojas por la vía simplástica solo era posible termodinámicamente en las plantas que presentaban la llamada trampa de polímeros, como en las Cucurbitáceas, donde la sacarosa difunde a las células acompañantes de las venas menores de la hoja y es convertida en sus oligómeros rafinosa y estaquiosa. Estos compuestos son entonces trasladados a los vasos conductores con una cierta cantidad de sacarosa no oligomerizada (Turgeon y Medville, 2010). Sin embargo, también se ha planteado la posibilidad de una carga simplástica de la sacarosa, sin que ocurra una concentración de esta en el floema, siempre y cuando la concentración de sacarosa sea mayor en las células productoras y esté favorecida su difusión a través del plasmodesmo (Turgeon y Medville, 2010).

Se ha demostrado que existen ciertos tejidos que están prácticamente incomunicados por el simplásto; por ejemplo, el tejido maternal y filial en las semillas de legumbres y cereales, o el complejo CA/VC y el mesófilo en las hojas de Fabáceas (Kühn, 2003). También puede suceder que no todos los plasmodesmos se encuentren abiertos y funcionales. En tales casos, para el transporte de este azúcar se necesitaría un paso por el apoplásto, formado por las paredes celulares y los espacios extracelulares, y una proteína que en cotransporte con protones (SUT o SUC, del inglés Sucrose Transporter o Carrier) incorpore la sacarosa de nuevo al simplasto de las células adyacentes (Turgeon y Medville, 2010; Oner-Sieben *et al.*, 2015). La vía aparentemente más común para la carga del floema en las hojas es a través del apoplásto; no obstante, algunas plantas usan aparentemente más de una vía, como sucede en *Alonsoa meridionalis* (Turgeon y Medville, 2010).

A pesar de que se había propuesto la existencia de una proteína transportadora para la sacarosa (Lemoine, 2000) desde finales de la década de los 70, no es hasta 1992 que se identificó la primera secuencia de ADNc de un transportador de sacarosa en espinaca (*Spinacea oleracea*), SoSUT1, que fue sometido a análisis funcionales, bioquímicos y estructurales (Riesmeier *et al.*, 1992). La funcionalidad del transportador se comprobó cuando su expresión permitió a una línea mutante de levadura (SUSY7/ura3, *Saccharomyces cerevisiae*) importar sacarosa marcada con C14. Las células de esta levadura fueron transformadas genéticamente, para ser incapaces de crecer en sacarosa como única fuente de carbono; esto se logró con el bloqueo de la expresión de las invertasas citosólica y extracelular, y la inserción del gen de la enzima Sacarosa Sintasa (SS) de espinaca en su genoma. De este modo, la sacarosa del medio no puede ser hidrolizada y solo cuando el gen de un transportador de sacarosa haya sido expresado y la proteína funcional insertada en la membrana plasmática de la levadura, la sacarosa puede penetrar al citoplasma y ser escindida por la SS. La actividad del transportador se mostró dependiente del pH y el potencial de membrana con una  $K_M$  de 1,5 mM, y fue inhibido por protonóforos, inhibidores de sistemas que generan ATP y por agentes modificantes de grupos tioles. La estructura primaria de la proteína deducida a partir del ADNc se ajustó a

las características de alta hidrofobicidad requeridas para una proteína de membrana con 12 dominios transmembrana. Se propuso un modelo, donde la sacarosa fuera liberada al apoplásto desde la célula del mesófilo, por un mecanismo de difusión facilitada o un antiporte de sacarosa y H<sup>+</sup>, y posteriormente cargada al floema por medio de un simporte con protones, cuya fuerza motriz es generada por la H<sup>+</sup>-ATPasa de membrana. Los datos aportados en este trabajo señalan que SoSUT1 es un cotransportador de sacarosa y H<sup>+</sup> del tipo simporte (Riesmeier *et al.*, 1992).

Esta secuencia se utilizó para el aislamiento del primer transportador de sacarosa en especies Solanáceas (Riesmeier *et al.*, 1993) y en otras plantas dicotiledóneas hasta un número de nueve, antes de que se reportara el primero en plantas monocotiledóneas (Kühn, 2003). A medida que se fueron incorporando nuevas secuencias estas se agruparon por sus relaciones filogenéticas en un número creciente de grupos o clados, hasta completar cinco (Kühn y Grof, 2010).

En plantas, se conocen alrededor de 19 de estos transportadores presentes en plantas monocotiledóneas de los que a continuación se describen algunos ejemplos.

En 1997, se identificó el primer transportador de sacarosa en plantas monocotiledóneas en arroz: *Oryza sativa*, OsSUT1; ver tabla 2. Esta proteína, deducida a partir de la traducción del ADNc secuenciado mostró una similitud del 76.8-79.7 % respecto a las SUTs de especies dicotiledóneas identificadas hasta el momento. En 2003, se identificaron y clonaron 4 transportadores originales designados como: OsSUT2, 3, 4 y 5 (Aoki *et al.*, 2003; Hirose *et al.*, 1997). Con la utilización de la secuencia del ADNc del OsSUT1 como sonda, se logró la clonación de ZmSUT1 en la librería de ADNc de hijas de maíz, *Zea mays* (Aoki *et al.*, 1999). Este presentó una homología de aminoácidos del 82% con el de arroz, y del 40-45% con otros SUT de plantas dicotiledóneas. El ZmSUT1, ha sido caracterizado cinéticamente mediante su expresión en oocitos de la rana sudafricana *Xenopus laevis*. Además, otras dos secuencias han sido registradas para esta especie como: ZmSUT2 y ZmSUT4 (Carpaneto *et al.*, 2005), aún sin caracterizar.

En semillas de cebada (*Hordeum vulgare*), fueron identificados dos transportadores de sacarosa: HvSUT1 y HvSUT2. La secuencia peptídica mostró una identidad del 47% entre ellos, HvSUT1 mostró similitud con los transportadores SUT1 de los cereales y HvSUT2 se asemejó filogenéticamente a los SUT4 de dicotiledóneas (Weschke *et al.*, 2000). Al ser utilizado el OsSUT1 como sonda en trigo (*Triticum aestivum*), fueron hallados tres ADNc y designados como TaSUT1A, TaSUT1B, TaSUT1D. Estos mostraron ser idénticos entre sí en más del 98% y solo diferían en las regiones no traducidas 5'- y 3'- del gen (Aoki *et al.*, 2002). Investigadores del grupo de Grof en Australia, encontraron una secuencia expresada etiquetada en la librería de ADNc de la caña de azúcar en el 2003, con una identidad del 81% con el SUT1 de maíz (Casu *et al.*, 2003). Dos años más tarde, se registró la secuencia completa de ADNc del primer SUT en este cultivo (Rae *et al.*, 2005). A partir del ADNc de piña (*Ananas comosus*), se clonó y secuenció un posible SUT, denominado AcSUT1. La secuencia de nucleótidos mostró un 62-68% de identidad con los transportadores SUT2 (Antony *et al.*, 2008). En la base de datos GenBank se encuentran accesibles los registros de las secuencias proteicas deducidas de los transportadores de bambú (*Bambusa oldhamii*), BoSUT1 (Lin *et al.*, 2008) y sorgo (*Sorghum bicolor*), SbSUT1, SbSUT4 (Liu y Lin, 2009), los cuales aún no han sido caracterizados. El completamiento reciente de los anteproyectos del genoma de sorgo, maíz y *Brachypodium* será la fuente para la caracterización de nuevos SUT de plantas monocotiledóneas (Braun y Slewinski, 2009).

La capacidad de estas proteínas para transportar la sacarosa de la membrana ha sido demostrada mediante la expresión de sus secuencias de nucleótidos en la cepa mutante SUSY7/ura3 de levadura y en oocitos de *X. laevis*. En algunos casos, se ha confirmado el transporte mediante la expresión del crecimiento de la levadura en medios, en los cuales la sacarosa o la maltosa constituían la única fuente de carbón, como se ha reportado para: OsSUT1, OsSUT3 y TaSUT1A, 1B, y 1D (Aoki *et al.*, 2006). Para muchos SUT, se ha logrado la estimación de la  $K_M$  en *S. cerevisiae*, así como en *X. laevis*; Sin embargo, esta ha resultado diferente en los dos sistemas de expresión heteróloga. Los resultados cinéticos en oocitos han reportado valores de  $K_M$  mucho mayores en HvSUT1 y ShSUT1, así como en

AtSUC2, por lo que se considera que estos han sido subestimados en la levadura; ver tabla 3. En los análisis realizados en *Xenopus* con AtSUC2, HvsUT1, ZmSUT1, ShSUT1, LjsUT4 y OsSUT5 se ha demostrado que la afinidad de las proteínas por la sacarosa es altamente dependiente del pH y el voltaje al cual se mida (Sun *et al.*, 2010); por esta razón, las comparaciones del  $K_M$  se han de realizar a pH y voltajes similares. En general se ha resaltado la ventaja de la utilización de *Xenopus* en relación con la levadura tanto para la determinación de la  $K_M$  como para la distinción entre sustratos e inhibidores (Reinders *et al.*, 2006). En este sistema de expresión, un inhibidor no registrará corriente de entrada y disminuirá la provocada por la sacarosa, cuando ambas moléculas se aplican en conjunto, mientras que en la levadura no se puede discernir si el nuevo azúcar añadido es un inhibidor o efectivamente un sustrato, ya que solo es detectada la sacarosa marcada.

**Tabla 1** Transportadores de Sacarosa en plantas monocotiledóneas, su sistema de expresión, así como su afinidad por el sustrato. Tomado de la base de datos GenBank del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

<b>PLANTA</b>	<b>NOMBRE</b>	<b><math>K_M</math></b>	<b>REFERENCIA</b>
<b>ARROZ</b>	OsSUT1	7, 50 mM a PH 5,6 a -117 mV, dependiente de pH y Voltaje	Hirose et al.,1997
	OsSUT2	-	Aoki et al.,2003
	OsSUT3	Complementación positiva	Aoki et al.,2003
	OsSUT4	-	Aoki et al.,2003
	OsSUT5	2,32 mM a pH 5,6 a -117 mV, poco dependiente de pH	Aoki et al.,2010
<b>MAÍZ</b>	ZmSUT1	7,2 mM a pH 5,6 a -100 mV, dependiente de voltaje y pH	Carpaneto et al.,2005
	ZmSUT2	-	Wang et al.,2004
	ZmSUT4	-	Wright et al.,2005
<b>CEBADA</b>	HvsUT1	16,0 + - 1,3 mM a pH 6,0 a - 157 mV, dependiente	Weschke et al.,2000
	HvsUT2	5,0 mM a pH 6,0	Sivitz et al.,2005
<b>TRIGO</b>	TaSUT1A	-	Aoki et al.,2002
	TaSUT1B	-	Aoki et al.,2002
	TaSUT1D	-	Aoki et al.,2002
<b>CAÑA DE AZÚCAR</b>	ShSUT1	2 mM a pH 5,6	RAE et al.,2005
		8,26 a -137 mV, poco dependiente de voltaje	Reinders et al.,2006
<b>PIÑA</b>	AcSUT1	-	Anthony et al.,2008

<b>BAMBÚ</b>	BoSUT1	-	Lin et al.,2008
<b>SORGO</b>	SbSUT1	-	Lin et al.,2009
	SbSUT4	-	Lin et al.,2009

Los transportadores de sacarosa tienen 12 regiones transmembranales. En el genoma de *Arabidopsis*, se han identificado muchas secuencias que codifican potencialmente para transportadores de sacarosa. Todos comparten alto grado de homología, lo que ha permitido clasificarlos dentro de la familia GPH, superfamilia de facilitadores de azúcares (MSF). Estudios basados en análisis filogenético y de comparación de secuencias de péptidos, han permitido clasificar a los SUTs (transportadores de sacarosa) de dicotiledóneas en: SUT1, SUT2 y SUT4. Algunos transportadores de sacarosa como: SUT2 que participan en la carga del floema en *Arabidopsis* (Truernit y Sauer, 1995). Otros como AtSUC3 expresados en tejido demandante, probablemente permitan que la sacarosa entre a los tejidos para ser metabolizada.

#### **2.4.2 Transportadores de hexosas.**

Además del transportador de sacarosa, también están presentes en las células los transportadores de hexosas, ubicados en la membrana plasmática, que permiten la entrada de la glucosa y fructosa, producidas de la hidrólisis de la sacarosa por la invertasa de la pared celular. La actividad catalítica de la invertasa de pared se incrementa en tejidos donde la expansión celular es alta, la actividad de esta enzima, ayuda a mantener una diferencia entre la concentración de sacarosa del floema y la concentración de sacarosa de células del tejido demandante.

Algunos transportadores en plantas, se han caracterizado en sistemas heterólogos. Se ha determinado que funcionan como “simporter” y su actividad permite el movimiento de azúcares en contra del gradiente de concentración (McDonald *et al.*, 1997). Los transportadores de hexosas, pertenecen a familias génicas de muchos miembros, en *Arabidopsis* se han identificado 26 secuencias, algunos de los cuales son llamados transportadores de azúcares (AtSTPs). Sus secuencias de aminoácidos han permitido clasificarlos como miembros MFS. Al igual que los transportadores de sacarosa (SUTs). Los

miembros de esta familia transportadores de azúcares (AtSTPs), se caracterizan por tener una estructura con 12 regiones transmembranales (Aoki *et al.*, 2003). Algunos de ellos han sido clonados y expresados en sistemas heterólogos como levadura u oocitos de *Xenopus*, donde se ha caracterizado su funcionalidad. Todos los que se han estudiado tienen un mecanismo que es dependiente de energía (H<sup>+</sup>/simporter) (Tanner y Caspari, 1996).

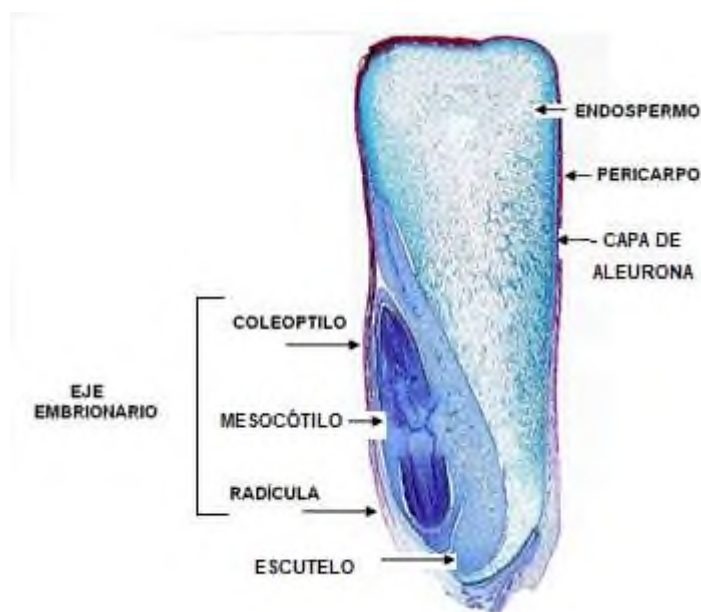
## 2.5 MAÍZ, GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO

El maíz es una planta de gran importancia económica, originaria del Continente Americano. Es una herbácea monocotiledónea pertenece a la clase *Liliopsida* y la subclase *Commelinidae*, la orden *Cyperales*, y la familia *Poaceae* (o Gramíneas). Los tres géneros americanos son: el *Zea*, de alta importancia económica y alimenticia, representado por la especie *Zea mays*, el *Tripsacum*, de cierto valor como cultivo forrajero, pero escaso o ninguno como grano para consumo humano y *Euchlaena* (teosintle), el pariente silvestre más cercano al maíz (CIBIOGEM 2018).

### 2.5.1 Estructura.

La semilla de maíz, está compuesta por dos tejidos filiales el embrión que dará origen a la futura planta y el endospermo, un tejido rico en nutrientes (Figura 3). El endospermo de maíz se diferencia a partir de cuatro tipos de células principales, las cuales son caracterizadas por tener diferentes morfologías celulares y patrones de expresión: el endospermo almidonoso, la capa de transferencia basal del endospermo (BETL), la capa de aleurona y la región circundante del embrión (escutelo) (Doll *et al.*, 2017). El eje embrionario como en otras monocotiledóneas está totalmente desarrollado y se pueden observar meristemos bien definidos. Contiene un meristemo radicular, que dará origen al sistema radicular, un meristemo aéreo con varios primordios foliares pequeños dentro de una cubierta protectora, a los que, en conjunto, se le llama coleóptilo. Las células de la

capa externa remanente del endospermo se diferencian porque en la madurez son cúbicas y acumulan aceite cuerpos proteicos y lipídicos, está capa parecida a una epidermis separa el endospermo de los tejidos maternos y está involucrada en la movilización de nutrientes durante la germinación (Dolls *et al.*, 2017).



**Figura 3** Estructura de la semilla de maíz (Tomado de Avila Alejandre *et al.*, 2013).

### 2.5.2 El maíz variedad VS-536.

México es el principal productor de maíz blanco en el mundo. Así mismo, éste es el cultivo más importante del país ya que representa aproximadamente el 35% de la superficie sembrada durante 1 año agrícola y se consumen anualmente 20 millones de toneladas (CIBIOGEM, 2018). Durante 2012 se sembraron 7.3 millones de hectáreas de maíz (*Zea mays* L.) grano con un rendimiento medio de 3.2  $\text{tha}^{-1}$ . De éstas, el 80 % corresponden a siembras de temporal y 20 % bajo condiciones de riego. En el sureste de México, el estado de Veracruz es el tercer productor de maíz y contribuye con 5.4 % de la producción nacional (SIAP, 2019). Dadas las condiciones actuales se estima que la producción oscile en 2 millones de toneladas. Además, se prevé que a lo largo del periodo 2012-2020

México será autosuficiente para este grano. Por otro lado, en México, se consumen aproximadamente 11 millones de toneladas de maíz amarillo. Alrededor del 70% de este, se destina a forraje, el 25% a la industria almidonera, y el resto, es para consumo humano y otros usos (CIBIOGEM, 2018).

La variedad de maíz blanco VS-536, fue generada por el Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), entre los años 1990 y 2004. Está formada por 9 líneas provenientes del mejoramiento genético del campo experimental de Cotaxtla se adapta bien a las regiones tropicales húmedas de México, en áreas con altitudes de 25 a 28°C y precipitaciones anuales de entre 800 y 1600 milímetros. Esta variedad presenta un buen rendimiento, su ciclo vegetativo es intermedio, con 53 días a la floración masculina, 90 días a la madurez fisiológica y 120 días a la cosecha. Entre sus ventajas se encuentran que: mantiene su vigor a lo largo de carios ciclos productivos, son resistentes a pudriciones de mazorca y cumple con las especificaciones de la norma mexicana para maíces destinados al proceso de nixtamalización (Sierra-Macías *et al.*, 2016).

**Tabla 2** Aspecto de las mazorcas y características de las semillas VS-536 (Tomado de Sierra-Macías *et al.*, 2016). Se muestra a manera de ilustración las mazorcas de la variedad.

Características	Maíz VS-536
Altura de planta y 1ª mazorca (Centímetros)	266/141
Días a floración masculina /femenina	53/54
Días a cosecha	115 a 120
Cobertura de la mazorca	Buena
Tipo de grano	Blanco dentado
Tolerancia a enfermedades ó Acame	Buena
Rendimiento (toneladas por hectárea)	5.8

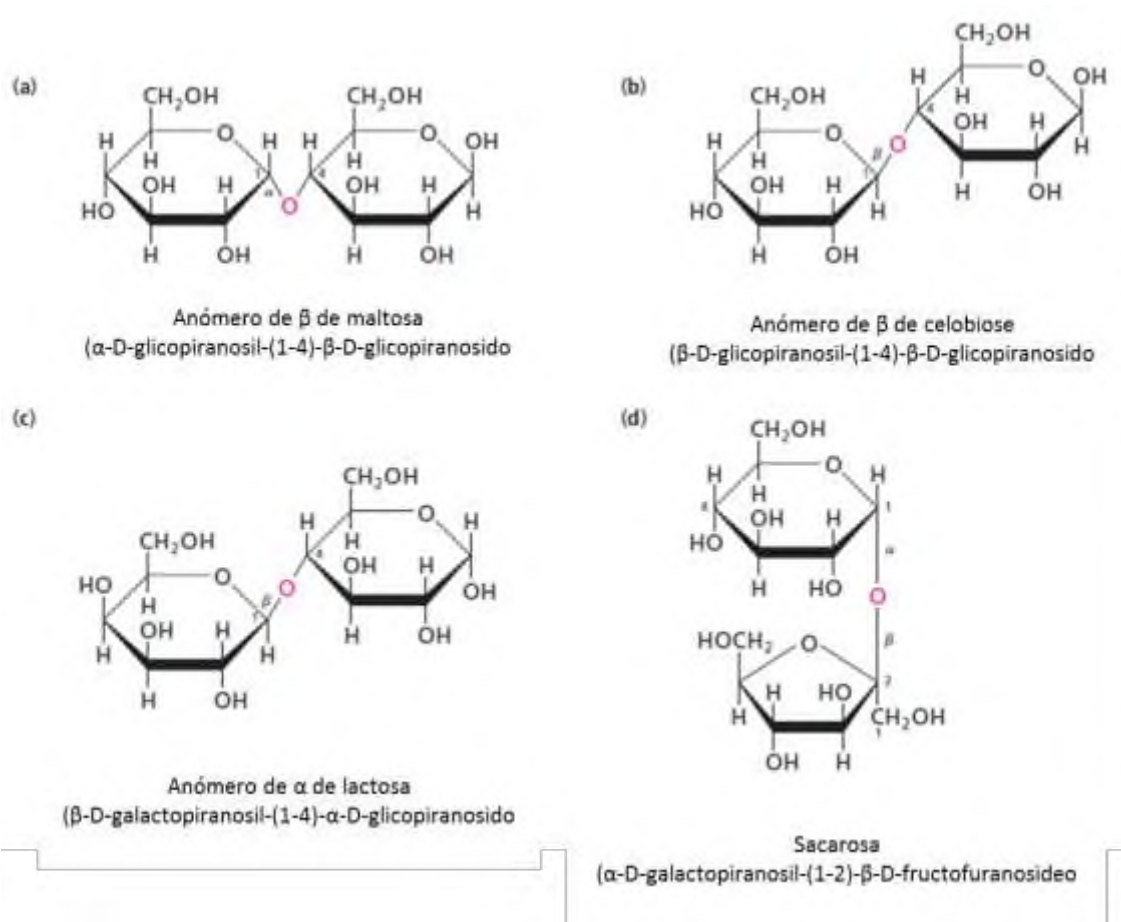


Desde que obtuvo el registro provisional ante el SNICS en 1992 se ha producido y distribuido semilla certificada por un grupo de empresa del sureste entre las que se encuentran TERRA Semillas en Veracruz y PROASE de Chiapas. Para 2012, se reportó la siembra comercial de 650,500 hectáreas en el trópico mexicano (Sierra-Macías *et al.*, 2016). Los estudios acerca de su rendimiento son extensos, pero los estudios sobre su metabolismo y fisiología son escasos.

## **2.6. CARBOHIDRATOS.**

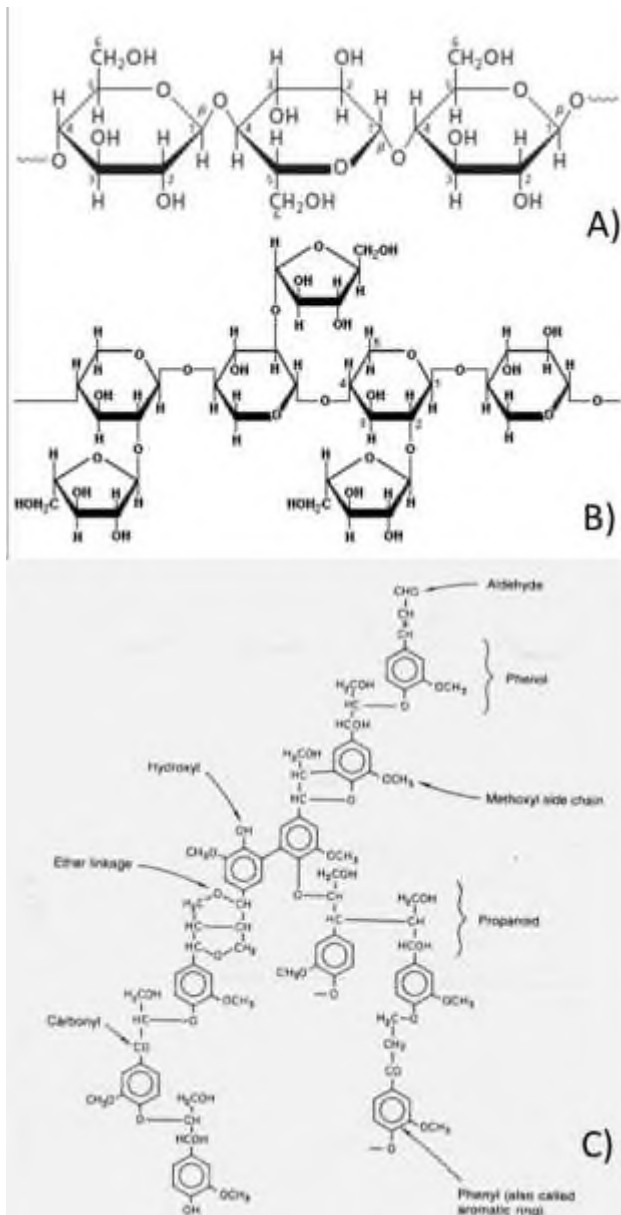
Los glúcidos y en concreto el almidón suelen ser los principales compuestos de reserva en los granos de cereales (Mcneill *et al.*, 2017).

Los carbohidratos o glúcidos son biomoléculas abundantes en la naturaleza, pueden ser monosacáridos, oligosacáridos o polisacáridos. Los monosacáridos están formados por una unidad de polihidroxialdehído o polihidroxicetona, el más abundante es la D-glucosa que es un azúcar de 6 carbonos. Los oligosacáridos constan de cadenas cortas de monosacáridos unidos por enlaces glucosídicos (Mc Neill *et al.*, 2017). Los más abundantes son los disacáridos, y el más conocido es la sacarosa, formado por los monosacáridos D-glucosa y D-fructosa; ambos de seis carbonos (Figura 4).



**Figura 4** Estructura de los disacáridos (Modificado de Murray, 2010)

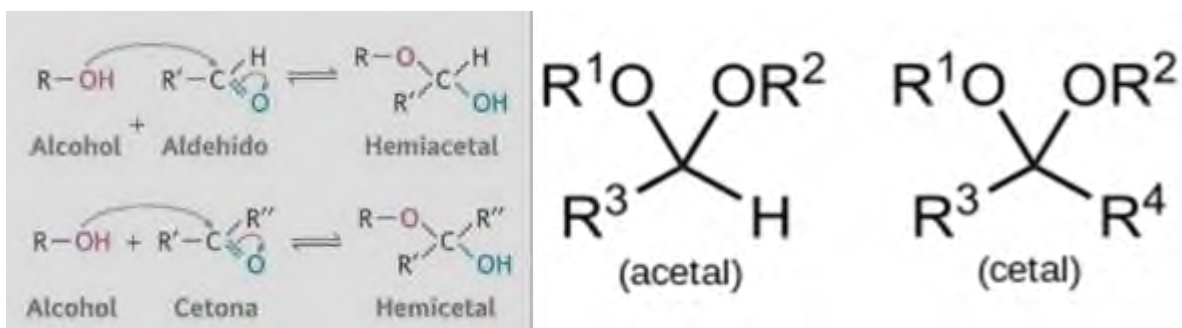
Las plantas también pueden formar polisacáridos de cadena larga, de centenares o miles de unidades de monosacáridos (Figura 5). Algunos son lineales como la celulosa (enlace  $\beta$ 1-4), Hemicelulosa (enlace  $\beta$ 1-4), y almidón que presentan ramificaciones (enlace  $\alpha$ 1-4) (Kühn *et al.*, 2010).



**Figura 5** Estructura de la A) celulosa, B) hemicelulosa y C) lignina (Modificado de Murray, 2010)

### 2.6.1 Métodos de determinación de Azúcares reductores.

Dada la importancia de los azúcares se han desarrollado varios métodos para su determinación. Los azúcares que dan resultados positivos con las soluciones de Tollens, Benedict o Fehling se conocen como azúcares reductores y todos los carbohidratos que contienen un grupo hemiacetal o hemicetal (Figura 6) dan pruebas positivas; entre ellos están la glucosa, fructosa, manosa, maltosa, lactosa. Los carbohidratos que solo contienen grupos acetal o cetal no dan pruebas positivas con estas soluciones y se llaman azúcares no reductores como la sacarosa.



**Figura 6** Grupo Hemicetal y Acetal (modificado de Murray, 2010)

Estos azúcares tienen un grupo aldehído o cetónico libre y se transforman fácilmente en enediones (reductores) al calentarlos en soluciones alcalinas; dichos enediones son altamente reactivos y se oxidan fácilmente en presencia de oxígeno u otros agentes oxidantes como Ag<sup>+</sup>, Hg<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup> y Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-</sup> y los azúcares se oxidan formando mezclas complejas de ácidos. Esta acción reductora es la que se utiliza en las determinaciones tanto cualitativas como cuantitativas (Tiwari *et al.*, 2006). En la Tabla 3 y 4 se resumen los métodos para determinación de azúcares.

NOMBRE DE LA PRUEBA	TIPO DE AZÚCAR	DESCRIPCIÓN	REFERENCIAS
<b>AZUCARES TOTALES “FENOL SULFÚRICO”</b>	Monómeros Reductores	Los azúcares se hidrolizan, forman furfural y fenol lo que se lee en una longitud de onda de 490 nm.	Dubols <i>et al.</i> , 1956.
<b>DNS (ÁCIDO DINITRICO SALICÍTICO)</b>	Monómeros Reductores	El azúcar reduce al grupo de nitro del DNS, para dar el producto mono-amino correspondiente. Esta reacción da un producto colorido en solución alcalina, detectable a 575 nm.	Miller, 1959; Southgate, 1991; Herrera <i>et al.</i> , 2011.
<b>DETERMINACIÓN DE AZÚCARES POR POLARIMETRÍA</b>	Monómeros Reductores	Técnica no destructiva basada en la medición de la rotación óptica producida sobre un haz de luz polarizada al pasar por una sustancia ópticamente activa.	Herrera <i>et al.</i> , 2011.
<b>DETERMINACIÓN DE AZÚCARES POR HPLC</b>	Monómeros y Disacáridos Reductores	Los carbohidratos se separan en una columna de intercambio iónico $\text{NH}_2^-$ acoplada con una fase móvil compuesta por acetonitrilo y agua.	Douglas <i>et al.</i> , 201.
<b>DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS POR ESPECTOFOTÓMETRO DE INFRARROJO CERCANO.</b>	Monómeros y Disacáridos Reductores	La solución de carbohidratos es atravesada por un haz de luz, la muestra absorbe frecuencias específicas que son convertidas a una señal eléctrica para obtener el IR final.	Leopol <i>et al.</i> , 2011.

**Tabla 3** Métodos de Determinación Cuantitativa de Azúcares

**Tabla 4** Métodos de Determinación Cualitativa de Azúcares

NOMBRE DE LA PRUEBA	TIPO DE AZÚCAR.	DESCRIPCIÓN	REFERENCIAS.
<b>PRUEBA DE MOLLISH</b>	Monómero y disacáridos reductores	Determina la presencia de carbohidratos al reaccionar el carbono anométrico con $\alpha$ -Naftol produce un complejo de color morado.	Quezada,2007
<b>LUGOL</b>	Polímeros de carbohidratos	Se forma un complejo azul oscuro debido a la adhesión del yodo o yoduro a la molécula de azúcar.	Harpercollsge,2014
<b>BLAL</b>	Monómeros reductores (pentosas)	Las pentosas y sus derivados reaccionan con orcinol y los iones de hierro, generan productos de color azul. Otros colores indican resultados negativos.	Harpercollsge,2014
<b>SELLWANOFF</b>	Monómeros reductores (hexosas)	Deshidrata cetohechosas para formar 5 hidroximetilfurfural. Un producto rojo indica un resultado positivo.	Dubols <i>et al.</i> , 1956
<b>BARFOED</b>	Monómeros reductores	Detecta monosacáridos reductores en disolución. Son oxidados por el ión de cobre, formando ácido carboxílico y una precipitación rojiza de ión cobre.	Harpercollsge,2014
<b>FEHLLNG</b>	Monómeros reductores	Reduce el cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) por oxidación con los azúcares reductores, en medio alcalino con presencia de tartato de sodio y potasio para permitir la estabilización del cobre. Forma un precipitado rojo ladrillo.	Dey y Ghosh, 2010

## **2.6.2 REACTIVO DE BENEDICT.**

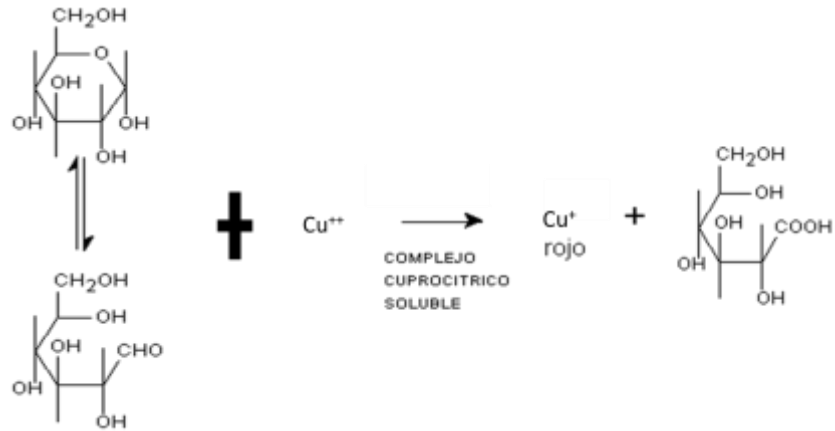
La determinación de azúcares usando el reactivo de Benedict, es una técnica desarrollada por Stanley Rossiter Benedict (Stanley, 1907). En un inicio, se usó para determinar la presencia de azúcar en la orina.

El primero en mencionar la presencia de dulzor en la orina fue Thomas Willis en 1674, más tarde en 1715 Dobson a partir de técnicas de fermentación mostró que la presencia de ese dulzor era por la presencia de azúcar. Vogel, en 1815, descubrió la propiedad reductora de las soluciones de glucosa en presencia de compuestos alcalinos de sales metálicas; y no fue sino hasta que pasaron 100 años que Stanley R. Benedict desarrolló la prueba química para determinar la presencia de azúcares en la orina (Stanley, 1909). Esta prueba se convirtió en una de las técnicas más utilizada en toda América del Norte para el diagnóstico de Diabetes (Simone *et al.*, 2002).

La reacción o prueba de Benedict identifica azúcares reductores como lactosa, glucosa, maltosa y celobiosa y fue ampliamente utilizado en la clínica hasta los años 50's. La llegada de métodos enzimáticos como la glucosa oxidasa, fue desplazando su uso clínico, sin embargo, se utiliza como determinación cualitativa para alimentos y otros materiales.

### **2.6.2.1 Fundamento de la técnica.**

La solución de Benedict es de color azul claro debido al sulfato de cobre, cuando se mezcla y calienta con una solución con azúcares reductores, el ión cúprico ( $\text{Cu}^{2+}$ ) de color azul se reduce a óxido cuproso ( $\text{Cu}^+$ ), debido a que el azúcar, le dona electrones oxidando el grupo aldehído a ácido carboxílico (Figura 7). Durante este proceso, se genera un precipitado marrón- anaranjado dependiendo de la concentración de azúcares presentes (Figura 8).



**Figura 7** Reacción de Benedict paso a paso (Modificado de Cristancho-Cruz y Monroy-Soler, 2014).



**Figura 8** Cambios en la coloración de la reacción de Benedict cualitativa dependiendo de la concentración (Elaborado por el autor).

### 2.6.3. Métodos de extracción de azúcares.

Los carbohidratos, dependiendo de su estructura, polisacáridos (azúcares complejos) o monosacáridos (azúcares simples), propiedades químicas y biológicas se pueden extraer

por diferentes métodos. Los métodos de extracción de azúcares se pueden dividir en físicos, químicos y biológicos.

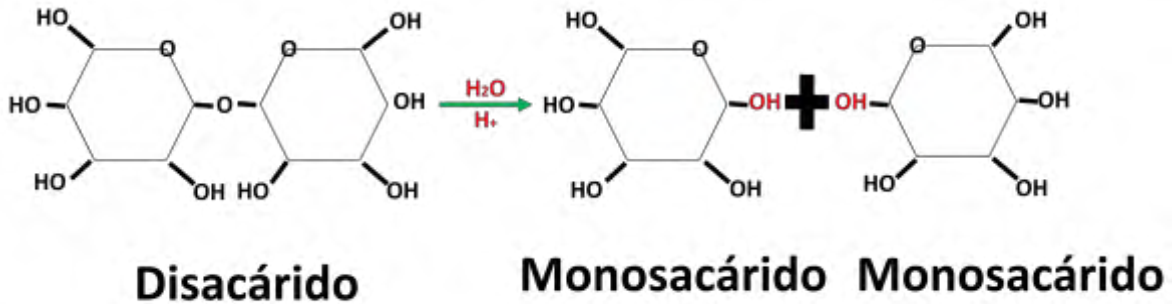
Los métodos de extracción físicos son aquellos en los que se no modifica o altera la estructura de los carbohidratos ejemplos:

Machacado: Este método de extracción se lleva a cabo mediante un prensado

Dilución o malteado: La muestra se sumerge en agua caliente logrando extraer los azúcares

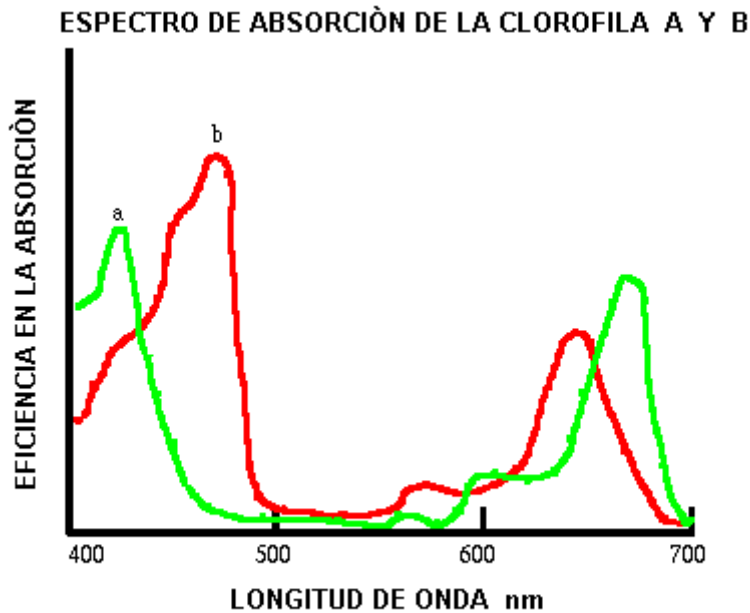
Los métodos químicos a diferencia de los físicos alteran la estructura de los azúcares complejos (polisacáridos) para convertirlos en azúcares simples que se puedan extraer con mayor facilidad una de las técnicas más utilizadas es la Hidrólisis.

La Hidrólisis se define como una reacción ácida de descomposición doble con agua como uno de los reactivos. Los reactivos distintos del agua y sus productos pueden ser moléculas neutras. La hidrólisis de un enlace glucosídico se lleva a cabo mediante la disociación de una molécula de agua del medio (Figura 9). El hidrógeno del agua se une al oxígeno del extremo de una de las moléculas de azúcar; el  $\text{OH}^-$  se une al carbono libre del otro residuo de azúcar. El resultado de esta reacción, la hidrólisis ácida, es la liberación de un monosacárido y el resto de la molécula que puede ser un monosacárido si se trataba de un disacárido o bien del polisacárido restante si se trataba de un polisacárido más complejo (Sánchez, 2009). Existe reportes que muestran que al realizar hidrólisis “mixta” (métodos físicos y químicos) se obtiene una mayor concentración de azúcares reductores, a partir de residuos lignocelulósicos (Sánchez, 2009).



**Figura 9** Reacción de la hidrólisis ácida (Tomado de <https://www.ecured.cu/Hidrólisis> )

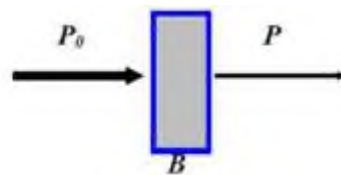
Los métodos de extracción se apoyan en técnicas análisis que incluyen como operaciones básicas la espectrofotometría y la centrifugación. La espectrofotometría es una de las técnicas analíticas, más potentes, y que permiten correlacionar la cantidad de radiación absorbida por una sustancia a concentraciones conocidas (Murray et al., 2010; Lindhorst, 2007; Lehninger, 1993). Este procedimiento hace referencia al uso de la luz para medir las concentraciones de ciertas sustancias químicas; se debe tener presente la concentración de las especies absorbentes dado a que esto es proporcional (Salomons, 1990; Boyer, 2000; Belitz y Grosch, 1982). Cada sustancia tiene su propio espectro de absorción, el cual es una curva que muestra la cantidad de energía radiante absorbida (Absorbancia), por la sustancia en cada longitud de onda del espectro electromagnético (Figura 10).



**Figura 10** Ejemplo de Espectro de absorción (Modificado de Salisbury - Ross, 1999).

El método se rige por 2 leyes:

1.-Ley de Lambert. Establece que cuando pasa luz monocromática en un medio homogéneo, la disminución de la luz que incide es proporcional al espesor del medio, lo que equivale a decir que la intensidad de la luz transmitida disminuye exponencialmente al aumentar el espesor del medio absorbente (Figura 11).

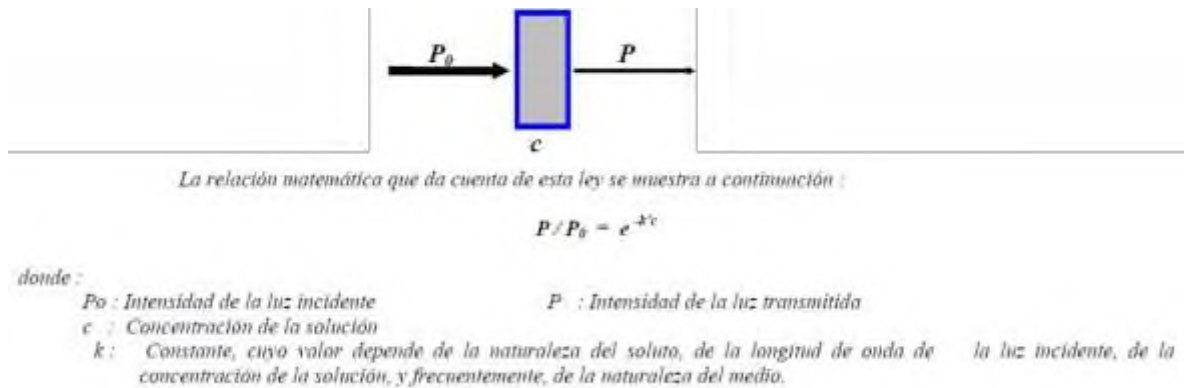


La siguiente relación matemática da cuenta de esta ley:  $P / P_0 = e^{-kb}$

$P_0$  : Intensidad de la luz incidente       $P$  : Intensidad de la luz transmitida       $b$  : Espesor del medio absorbente  
 $k$  : Constante, cuyo valor depende de la naturaleza del soluto, de la longitud de onda de la luz incidente, del espesor del medio absorbente y de la naturaleza del medio.

**Figura 11** Ley de Lambert.

2. Ley de Beer. Cuando la intensidad de un haz de luz monocromática disminuye exponencialmente al aumentar la concentración de la sustancia absorbente a través de un medio homogéneo (Figura 12 y 13). Estas leyes se combinan para formar la ley de Lambert-Beer.



**Figura 12** Ley de Beer.



**Figura 13** Ley de Lambert y Beer.

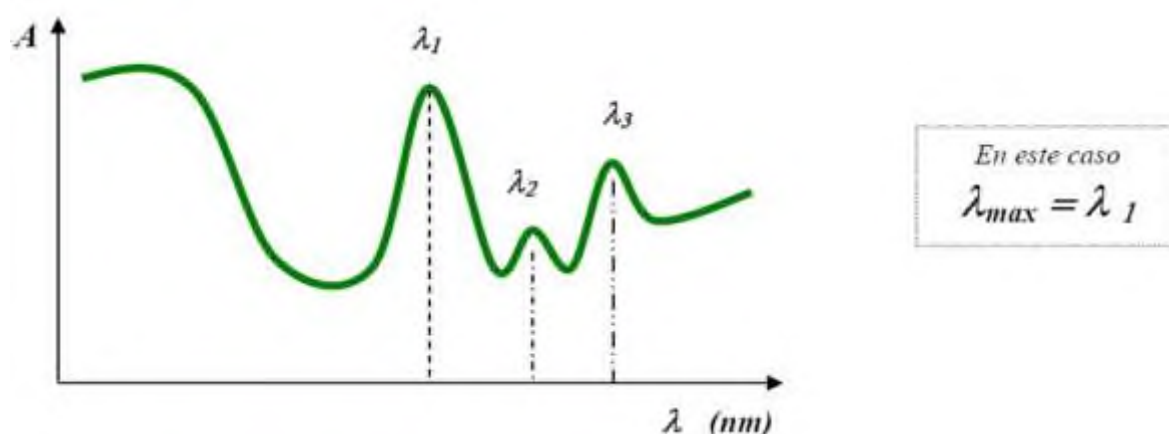
Transmitancia (T). Es la razón entre la luz monocromática transmitida (p) por una muestra y la energía o luz incidente (Po) sobre ella Tanto la energía radicante como el incidente deben ser medidas a la misma longitud de onda

Absorbancia (A). Se define como la cantidad de energía radiante absorbida por una sustancia pura o en una solución. Corresponde al logaritmo negativo de la transmitancia.

Las mediciones de absorbancia y transmitancia se hacen por comparación entre la muestra problema y un estándar arbitrario o referencia. Como la referencia debe poseer un porcentaje de transmitancia de 100% esta es llamada referencia de 100% o absorbancia cero.

Longitud de Onda.

La longitud de onda, de trabajo, corresponde, generalmente a la longitud de onda en la cual la absorbancia del analito (sustancia a analizar) es máxima, y recibe el nombre de lambda máximo ( $\lambda_{max}$ ). Para seleccionar esa lambda máxima se hace un espectro de absorción o curva espectral, y que consiste en una gráfica de la absorbancia de una solución de la sustancia absorbente de concentración adecuada, medida a distintas longitudes de onda y en ellas se determinará el Lambda máxima (Figura 14).



**Figura 14** Curva espectral.

Las mediciones de absorbancia se hacen en la zona de longitudes de onda donde se espera que absorba las sustancias problema. Sustancias coloreadas se leerán en la zona visible del espectro 380-800 nm. Sustancias no coloreadas se leerán en la región ultravioleta del espectro de 200-380 nm.

### 3 JUSTIFICACIÓN.

La germinación es un proceso esencial que permite que el embrión de la semilla crezca y se diferencie desarrollando su capacidad fotosintética (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1989; Bove *et al.*, 2002). La germinación se inicia con la hidratación de la semilla quiescente y termina con la elongación del eje embrionario. Uno de los procesos más estudiados en el desarrollo de la plántula es la movilización de los polímeros de glucosa, el almidón y sus constituyentes amilosa y amilopectina.

Sin embargo, a pesar de los avances sobre la fisiología de la germinación y en la comprensión de sus bases moleculares (Nonogaki, 2018, Bove *et al.*, 2002, Dekkers y Smeekens, 2007; Yang *et al.*, 2007; Hynek *et al.*, 2009), la identificación de la fuente de carbono que el embrión utiliza para apoyar la actividad metabólica durante la emergencia de la radícula sigue sin estar clara. En este sentido, recientemente, se ha postulado que, en maíz, el embrión reinicia su metabolismo a partir de la sacarosa proveniente del escutelo, que a su vez es hidrolizada a monosacáridos.

La germinación es el primer paso del establecimiento de los cultivos, se ha demostrado que no siempre, las semillas germinadas, generan hojas verdaderas o se anclan al suelo, es decir no se establecen y por lo tanto se reduce la cobertura de los cultivos y eventualmente el rendimiento. Las técnicas para evaluar la germinación de las semillas y predecir su establecimiento, incluyen principalmente parámetros fisiológicos y la respuesta posterior al daño por envejecimiento. Sin embargo, el estudio de la dinámica del consumo de reservas puede proporcionar un parámetro bioquímico adicional para la evaluación del vigor de lotes de semillas de cereales.

Por tal motivo, se pretende realizar la dinámica de azúcares reductores a lo largo de la germinación y etapas postgerminativas utilizando como semilla modelo el Maíz (*Zea mays*) de la variedad VS-536.

#### **4 HIPÓTESIS.**

En maíz, el embrión reinicia su metabolismo a partir de carbohidratos provenientes del escutelo, los cuales son hidrolizados a monosacáridos. Por lo que habrá un aumento en el contenido de azúcares reductores libres en el embrión previo a la movilización de las reservas del endospermo.

#### **5 OBJETIVO PRINCIPAL.**

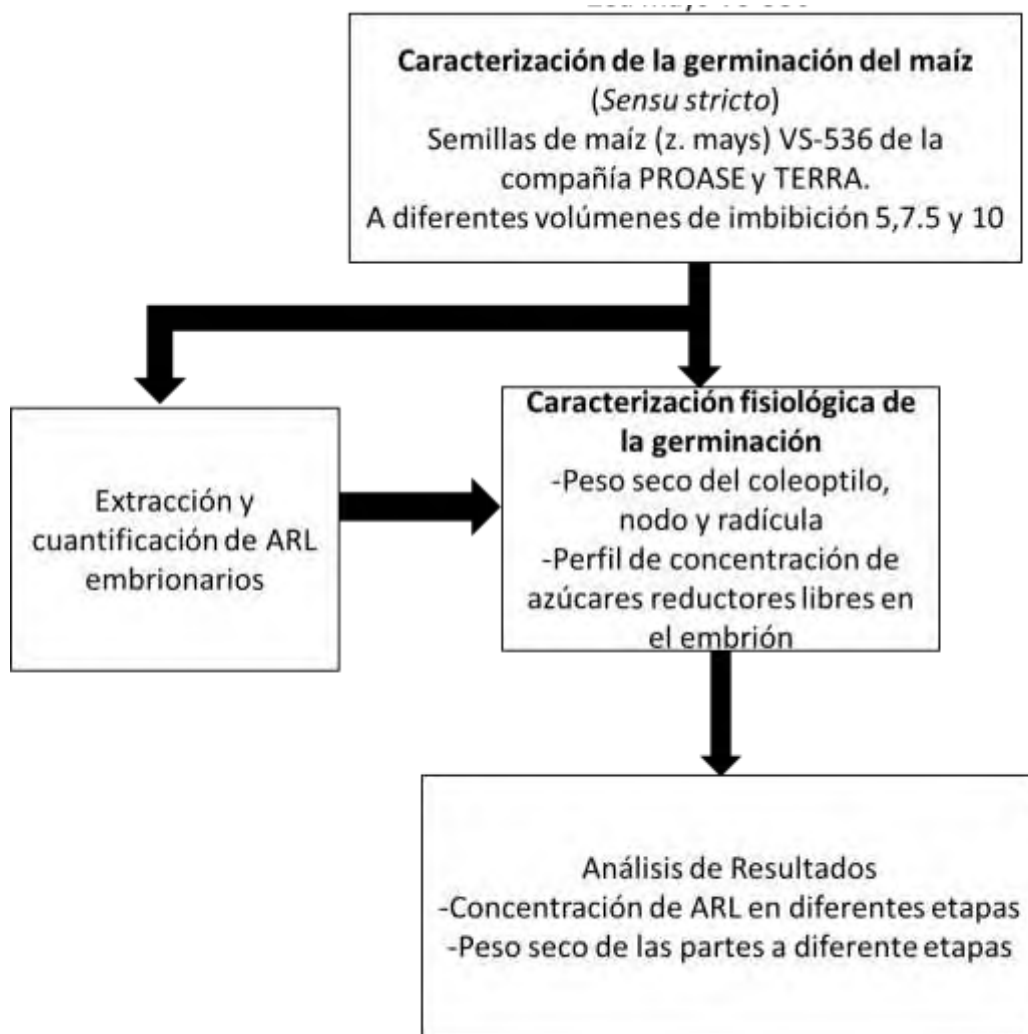
Determinar el perfil de carbohidratos reductores en el embrión, durante etapas pregerminativas, germinativas y postgerminativas, en maíz (*Zea mays*) variedad VS-536.

#### **5.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS.**

1. Caracterizar la germinación de la variedad VS-536.
2. Establecer las condiciones para la extracción y determinación cuantitativa de azúcares reductores, usando como base el método de Benedict.
3. Establecer la dinámica de concentración de azúcares reductores a 0, 4, 12, 24, 48, 72 y 96 horas de germinación en embriones de maíz variedad VS-536.

## 6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

Estrategia experimental para el estudio de la dinámica de carbohidratos reductores durante la germinación



.ARL (Azúcares reductores libres) TG50 (Tiempo de germinación 50)

## 7 MATERIALES Y MÉTODOS.

### 7.1. Material Biológico.

En todos los experimentos se utilizaron semillas de *Zea mays* VS-536, tanto de la compañía Productores Asociados de Semillas (PROASE-Chiapas; México) como de la compañía TERRA SEMILLAS de Veracruz; México. Ambas fueron adquiridas de manera comercial en la ciudad de Tuxtepec Oaxaca durante el mes de Mayo del 2016.

### 7.2 Caracterización de la germinación de maíz vs-536.

#### 7.2.1 Germinación en rollo húmedo (“taco”).

Se evaluó la germinación de maíz VS-536 tanto de la compañía PROASE como de la compañía TERRA utilizando los criterios de la ISTA (2017, Cap. 5, sección 5.6.2.1.1). Se usaron 3 lotes de 20 semillas lavadas y no lavadas. Las semillas se colocaron con el embrión hacia abajo sobre 2 capas rectangulares de papel estroza humedecido y cubrieron con franela. Después se enrollaron junto con la franela en forma de taco y se incubaron a 72 h a  $29 \pm 1^\circ\text{C}$  se verificó cada 24 h. El criterio para considerar a una semilla germinada fue la protrusión de la raíz con una longitud igual o mayor a 3 mm.

Se calculó el porcentaje total de germinación acumulada (%TGA) usando

$$\%TGA = \frac{nRPF}{n} * (100)$$

*Donde:*

*nRPF= número acumulado de semillas con raíz protruida al día final de evaluación.*

*n= número de semillas empleadas en cada repetición.*

El tiempo de germinación 50 (TG50) fue calculado graficando el recíproco del tiempo versus el % de germinación diaria acumulada (%GDA). Posteriormente, se realizó una regresión lineal y se calculó el TG50, a partir de la ecuación de la recta.

$$\%GDA = \frac{nRPD}{n} * (100)$$

*Donde:*

*nRPF= número acumulado de semillas con raíz protruida diariamente.*

*n= número de semillas empleadas en cada repetición.*

Con base en los resultados anteriores, se determinó que semillas tenían el mejor comportamiento.

### **7.2.2. Determinación del volumen ideal de agua para la germinación de semillas de maíz.**

Se sembraron 6 lotes de 20 semillas variedad VS-536 (Proase) sin lavar sobre 2 capas de papel estraza humedecidos con volúmenes 5, 7.5 y 10 ml de agua que se cubrieron con círculos de franela, se taparon y se incubaron a 28°C durante 48 h y se contaron las semillas germinadas a partir de las 24, 26, 28, 30, 32 y 48 h. Se determinaron las mismas variables que para el apartado de Germinación en "Taco". Los resultados se compararon para cada volumen de agua utilizado.

### **7.2.3 Dinámica del peso seco.**

Al terminar las horas correspondientes a la germinación para cada grupo de semillas, se disectó el embrión de cada semilla de la caja Petri y se separó en 3 secciones, coleóptilo, internodo y radícula. Las muestras seccionadas, se depositaron en las charolas de aluminio previamente preparadas a peso constante. Se mantuvieron a 60°C, durante

aproximadamente 12 h; hasta que alcanzaron peso constante. El peso seco del tejido se obtuvo por diferencia con respecto al peso inicial de la charola.

### **7.3 Establecimiento de las condiciones para la determinación cuantitativa de azúcares usando el método de Benedict.**

#### **7.3.1 Determinación de concentraciones adecuadas de sulfato cobre para el método de Benedict.**

Se utilizó el reactivo de Benedict preparado de acuerdo a la receta original, como control. El método se modificó con el fin de obtener resultados cuantitativos por espectrofotometría. Para lo cual, se probaron diferentes concentraciones de sulfato de cobre: 0.03, 0.05, 0.11, 0.14, 0.16, 0.22, 0.24 M. Para cada concentración se realizó una curva estándar de azúcares reductores, a partir de una solución madre de glucosa al 1%. Se tomaron 0, 5, 500  $\mu$ l y se mezclaron con el reactivo de Benedict en un volumen final de 1.5 ml. Se incubaron en baño maría en ebullición durante 5 minutos. Las muestras se centrifugaron a temperatura ambiente por 2 minutos a 5000 rpm. Se recuperó el sobrenadante y se diluyó 1:10 con agua destilada y se midió la absorbancia a 740 nm, en un espectro visible Biotraza modelo 722. Las lecturas se realizaron por triplicado para cada concentración de sulfato de cobre. Con los resultados se calculó la pendiente, el valor de b y mediante la ecuación de la recta se interpolaron para obtener los valores de las concentraciones de glucosa expresado en mg/ml. Adicionalmente, se calculó la  $R^2$  de cada curva.

#### **7.3.2 Preparación de curvas de calibración de azúcares.**

Una vez que se determinó la concentración de sulfato de cobre se evaluaron por separado cuatro azúcares reductores y sacarosa como control negativo. Las curvas se prepararon de acuerdo a la tabla siguiente:

**Tabla 5** Preparación de Curvas patrón de diferentes azúcares

Concentración (mg/ml)	*Azúcar (μl)	H2O (μl)	Reactivo de Benedict (μl)
0	0	500	1000
0.033	5	495	1000
0.66	10	490	1000
0.132	20	480	1000
0.165	30	470	1000
0.33	50	450	1000
0.66	100	400	1000
1.99	300	200	1000
3.3	500	0	1000

Los azúcares reductores empleados fueron: glucosa, maltosa, fructosa y lactosa. También se empleó la sacarosa como control negativo por no ser un azúcar reductor. Todas las concentraciones de todos los azúcares reductores se obtuvieron a partir de una solución madre al 1% p/v.

La mezcla se trató como se describió previamente. La absorbancia se determinó a 740 nm las lecturas se realizaron por triplicado. En cada caso se determinó la pendiente y el valor de R<sup>2</sup>.

#### **7.4 Extracción de azúcares en embriones de maíz a diferentes horas de germinación y postgerminativas.**

En este procedimiento, se prepararon lotes de 20 semillas; dos para Peso Seco, dos para cuantificar azúcares reductores. Todas se germinaron en una caja Petri como se describió previamente con 7.5 ml de agua durante los siguientes tiempos: 0, 4, 12, 24, 48, 72 y 96 h.

Al finalizar cada tiempo, se verificaron las semillas germinadas; los embriones se disectaron manualmente y los azúcares se aislaron de acuerdo con Sánchez-Linares *et al.*,

(2012). Se pesaron 200 mg de embriones y se trituraron entre 2 tubos de ensayo con 3 ml de etanol al 96% previamente calentado en baño maría a 80°C. El homogenado se depositó en tubos eppendorff y se centrifugó a 5000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar la centrifugación se retiró el sobrenadante, se depositó en otro tubo eppendorff y se evaporó en un horno a 60°C hasta sequedad. El residuo seco se reconstituyó con 300 µl de agua destilada y se utilizó inmediatamente. El contenido de azúcares reductores se determinó mediante el ensayo de Benedict modificado para obtener valores cuantitativos, el procedimiento se describió previamente.

Paralelamente, se determinó el peso seco de los embriones a los diferentes tiempos de germinación de la manera descrita previamente.

### **7.5 Análisis estadístico.**

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante un análisis de varianza por ANOVA de una vía y comparación de medias (Prueba de Tukey  $\alpha= 0.05$ ), empleando el paquete estadístico Minitab

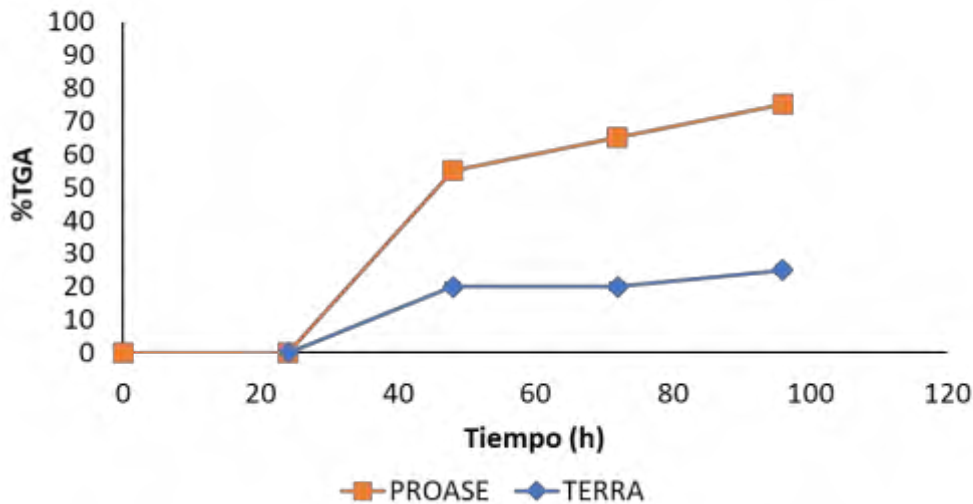
## 8 RESULTADOS Y DISCUSION.

### 8.1 CARACTERIZACIÓN DE LA GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS DE MAÍZ VARIEDAD VS-536 DE ACUERDO A LA ISTA 2017 (Método del taco).

En el presente trabajo, se utilizaron semillas de maíz VS-536, de las marcas comerciales disponibles en la ciudad de Tuxtepec: TERRA y PROASE (Figura 15), ambas marcas garantizan un porcentaje de germinación mínimo de 85 %. Como se comentó previamente, el INIFAP caracterizó el comportamiento en campo de la variedad, obteniendo la descripción de los parámetros agronómicos. Sin embargo, la semilla utilizada en este estudio se adquirió de distribuidores comerciales, por lo que, con el fin de comprobar su calidad, se germinaron en el laboratorio, como se menciona en “Materiales y métodos” usando el sistema de rollo húmedo o “taco”. Los resultados se muestran en la Figura 16.

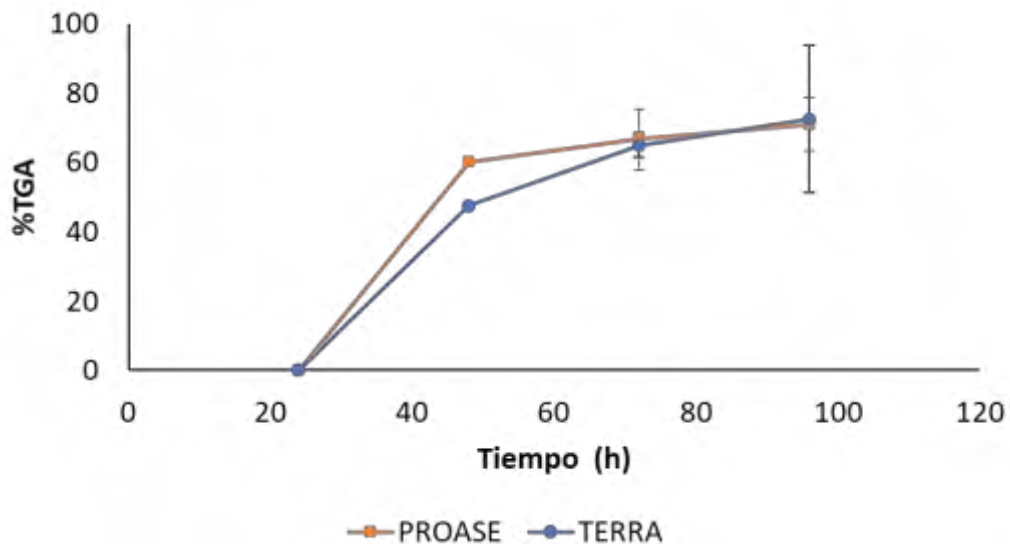


**Figura 15** Material biológico. Semillas marca PROASE.



**Figura 16** Germinación de semillas de maíz VS-536 lavadas, marca PROASE vs TERRA. Porcentaje de germinación acumulada (%TGA).  $n=3$

Los perfiles de germinación entre ambas son similares, la mayor parte de las semillas germinaron después de las 24 h y al tiempo analizado, 96 h, el máximo obtenido para PROASE fue de 75% y para TERRA de 25%. El tiempo para alcanzar el 50% de germinación acumulada ( $TG_{50}$ ), calculado para estos datos, fue de 48 h para Proase, mientras que para Terra no fue posible calcularlo (Tabla 6, Figura 16-B). Ninguna de las dos alcanzó el porcentaje recomendado por el proveedor, esto pudo deberse a dos razones principales: las semillas se encontraban deterioradas o bien, debido a que las semillas se comercializan tratadas con el funguicida Thiram, se lavaron usando una solución de SDS al 1%. Diversos reportes indican que, los detergentes afectan la germinación temprana de semillas (Levites y Kirikovich, 2013; Heidari, 2012) por lo que para descartar el efecto del detergente SDS del lavado sobre la germinación total acumulada (%TGA), se repitió el experimento con las semillas de las 2 marcas comerciales, sin lavado previo, los resultados se muestran en la Figura 17.



**Figura 17** Germinación de semillas de maíz VS-536 no lavadas, PROASE vs TERRA. Porcentaje total de germinación acumulada (%TGA). n=3

**Tabla 6** Porcentaje de germinación de semillas de maíz marca PROASE y TERRA. Se muestra el porcentaje final y el tiempo de germinación 50.

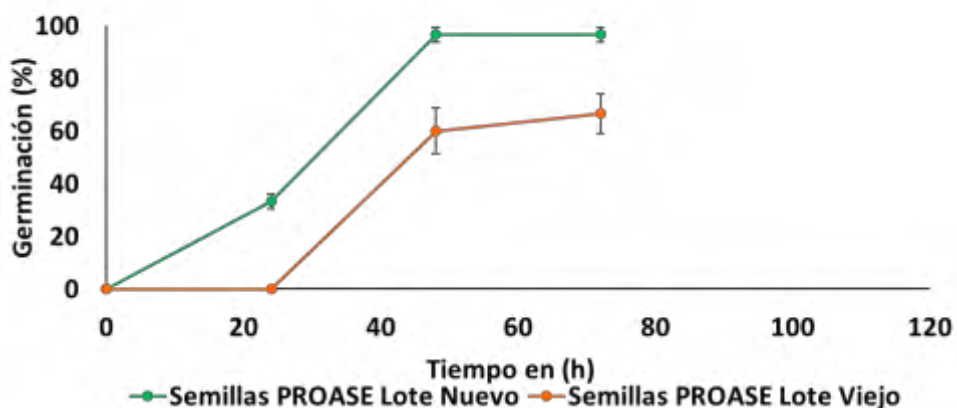
	Lavadas		Sin lavar	
	% TGA	TG <sub>50</sub> (h)	% TGA	TG <sub>50</sub> (h)
Proase	75	48.83	70	37.03
Terra	25	ND	72	51.81

\*ND= No determinado. El valor de semillas germinadas fue tan bajo que no se pudo determinar.

Las semillas de ambas marcas mostraron un incremento en el %TGA sin el lavado previo con SDS, e incluso alcanzaron porcentajes de germinación máxima similar, 70% y 72% para PROASE y TERRA, respectivamente. Con respecto al TG<sub>50</sub> mediante el recíproco del tiempo, el cual se muestra en la Tabla 6, para la marca PROASE fue de 48.23 h y para TERRA de 51.57 h. En estas condiciones, los mejores valores fueron para las semillas marca Proase, por lo que los experimentos siguientes se realizaron únicamente con esta marca.

El lavado previo de las semillas afecta el desempeño de las mismas durante la germinación, un estudio reciente indica que la concentración del detergente está relacionada directamente con las afectaciones a la germinación y al desarrollo posterior de las plántulas (Uzma *et al.* 2018). Otros autores mencionan que el lavado únicamente con agua (Acondicionamiento hídrico) favorece la germinación (Artola *et al.*, 2010; Garruña-Hernández *et al.*, 2013; Hernández López *et al.*, 2018). Por lo que se concluyó que, la adición de detergente en el lavado de semillas de maíz VS 536 tiene efectos negativos en su germinación y en los experimentos siguientes se propuso eliminar el paso de lavado de Thiram.

Sin embargo, los valores obtenidos de germinación total siguen siendo inferiores a los garantizados por los proveedores. Esto puede deberse a deterioro de las semillas, debido a la edad del lote adquirido y el almacenamiento. Sin embargo, debido que no fue posible tener datos confiables sobre el tiempo y el método de almacenamiento del lote de semillas, se propuso descartar estas posibles variantes y se adquirió un lote nuevo de semillas PROASE de un bulto recién abierto y se evaluó la germinación. Se repitió el experimento por triplicado y se evaluó a las 24, 48 y 72 h. Adicionalmente, las semillas del nuevo lote se dividieron en pequeños paquetes de 120 semillas selladas para protegerlas de la humedad ambiental. (Figura



18)

**Figura 18** Porcentaje de germinación diaria acumulada marca PROASE nuevo lote vs PROASE viejo lote.

Se puede apreciar en la Figura 18, que para el lote nuevo de semillas el %TGA fue de 96.66% a las 72 h, mientras que para el lote viejo fue de 70%, también presentan menor desviación estándar lo que las hace más homogéneas. Adicionalmente, el TG<sub>50</sub> del Lote nuevo fue en promedio de 25.5 h, es decir fue un 32% más rápido para alcanzar el valor de TG<sub>50</sub>; (Tabla 7) asimismo, el tiempo de rompimiento de latencia en el lote nuevo es menor en comparación con el lote viejo (alrededor de 24 h). En estos resultados son menores a los reportados para maíz criollo por otros autores (García Flores *et al.*, 2001; Avila-Alejandre *et al.*, 2013) y demuestra que este lote es más vigoroso.

**Tabla 7** Comparación del porcentaje de germinación acumulada y tiempo 50 para 2 lotes de maíz marca PROASE

	N° semillas Germinadas*	% TGA	TG <sub>50</sub> (H)
Lote Nuevo	19	96.7	25.5
Lote Viejo	16	70	37.7

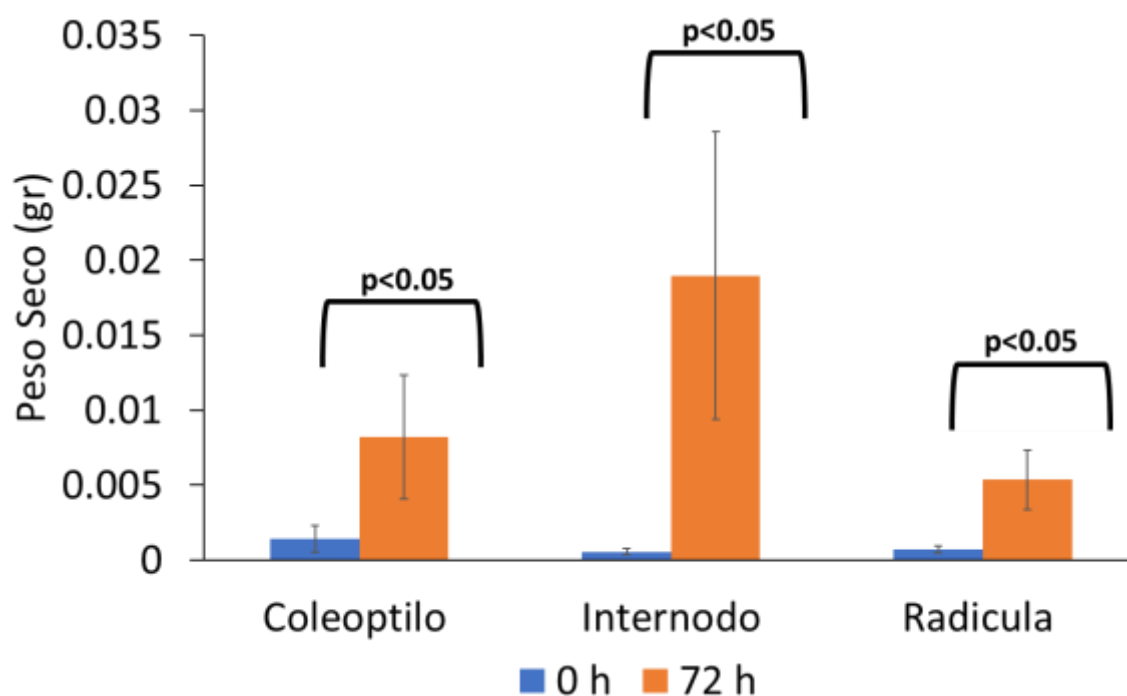
\*promedio n=3 repeticiones

Por otro lado, la ISTA considera que una calidad adecuada en una variedad, debe presentar la morfología normal de las plántulas de la especie al final del periodo de incubación. La morfología normal del maíz fue descrita por Richart y Hanway en 1992, para la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura por sus siglas en inglés (FAO). Cuando se inicia la germinación, la radícula se elonga y sale a través del pericarpio. Inmediatamente después, emergen 3 o 4 raíces seminales al mismo tiempo, la plúmula, cubierta por el coleóptilo emerge por el otro extremo de la semilla (Paliwal, 2001). Una plántula normal, presenta una radícula y una plúmula con direcciones opuestas, en la zona central o internodo, se desarrollará el sistema de raíces adventicias. En la Figura 20 se puede observar que las plántulas de la marca PROASE muestran estas características de desarrollo.

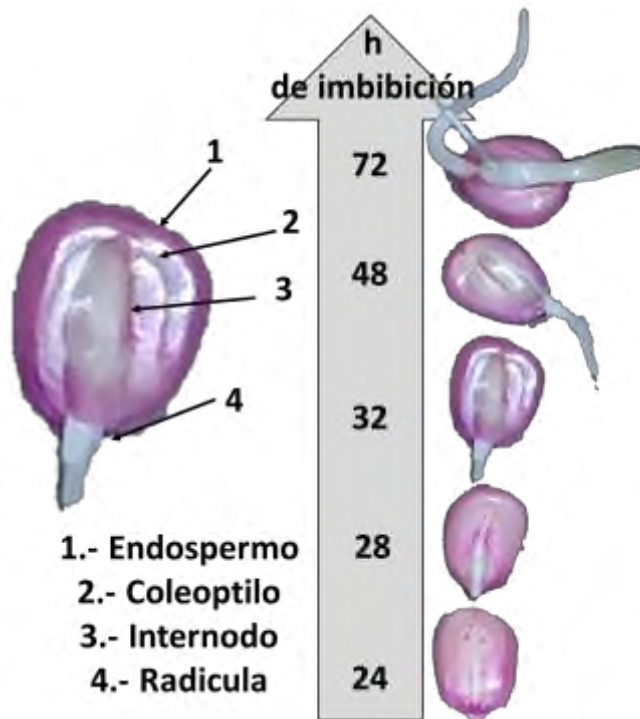
Una vez evaluada la germinación, se extrajeron los embriones de las semillas, se separaron en 3 partes coleóptilo, internodo y radícula y se llevaron a peso seco, se observa el cambio de peso de cada una de las partes a las 0 y a las 72 h. Se realizó un

estadístico de Tukey ( $p < 0.05$ ) para verificar si existen diferencias significativas por parejas entre el tiempo 0 y 72 h para cada parte del embrión. Todas las partes del embrión muestran un desarrollo apreciable ver Figura 20, la mayor masa celular se concentra en el internodo como se aprecia en la Figura 19

Con los datos anteriores se decidió que el Lote nuevo Marca PROASE se utilizaría para los posteriores experimentos ya que en general las semillas tienen un vigor mayor que las semillas de la marca Terra y al final de la germinación, las plántulas obtenidas tuvieron una morfología normal.



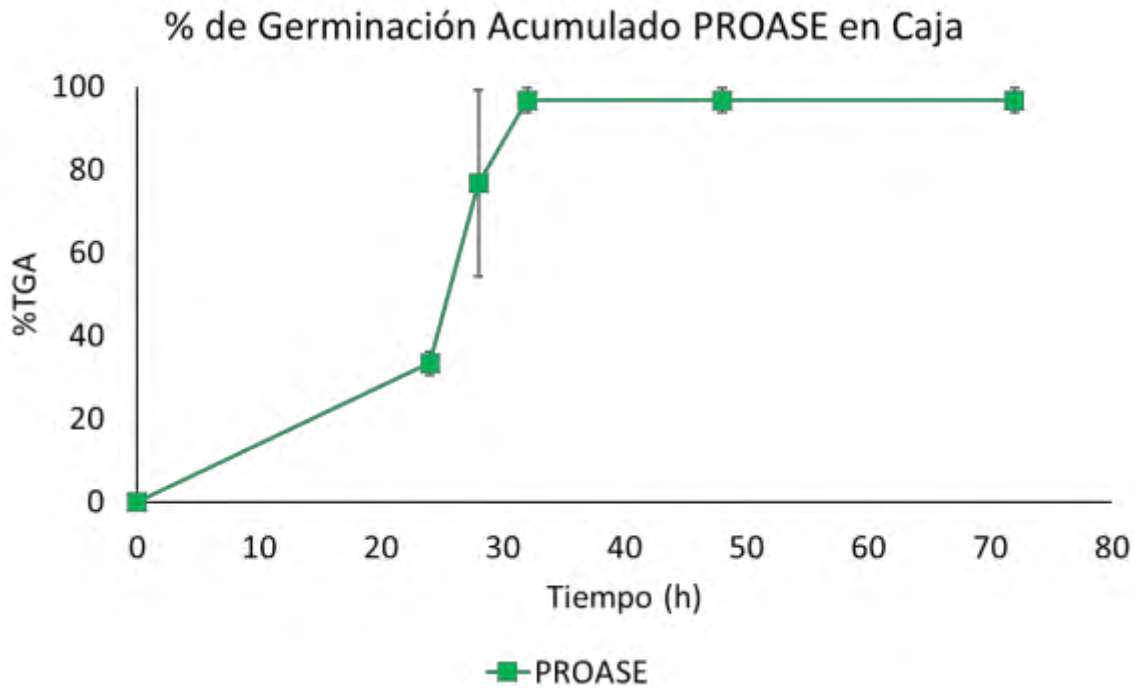
**Figura 19** Comparación del peso del internodo, coleoptilo y radícula a las 0 h vs 72 h. Los resultados por ANOVA de una sola vía y Tukey como prueba ad hoc para diferencias entre parejas  $p < 0.05$ .



**Figura 20** Proceso de germinación y etapas postgerminativas de la semilla de maíz se observa la morfología normal en todas las semillas. Elaboración propia.

Con el objetivo de controlar mejor las variables de germinación de las semillas, el método de siembra original llevado en rollo húmedo, se cambió por siembra en caja Petri de acuerdo con Hernández-López *et al.* (2018). De esta manera se facilita la realización de estudios morfométricos y en la siembra en la caja Petri se controla mejor el volumen de agua empleado para imbibir a las semillas.

Las cuales se trataron de la misma forma que el experimento anterior. Los resultados del % TGA en la caja Petri se muestran en la Figura 21.



**Figura 21** % TGA de semillas de maíz en caja de 0 h hasta las 72 h.

**Tabla 8** Porcentaje de germinación en caja de semillas de maíz y TG<sub>50</sub>

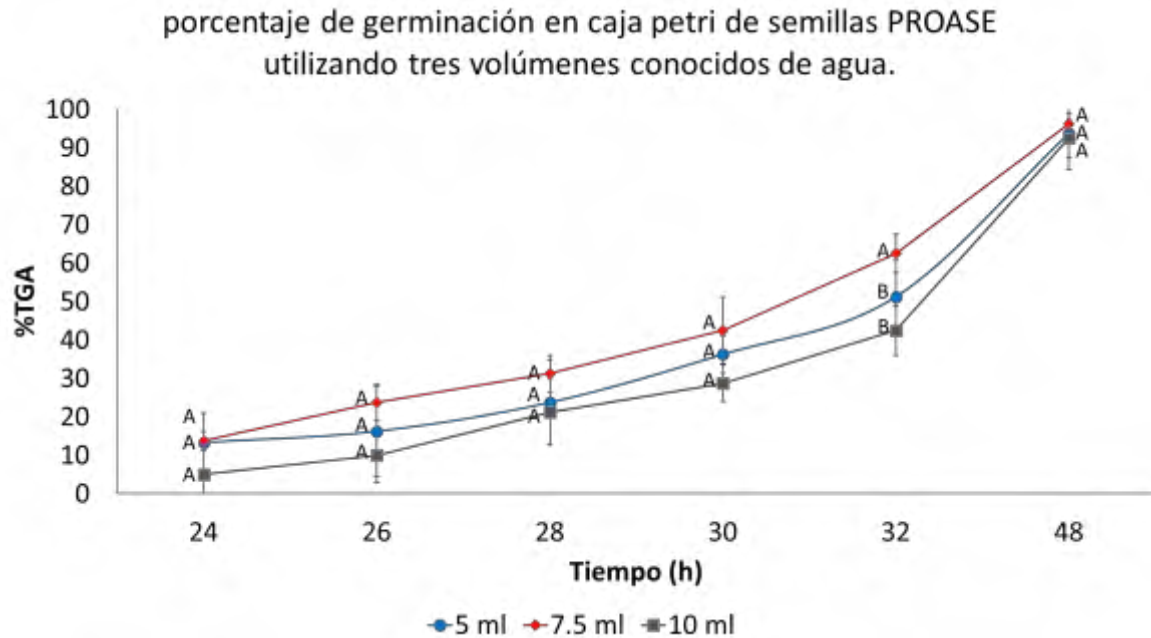
N° semillas	%TGA	TG <sub>50</sub> (H)
<b>Germinadas</b>		
20	100	29.468

Se observa que, el porcentaje de germinación total acumulado fue del 100% y su TG<sub>50</sub> fue de 29 h de la curva promedio de germinación y comparandolo con el que se obtuvo en la siembra en “taco”, que fue de 25.5 h, los tiempos son similares, por lo que el nuevo método de siembra en caja no compromete la viabilidad del experimento.

Para descartar el efecto del volumen de agua sobre la germinación se realizó la siembra en caja usando 3 volúmenes diferentes de agua para imbibir a las semillas 5, 7.5 y 10 ml. Se realizó prueba de Tukey para verificar si existen diferencias significativas entre los volúmenes usados durante la germinación.

La germinación acumulada diaria entre los tres volúmenes es muy similar a lo largo del tiempo y alcanzan el mismo %TGA, a las 48 h, las semillas germinadas usando 7.5 ml mantienen la tendencia central de los datos por arriba de los otros volúmenes (Figura 22). En cuanto al  $TG_{50}$ , fue de  $32.4 \pm 1$  h, para 5 mL,  $33.6 \pm 0.7$  h para 10 ml, no hay diferencias significativas entre ellos, sin embargo, para las semillas imbibidas en 7.5 mL, fue de  $30.7 \pm 0.5$  h, este tiempo es significativamente menor ( $p \leq 0.05$ ) comparado con los otros volúmenes.

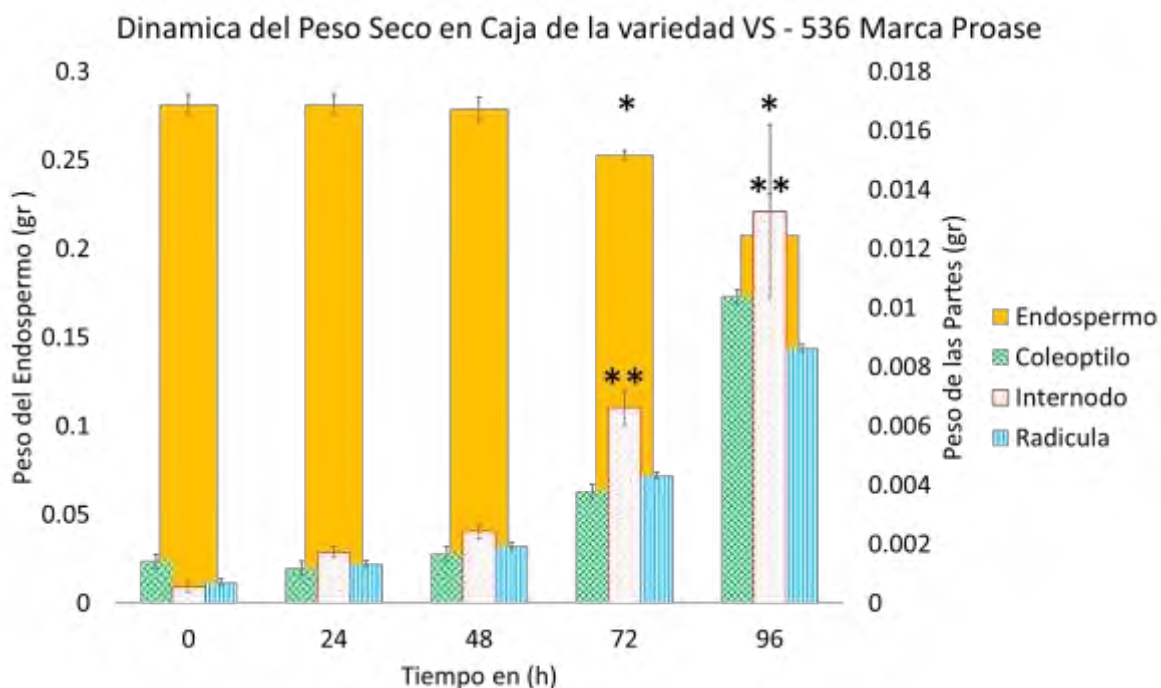
En otras semillas estudiadas en el laboratorio, sí se han encontrado diferencias en el porcentaje final de germinación y se han atribuido a que la capa de agua impide el libre intercambio de gases tales como el oxígeno, el  $CO_2$  y el etileno. Este efecto es más evidente en semillas de menor tamaño, tales como las semillas de *Capsicum chinense* (Hernández-López *et al.*, 2018), *Lens culinaris* y *Helianthus annuus* (Rojo, 2005). En cuanto al  $TG_{50}$ , fue de  $32.4 \pm 1$  h, para 5 mL,  $33.6 \pm 0.7$  h para 10 ml, no hay diferencias significativas entre ellos, sin embargo para las semillas imbibidas en 7.5 mL, fue de  $30.7 \pm 0.5$  h, este tiempo es significativamente menor ( $p \leq 0.05$ ) comparado con los otros volúmenes. A partir de este resultado todos los experimentos posteriores se realizaron a 7.5 ml.



**Figura 22** Gráfica del porcentaje de germinación en caja Petri de semillas PROASE utilizando tres volúmenes conocidos de agua. Letras diferentes muestran diferencias significativas en el porcentaje de germinación entre volúmenes a un tiempo dado  $p < 0.05$ .

#### DINÁMICA DEL PESO SECO EN CAJA.

Se realizó un nuevo experimento de germinación con semillas PROASE, sin lavar usando 7.5 ml como volumen de imbibición, en el sistema reportado por Hernández-López *et al.* (2018), cada 24 h, los embriones de las semillas se disectaron manualmente y se separaron en tres partes, que junto al endospermo (la semilla sin eje embrionario), se desecaron en un horno a 60°C, hasta obtener peso constante, los resultados se muestran en la Figura 23.



**Figura 23** Comparación del peso del endospermo, internodo, coleóptilo y radícula a las 0, 24, 48, 72 y 96 h analizados por ANOVA de una sola vía Tukey como prueba ad hoc para diferencias entre parejas (\*diferencias significativas en el endospermo; \*\* diferencias significativas entre las partes).

Hasta las 24 h, no hay cambios significativos en la biomasa entre las tres partes del embrión ( $p \geq 0.05$ ), a tiempos posteriores y hasta el final de la imbibición, el crecimiento del internodo es significativamente mayor ( $p \leq 0.05$ ) al de la radícula y el coleóptilo. Como se mencionó antes, el internodo, es la zona desde donde se generan las raíces adventicias que forman el sistema de raíces maduras que darán el anclaje definitivo de la plántula al suelo. En la misma gráfica se incluye el cambio de peso del endospermo, en las primeras 48 h no hay cambios de peso significativos del endospermo, sin embargo, a tiempos posteriores. Por otro lado, el peso total del embrión, es significativamente diferente desde las 24 h, con respecto a los embriones secos este incremento se mantiene a lo largo de la germinación.

Las pruebas de calidad son el pilar de cualquier programa de semillas: agrícola, forestal, agroforestal u ornamental. La calidad de las semillas utilizadas debe medirse y describirse,

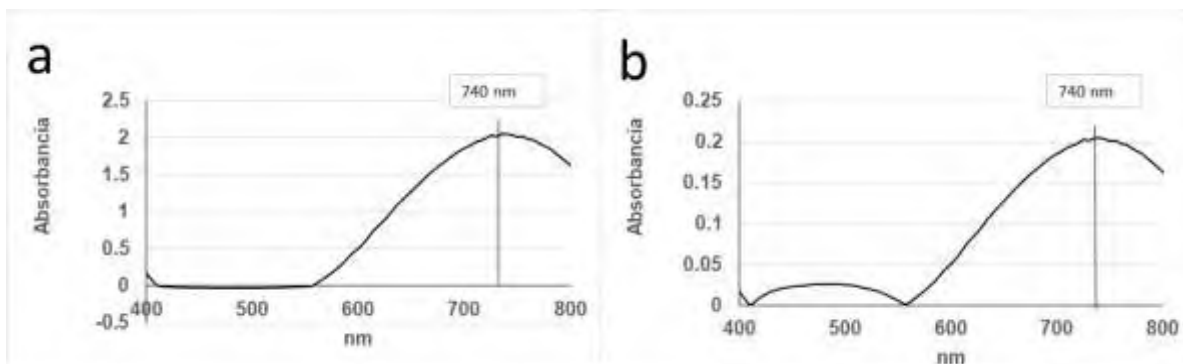
en función de la comparación de parámetros de vigor, que incluyen al porcentaje de germinación, el tiempo medio de germinación, obtenidos de semillas germinadas en condiciones óptimas (Manfrini, 2004). El análisis de vigor de las semillas, incluye la comparación de los  $TG_{50}$  entre tratamientos para determinar su efectividad, en este caso el volumen de 7.5 ml, no favoreció la germinación final, con respecto a los otros niveles de agua, sin embargo, aceleró la germinación de las semillas y favoreció el crecimiento en la zona del internodo lo que probablemente permitirá un buen establecimiento.

## **8.2 ESTABLECIMIENTO DEL MÉTODO DE BENEDICT EN CONDICIONES CUANTITATIVAS.**

Para la determinación de la concentración de azúcares se usó el reactivo de Benedict, el cuál reacciona con los azúcares reductores y genera una coloración rojiza en presencia de calor (ver Figura 7).

El procedimiento original determina la presencia de azúcares reductores de manera cualitativa, por unión del cobre al  $OH^-$  presente en el azúcar, el compuesto resultante se insolubiliza y se precipita como un residuo marrón (Figura 8), por lo que el sulfato de cobre que no reaccionó continúa en el sobrenadante. A partir de esta observación, se propuso que es posible determinar la absorbancia del Cu y en presencia de azúcares reductores se observaría una disminución proporcional a la concentración de éstos.

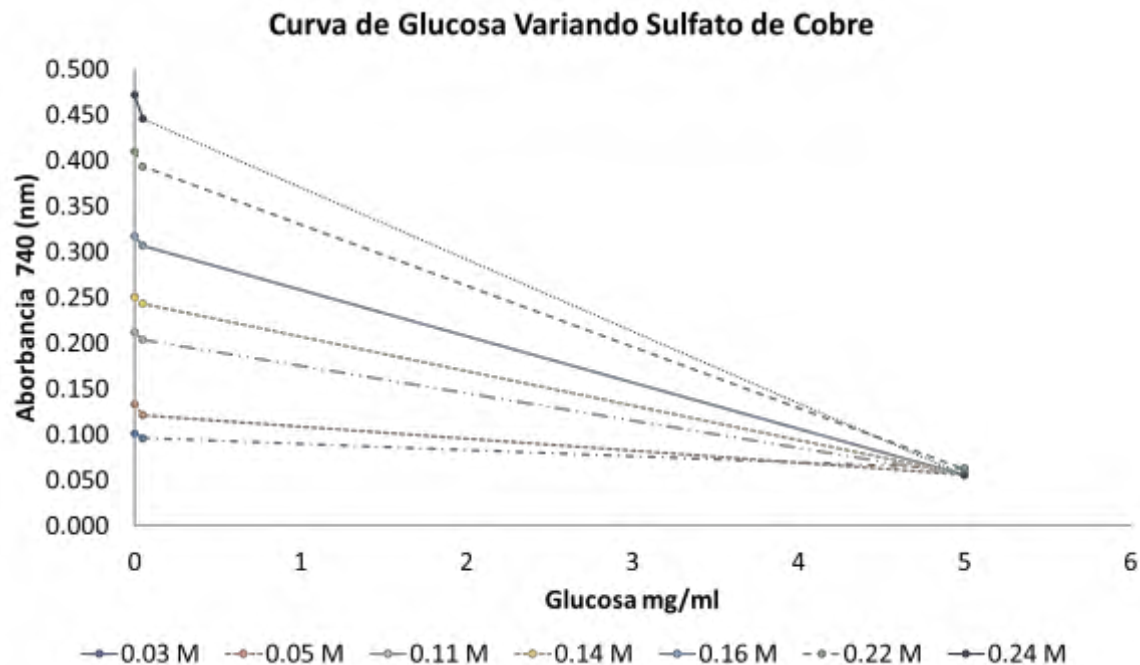
Para determinar el pico de absorbancia del cobre en el reactivo de Benedict se realizó un barrido en el espectro UV-VIS, desde 200 hasta 800 nm, en la (Figura 24) se muestra el efecto de la dilución del reactivo del Benedict, se observa un pico consistente y único en 740 nm.



**Figura 24** Espectro de absorción del reactivo de Benedict. Se muestra absorbancia a 740 nm a) Sin diluir, b) Dilución 1:10

La dilución no mostró más picos de absorbancia, sin embargo, la preparación original de Benedict, tiene valores de absorbancia cercanos a 2, la sola dilución 1 a 100 disminuye 10 veces los valores de absorbancia. Sin embargo, la dilución cambia también las proporciones del resto de los reactivos, Benedict (1908), describe que las cantidades de carbonato en la mezcla garantiza que la solución alcalina de Cu no se deteriore para permitir la detección de pequeñas cantidades de azúcar y al mismo tiempo asegurar la estabilidad de la reacción. Por lo que la dilución probablemente no sea un proceso adecuado.

Por lo cual se propuso variar las concentraciones de sulfato de cobre sin cambiar las del resto de los reactivos. Dado que se desconocía la concentración ideal se consideró que la proporción original de sulfato de cobre se corresponde con 1 y se prepararon diferentes proporciones de Cu de acuerdo a la Tabla 9. Para verificar la sensibilidad de la reacción y su exactitud, así como su rango dinámico, se evaluaron 3 concentraciones de glucosa. Los resultados se muestran en la Figura 25.



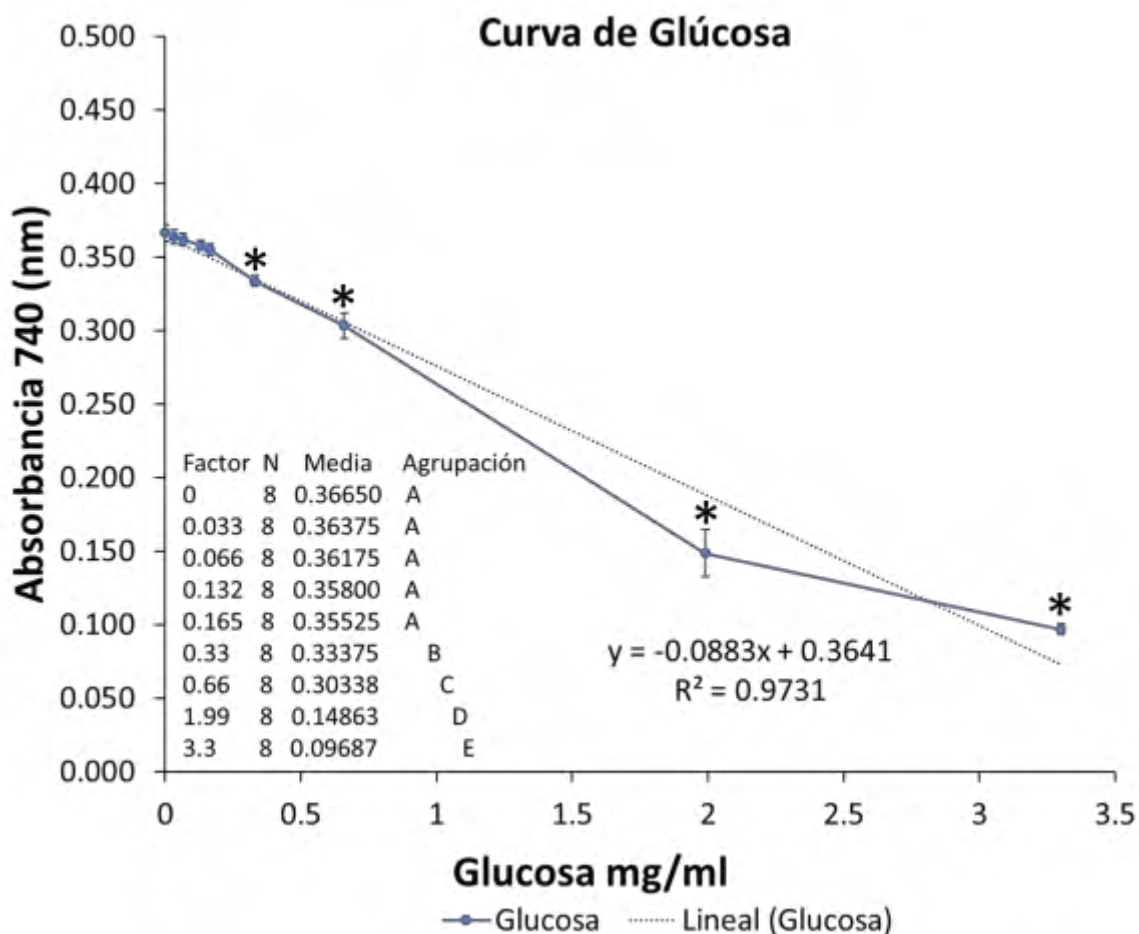
**Figura 25.** Curvas estándar utilizando reactivo de Benedict con distintas concentraciones de sulfato de cobre.

**Tabla 9** Valores del establecimiento del rango dinámico del reactivo de Benedict

	Sulfato de Cobre	$R^2$	Intervalo de trabajo
% p/v	Molaridad (M)		(nm)
0.43%	0.03	0.9875	0.038
0.86%	0.05	0.9807	0.077
1.73%	0.11	0.9985	0.153
2.16%	0.14	0.9994	0.195
2.59%	0.16	0.9993	0.261
3.46%	0.22	0.9988	0.348
3.89%	0.24	0.9976	0.417

Lo que se puede apreciar es que las proporciones de cobre > a 2.16% tienen las mejores pendientes. El intervalo de trabajo lineal es el intervalo entre las concentraciones máximas y mínima del analito para las que se ha demostrado que el método tiene niveles

aceptables de precisión, exactitud y linealidad. Adicionalmente al comparar los valores de  $R^2$  en estas tres proporciones de cobre se observa que el mejor valor es de 0.16M (Tabla 9). Con este valor se realizaron las curvas estándar para los siguientes azúcares reductores glucosa, maltosa, y fructosa; así como para lactosa y sacarosa las concentraciones utilizadas fueron 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1, 3, y 5 mg/ml. La curva estándar de Glucosa se puede ver en la (Figura 26) las demás están disponibles en el apartado de Anexos.



**Figura 26** Curva estándar de glucosa a una concentración de sulfato de cobre de 2.59 % analizado por ANOVA de una sola vía Tukey como prueba ad hoc para diferencias significativas entre parejas (\*) indican diferencias significativas y se muestra el coeficiente de determinación  $R^2$   $p < 0.05$ .

Los valores de  $R^2$  de los azúcares reductores y no reductores se aprecian en la siguiente tabla.

**Tabla 10** Valores de  $R^2$  de curvas estándar de azúcar

	<i>Azúcar</i>				
	<b>Glucosa</b>	<b>Maltosa</b>	<b>Fructosa</b>	<b>Lactosa</b>	<b>Sacarosa</b>
$R^2$	0.9731	0.9855	0.9533	0.9937	0.4161

Se puede observar que los valores de  $R^2$  son por arriba de 0.95 para Glucosa, Maltosa, Fructosa y Lactosa las curvas se ajustan a la recta. Para determinar que la reacción de Benedict es cuantitativa se usó como control negativo la sacarosa, este azúcar no posee un carbono libre para reaccionar, por lo que no se registra lectura con esta técnica presentando una  $R^2$  menor a 0.5. La técnica de Benedict en cuestión de sensibilidad permite identificar concentraciones  $> 0.165$  en adelante por lo que concentraciones inferiores a estos valores no se detectan.

### **8.2.1 COMPARACIÓN CONTRA ACIDO DINITROSALICILICO (DNS).**

La curva de calibración de la glucosa se comparó con otra curva de calibración utilizando otro método de determinación de azúcares el método del ácido dinitrosalicílico (DNS).

El método de DNS es también un método colorimétrico, en ambos, se determina la presencia de azúcares libres mediante espectrofotometría. DNS lo hace en una longitud de onda de 595 nm, mientras que la reacción de Benedict y en especial en esta estandarización lo hace a 740 nm. Las gráficas de las curvas patrón se muestran en el apartado de Anexos.

Estos métodos difieren en el mecanismo de reacción, aunque los dos aprovechan el potencial reductor de los carbohidratos del carbono anomérico. La reacción de DNS mide directamente la concentración de azúcares reductores al reaccionar con el 3,5-

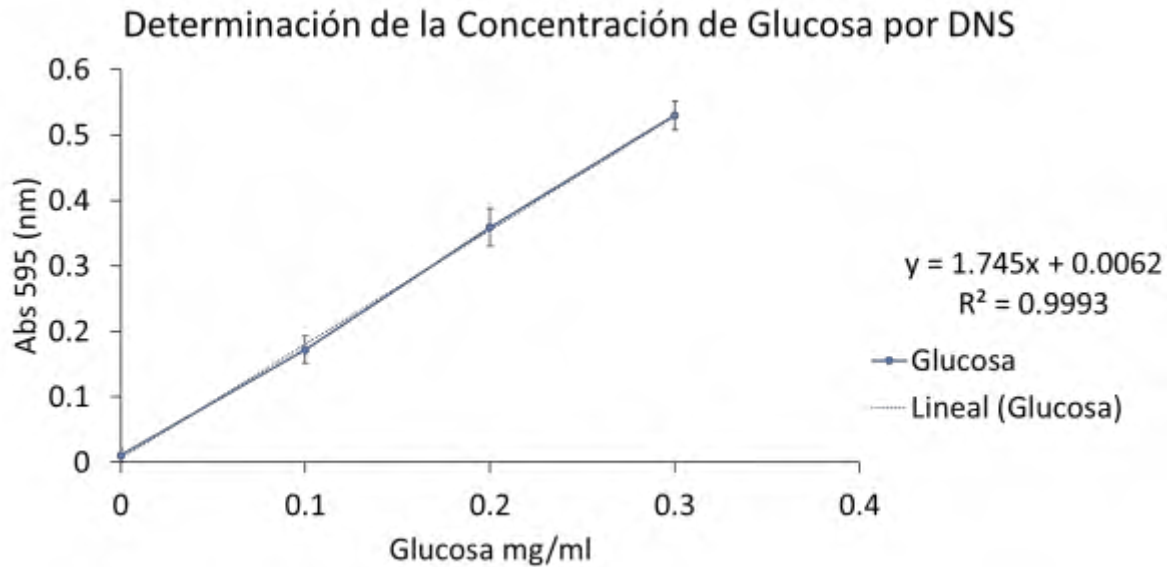
dinitrosalicílico en presencia de calor; mientras que el método de Benedict propuesto (cuantitativo) lo hace indirectamente debido a que registra la disminución de la concentración de sulfato de cobre disuelto al aumentar la concentración del óxido de cobre precipitado debido a la reducción por la presencia de los grupos aldehído libres de los azúcares reductores. Para Benedict la concentración mínima detectada fue de 0.165 mg/ml, pero solo muestra diferencias significativas hasta 0.33 mg/ml. Por otro lado, la técnica de DNS la concentración mínima detectada fue de 0.2 mg/ml, y bibliográficamente la sensibilidad del para esta metodología es de 0.1 mg/ml. Por lo que la sensibilidad del DNS es mayor que nuestra técnica propuesta.

Los atributos por destacar de la técnica de Benedict cuantitativa propuesta para este trabajo es la versatilidad de concentraciones que se pueden analizar. Adicionalmente la interferencia por color de los extractos se puede despreciar al saturar las soluciones con glucosa.

En el caso de las muestras que nos propone analizar en este trabajo las diferencias podrían ser muy amplias desde el estado de germinación hasta la plántula, por lo que sacrificando un poco la sensibilidad podemos tener un mayor rango de concentraciones de carbohidratos analizables.

Como se mencionó antes los costos para el ensayo de Benedict propuesto son más bajos que los reactivos empleados por el método de DNS (se muestra análisis de los costos por reacción).

Las curvas de calibración tienen una  $R^2$  de 0.998 para Benedict y 0.999 para DNS (Figura 27) por lo que el método de Benedict cuantitativo propuesto en este trabajo explica a la mayoría de los puntos analizados.



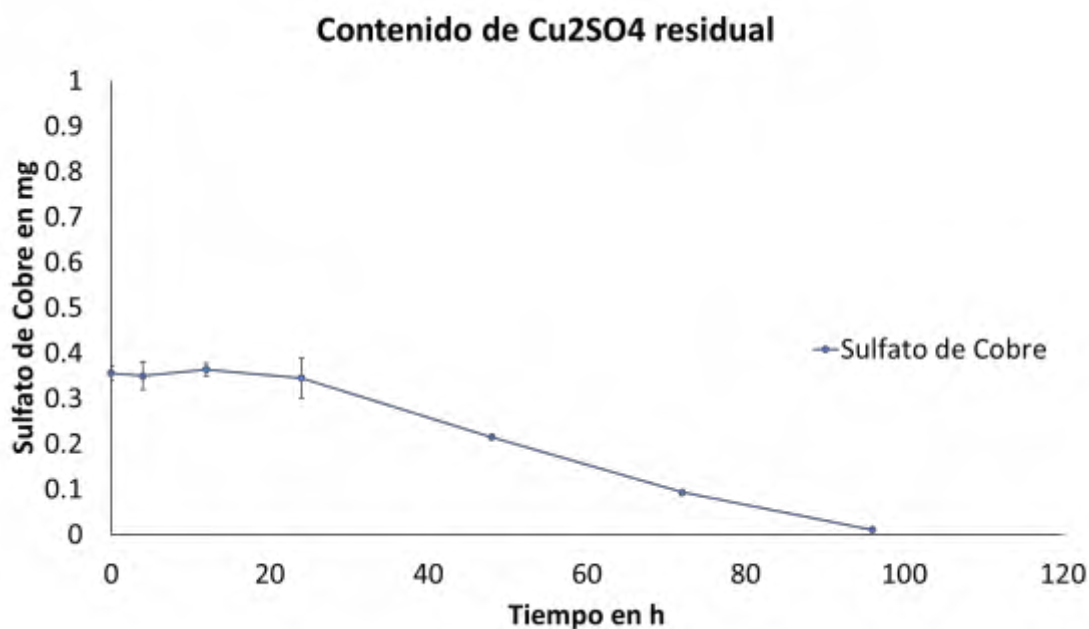
**Figura 27** Curva patrón de glucosa por el método de DNS en el rango de concentración de 0 a 0.4 mg/ml.

### 8.3 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES DURANTE LA GERMINACIÓN.

A lo largo de la curva de crecimiento se tomaron muestras de embriones a las 0, 4, 12, 24, 48, 72 y 96 h y para su posterior molienda con el fin de extraer los azúcares reductores libres. La extracción se realizó como se describe en la metodología. Mientras que la cuantificación se realizó mediante la técnica de Benedict modificada para ser cuantitativa.

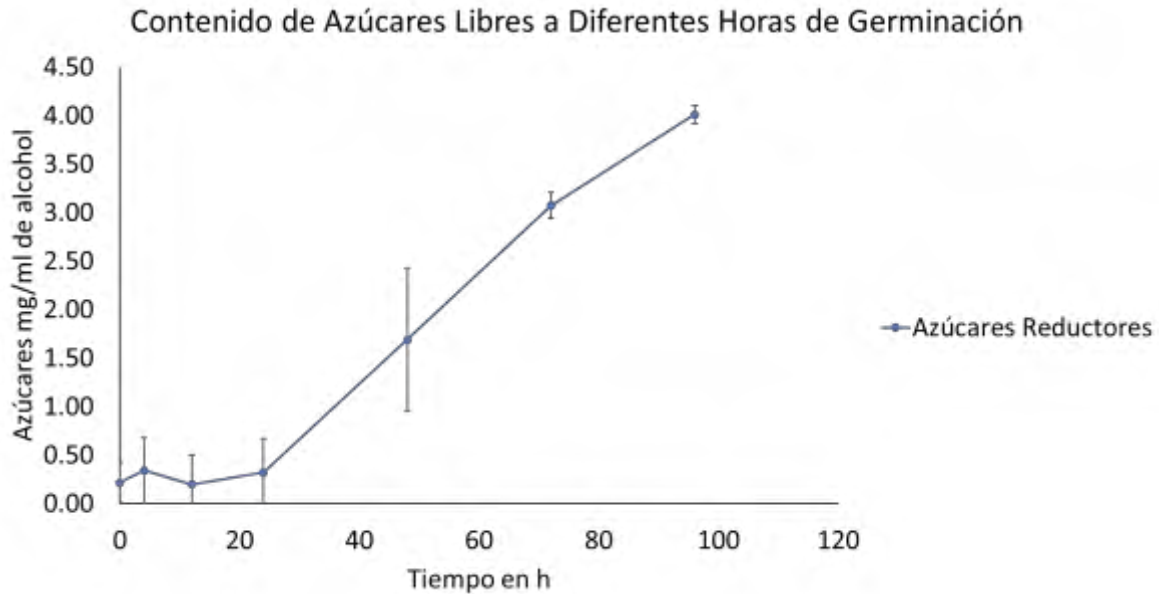
En la gráfica del contenido de cobre residual (Figura. 28) se muestra una disminución de la absorbancia del sulfato de cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) a 470 nm. El comportamiento esperado, es que al aumentar la concentración de azúcares reductores libres se disminuiría la absorbancia debido a que el cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) al reaccionar con los azúcares en medio alcalino cambia su estado de oxidación a  $\text{Cu}^+$  el cual es insoluble. Esta disminución del cobre soluble es proporcional a la concentración de azúcares en la muestra. En la gráfica se observa que no fue posible detectar cambios el contenido de azúcares en los embriones antes de las 24 h, entre 24 y 36 h el contenido de azúcares en el embrión se incrementó y se observa una

disminución significativa del Cu soluble, dicha disminución se conserva durante el resto de los tiempo estudiados. Se realizaron curvas de tolerancia al sulfato de cobre para determinar el rango dinámico con respecto de las concentraciones que nos interesaba cuantificar y que por referencia (Sánchez Linares *et al.*, 2012) se encontraron entre 0.3-3.0 mg/ml. Considerando lo anterior, podemos inferir que las concentraciones de glucosa menores a 0.165 mg/ml no serán cuantificadas por nuestro método. Sin embargo, las concentraciones superiores si.



**Figura 28** Contenido de Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> residual tras la reacción de determinación de carbohidratos en embriones de maíz a diferentes horas de germinación.

La Figura 31 se muestra el contenido de azúcares reductores libres (con referencia a la curva estándar de glucosa) en ejes embrionarios de maíz durante la germinación.



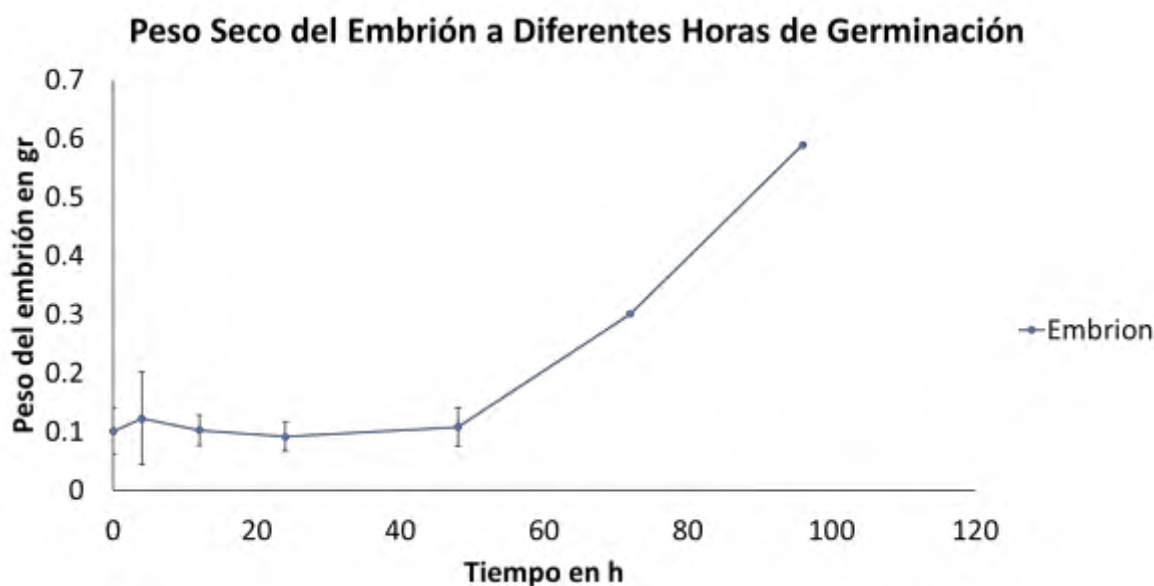
**Figura 29** Gráfica que representa el contenido de azúcares libres con respecto a los ml de alcohol a diferentes horas de germinación y etapas post-germinativas.

En la figura 29 se observa que el volumen de alcohol usado con la técnica de extracción de azúcares estandarizado es suficiente para extraer los azúcares presentes en el embrión de maíz a diferentes horas de germinación y etapas post-germinativas. Hay un aumento en el contenido de azúcares y es referente claro de la movilización carbohidratos a lo largo del embrión apreciable a etapas post-germinativas 48, 72 y 96 h y en comparación de las primeras etapas (germinación). Durante las primeras 24 horas de imbibición de las semillas, la concentración de azúcares reductores permanece muy baja ( $< 0.3$  mg/ml) y el sulfato de cobre presenten en la solución permanece elevada Sánchez-Linares *et al.*, (2012) reporta mediante pruebas enzimáticas, 0.047 mg de glucosa libre/eje embrionario a las 24 h.

Probablemente, debido a que su contenido basal es muy pequeño, sin embargo, a partir de las 48, 72 y 96 h de imbibición, etapas consideradas como postgerminativas, el contenido de azúcares libres comenzó a aumentar y por lo tanto la concentración de sulfato de cobre residual disminuyó por efecto de reaccionar con la presencia de azúcares reductores, lo que es un indicativo de la actividad metabólica que está experimentando el

embrión en los procesos de elongación y división celular durante su diferenciación a plántula. Esta información ha sido reportada por otros investigadores como Avila-Alejandre *et al.* (2013) y Sánchez Linares *et al.*, (2012).

También se evaluó el peso seco del embrión con respecto a las distintas horas de incubación de las semillas que abarcan tanto etapa germinativa como la etapa post-germinativa. La gráfica se observa en la Figura 29.



**Figura 29** Gráfica del peso del embrión a diferentes horas de germinación y etapas post-germinativas.

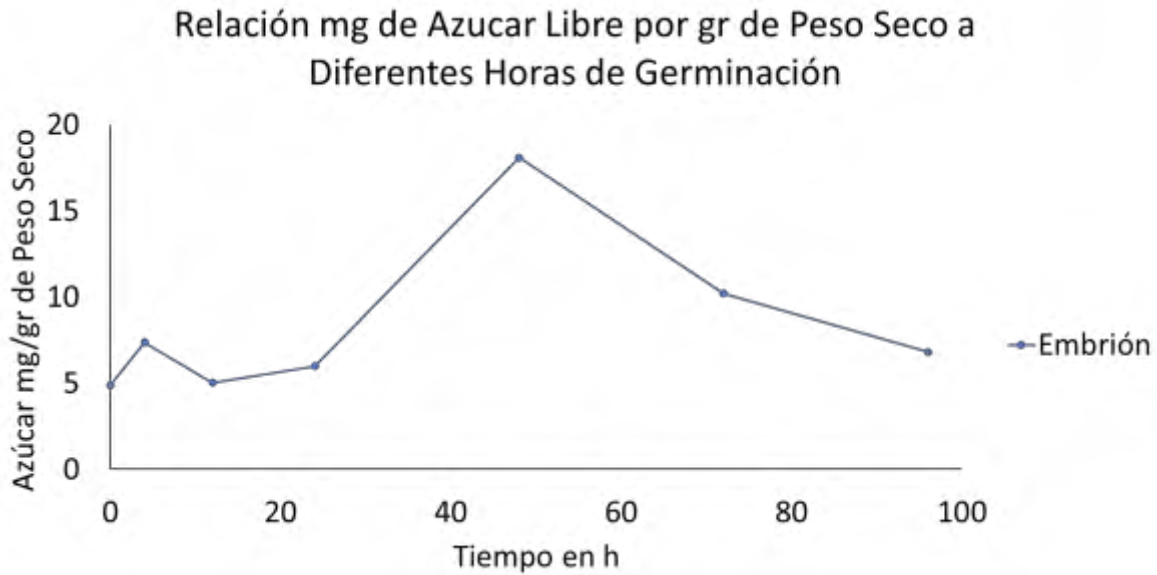
De la Figura 29 podemos observar que, durante las primeras horas de incubación (0, 4, 12, 24 y 48 h), no se apreció un aumento en el peso seco del embrión, este es evidente hasta las 72 y 96 h. Tomando juntas los resultados de las figuras 28 y 29 podemos observar que el incremento en los azúcares reductores disponibles, es previo al incremento de peso en el embrión y que se inicia entre 24 y 48 h. por lo que se infiere que aunque existen reservas de carbohidratos reductores en el embrión de maíz, presentes desde el inicio de la actividad metabólica primaria (0-24 h) y que probablemente se incorporan al embrión como fuente de energía, no existe un efecto de estos carbohidratos en los procesos de

división celular que permitan el crecimiento y diferenciación del embrión a plántula y posteriormente a planta completa.

Lo anterior no significa que su actividad durante las etapas germinativas no sea importante. En la Figura 23, se observa que el endospermo disminuye su peso entre 48 y 74 h, por lo que el endospermo proporciona azúcares a tiempos posteriores a aquellos donde se observó el incremento en el embrión, lo que sugiere que no es la fuente única de carbohidratos libres, en este sentido Sánchez linares *et al.*, (2012) propuso que la presencia, de azúcares reductores libres en el embrión durante las primeras etapas podría provenir del escutelo del embrión, aunque no pueden ser muy grandes. Esto sugiere, al menos como un primer acercamiento, que al comienzo de la etapa de metabolismo primario de la germinación el eje embrionario tiene disponibles azúcares reductores no provenientes del almidón del endospermo.

Al relacionar los resultados del peso seco de los embriones con la concentración de azúcares libres se puede encontrar la dinámica de azúcares reductores libres con respecto al tiempo.

Estos resultados se pueden observar en la Figura 30 donde se observa que durante las primeras 24 h no hay un incremento apreciable de los carbohidratos reductores libres. Posteriormente se observa que un pico de concentración máxima a las 48 h; pero a partir de ese momento la concentración comienza a disminuir nuevamente hasta el final del tiempo evaluado.



**Figura 30** Gráfica de la relación de la cantidad de azúcares con respecto al peso seco presente a diferentes horas de germinación y etapas post-germinativas.

La Figura 30 permite observar que existe una relación entre la liberación de la reserva de nutrientes y el crecimiento del embrión. Los carbohidratos son empleados por las plantas como reserva de poder reductor y como sillares de moléculas complejas tanto de reserva energética como de las estructuras de la planta. Sin embargo, lo que se observa en la gráfica es que el aumento en la concentración de carbohidratos libres normalizados a 1 mg de peso seco no es infinito, sino que llega hasta un punto máximo alrededor de las 48 h y comienza a descender.

Este fenómeno podría explicarse considerando que debe existir un límite para la concentración de azúcares reductores libres en la vía apoplástica y que una vez superado este umbral se inicia una traslocación masiva de carbohidratos por la vía simplástica lo que explicaría el aumento en la división celular.

Se podría hipotetizar entonces que existe un mecanismo de censado y regulación de la concentración de azúcares reductores. Hay que considerar que tanto el crecimiento por división celular como el crecimiento por elongación de las células del embrión requieren de una gran administración de energía. Esta dinámica de concentración de azúcares

reductores puede explicar varios procesos, aunque actualmente no existen otros trabajos en que basarse para sustentar definitivamente esta hipótesis. Sin embargo, se propone más adelante alguien que pueda demostrarlo.

## **9 CONCLUSIONES.**

El tiempo de almacenamiento y el manejo comercial afectan el porcentaje de germinación mínimo establecido por el proveedor (85%), de la variedad de maíz VS-536 de las marcas PROASE y TERRA comercializadas en la ciudad de Tuxtepec.

No se recomienda lavado previo con agua corriente y jabón a las semillas de estas variedades ya que disminuyen significativamente su porcentaje de germinación. Sin embargo, las semillas de maíz de la variedad VS-536 tienen un  $TG_{50}$  menor que la reportada del maíz criollo y su tiempo de latencia es menor a 24 h, por lo que, en general, el vigor es aceptable.

Se propone el uso de 7.5 ml como un volumen óptimo de hidratación, para estudios fisiológicos en el maíz VS536 ya que aunque el volumen del agua del rango de 5, 7.5 y 10 ml no afecta de manera significativa la germinación final, 7.5ml acelera el  $TG_{50}$  y acorta la latencia.

Con respecto a la técnica de Benedict modificada cuantitativamente, se determinó que la concentración ideal de sulfato de cobre es de 2.59% peso. Con una dilución 1:10 adecuada para poder correlacionar la cantidad de azúcares reductores en las semillas de la Marca PROASE de la variedad VS-536. La sensibilidad de 0.133 mg/ml el rango de detección de azúcares tiene buenos parámetros de linealidad y ajuste, por lo que se propone como una opción accesible para realizar la cuantificación de azúcares reductores.

Con la técnica de Benedict cuantitativo propuesta en este trabajo, se determinó la presencia de azúcares libres en el embrión en etapas tempranas de germinación aunque la concentración es muy baja (< 0.3 mg/ml/gr PS), por lo que se sugiere que no provienen del endospermo, posteriormente, se detectaron concentraciones crecientes de azúcares

provenientes de la parte del endospermo de la semilla, la cual disminuye su masa durante la germinación, posiblemente debido a una movilización de carbohidratos para que la planta se desarrolle.

El aumento en el contenido de azúcares reductores es referente claro de la movilización de carbohidratos a lo largo del embrión apreciable a etapas post-germinativas.

## 10. BIBLIOGRAFÍA.

1. Aguirre, M., Kiegle, E., Leo, G. y Ezquer I. (2018). Carbohydrates reserves and seed development: an overview. *Plant reproduction*, 31(3), 263-290. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00497-018-0336-3>.
2. Avila-Alejandre, A., Espejel, F., Paz-Lemus, E., Cortés-Barberena, E., Díaz de León-Sánchez, F., Dinkova, T., . . . Pérez-Flores, L. (2013). Effect of insulin on the cell cycle of germinating maize seeds (*Zea mays* L.). *Seed Science Research*, 23(1), 3-14. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0960258512000281>.
3. Antony E, Taybi T, Courbot M, Mugford ST, Smith JA, Borland AM. (2008). Cloning, localization and expression analysis of vacuolar sugar transporters in the CAM plant *Ananas comosus* (pineapple). *Journal of Experimental Botanic*, 59(7), 1895-908. DOI: <https://doi.org/10.1093/JXB/ERN077>.
4. Antipova, O., V., Bartova, L., M., Kalashnikova, T.S., Obroucheva, N., Voblikova, V. D. y Muromtsev, G. S. (2003). Fusicoccin-induced cell elongation and endogenous fusicoccin-like ligands in germinating seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41(2), 57-164. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0981-9428\(02\)00020-7](https://doi.org/10.1016/s0981-9428(02)00020-7).
5. Artola, A., Carrillo, G., y De los Santos, G. (2010). Hydropriming: a strategy to increase *Lotus corniculatus* L. Seed vigor. *Seed Science and Technology*, 31(2), 455-463. DOI: <https://doi.org/10.15258/sst.2003.31.2.22>.
6. Aoki, N., Akashi, T. y Ayabe, S. (1999). Cloning and functional expression of a cytochrome p450 cDNA encoding 2-hydroxyisoflavanone synthase involved in

- biosynthesis of the isoflavonoid skeleton in licorice. *Plant Physiology*, 121(3), 821-828. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.121.3.821>.
7. Aoki, N., Whitfeld, P., Hoeren, F., Scofield, G., Newell, K., Patrick, J., Offler, C., Clarke, B., Rahman, S., Furbank, R.T. (2002). Three sucrose transporter genes are expressed in the developing grain of hexaploid wheat. *Plant Molecular Biology*, 50(3), 453-462. DOI: <https://doi.org/10.1023/a:1019846832163>.
  8. Aoki, Y., Saint, N., Gyda, M., Magner, E., Lee, Y.H., Credidio, C. y Saint, J.P. (2003). Sox10 regulates the development of neural crest-derive melanocytes in *Xenopus*. *Developmental Biology*, 259(1), 19-33. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0012-1606\(03\)00161-1](https://doi.org/10.1016/s0012-1606(03)00161-1).
  9. Aoki, N., Scofield, G.N., Wang, X.D., Offler, C. E., Patrick, J. W. y Furbank, R. T. (2006). Pathway of sugar transport in germinating wheat seeds. *Plant Physiol*, 141(4), 1255-1263. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.106.082719>.
  10. Baguma, Y., Sun, C., Ahlandsberg, S., Mustiya J., Palmqvist S., Rubaihayo, P., Magambo, M., Jansson, C. (2003). Expresión patterns of the gene encoding starch branching enzyme II in the storage roots of cassava (*Manihot esculenta* crantz). *Plant Science*, 164(5), 833-839. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00072-4](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00072-4).
  11. Braun, D., M. y Slewinski, T.,L. (2009). Genetic control of carbon partitioning in grasses: roles of sucrose transporters and tie-dyed loci in phloem loading. *Plant Physiology*, 149(1), 71-88. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.108.129049>.
  12. Bove, J., Jullien, M., y Grappin, P. 2002. Functional genomics in the study of seed germination. *Genome Biology*, 3(1), 1002.1-1002.5. DOI: <https://doi.org/10.1186/gb-2001-3-1-reviews1002>.
  13. Boubriak I, Pouschuk V, Grodzinsky A, Osborne DJ. 2007. Telomeres and seed banks. *Tsitologija i Genetika*, 41(1), 23–29. DOI: <https://doi.org/10.3103/S0095452707010045>.

14. Cael, S.J., Koenig, J.L. y Blacwell J. (1975). Infrared and raman spectroscopy of carbohydrates. Part IV: normal coordinate analysis of v-amylose. *Biopolymers*, 14(9), 1885-1903 DOI: <https://doi.org/10.1002/bip.1975.360140909>.
15. Casu, R.E., Grof, C.P.L., Rae, A. y Manners, J.M. (2003). Identification of a novel sugar transporter homologue strongly expressed in maturing stem vascular tissues of sugarcane by expressed sequence tag and microarray analysis. *Plant Molecular Biology*, 52(2), 371-86. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1023957214644>.
16. Carpaneto, A., Geiger, D., Bamberg, E., Sauer, N., Fromm, J. y Hedrich, R. (2005). Phloem-localized, proton-coupled sucrose carrier ZmSUT1 mediates sucrose efflux under the control of the sucrose gradient and the proton motive force. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(22), 21437-21443. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M501785200>.
17. Cheng, C., Tsai, H.R. y Chang, K.C. (2006). On-line cut-off technique and organic modifier addition aided signal enhancement for trace analysis of carbohydrates in cellulase hydrolysate by ion exclusion chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal chromatography*, 1119(2), 188-196. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.11.115>.
18. CIBIOGEM 2018. Maiz. tomado de consensus document on the biology of Zea Mays subsp. mays (Maize). (Última consulta 21/06/21) Recuperado de: <https://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/index.php/maiz>
19. Cosgrove, D.J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(2), 850-861. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrm1746>.
20. Cruz Cristancho, L. M. y Soler Monroy, R. A. (2014) Manual de métodos generales para la determinación de carbohidratos. Universidad pedagógica y tecnológica de Colombia.

21. Dekkers, B.J.W. y Smeekens, S.C.M. (2007). Sugar and abscisic acid regulation of germination and transition to seedling growth. *Annual Plant Review*, 27(2), 305-327. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0286>.
22. Dey, Y. Ghosha Y. (2010). Phytochemical investigation and chromatographic evaluation of the different extracts of tuber of *amorphaphallus paeoniifol* (araceae). *International Journal of Pharmaceutical and Biological Research*, 1(5), 153. DOI: <https://doi.org/10.4103/0974-8520.100303>.
23. Doll N.M., Depege-Fargeix N., Rogowsky P.M., and Widiez T. (2017). Signaling in early maize kernel development. *Mol. Plant*, 10(1), 375–388. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.01.008>.
24. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. y Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>.
25. Eastmond, P.J. (2006). Sugar-Dependent1 encodes a patatin domain triacylglycerol lipase that initiates storage oil breakdown in germinating *Arabidopsis* seeds. *The Plant Cell*, 18(1), 665-675. DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.105.040543>.
26. Eschrich, W. (1975). Das experiment transport phloem. *Biologie in Unserer Zeit*, 5(1), 26-30. DOI: <https://doi.org/10.1002/biuz.19750050105>.
27. Garruña, H. R., Monforte, G.M., Canto A.A., Vásquez, F.F. y Orellana, R. (2013). Enrichment of carbon dioxide in the atmosphere increases the capsaicinoids content in Habanero peppers (*Capsicum chinense* Jacq.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(6), 1385-1388. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.5904>.
28. García, F.C., Aguilar, R., Reyes-de la Cruz, H., Albores, M. y Sánchez de Jiménez, E. (2001). A maize insulin-like growth factor signals to a transduction pathway that regulates protein synthesis in maize. *Biochemical Journal*, 358(1), 95-100. DOI: <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3580095>.

29. González-Zertuche, L. y Orozco-Segovia, A. (1996). Métodos de análisis de datos en la germinación, un ejemplo: *Manfreda brachystachya*. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 58(1), 15-30. DOI: <https://doi.org/10.17129/botsoci.1484>.
30. Gutiérrez, L., Wuytswinkel, O.V., Castelain, M. y Bellini, C. (2007). Combined networks regulating seed maturation. *Trends in plant science*, 12(7), 294-300. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.06.003>.
31. Hager, A. (2003). Role of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects. *Journal of Plant Research*, 116(6), 483-505. DOI: <https://doi.org/10.3732/ajb.1400285>.
32. Hernández-López, A., Beltrán-Peña, E.G., Amancio-Olivera, A.E., Nuñez-Gaona, O. y Avila-Alejandro A.X. (2018). Water preconditioning on germination and emergence of *Capsicum chinense* Jacq. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(8), 1704-17014. DOI: <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i8.1030>.
33. Herrera Zambrano, A. C. (2011). Estudio comparativo de métodos para la determinación de sacarosa y azúcares reductores en miel virgen de caña utilizados en el Ingenio Pichiche S.A. Pereira. [Tesis para optar grado]. Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira, Colombia.
34. Heidari, H. (2012). Effect of irrigation by contaminated water with cloth detergent on plant growth and seed germination traits of maize (*Zea mays*). *Life Science Journal*, 9(4), 1587-1590.
35. Hirose, T., Imaizumi, N., Scofield, G.N., Furbank, R.T. y Ohsugi, R. (1997). cDNA cloning and tissue specific expression of gene for sucrose transporter from rice (*Oryza sativa*) L. *Plant and Cell Physiology*, 38(12), 1389-1396. DOI: <http://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029134>.

36. Holdsworth, M.J., Bentsink, L. y Soppe, W.W.J. (2008). Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytol*, 179(1), 33-54. DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02437.x>.
37. Hynek, R., Svensson, B., Jensen, O.N., Barkholt, V. y Finnie C. (2009). The plasma membrane proteome of germinating barley embryos. *Proteomics*, 9(14), 3787-3789. DOI: <http://doi.org/10.1002/pmic.200800745>.
38. The International Seed Testing Association (ISTA). (2016). International Rules for Seed testing. (ISTA). DOI: <http://doi.org/10.15258/istarules.2016>.
39. Jobling S. (2004). Improving Starch for food and industrial applications. *Current Opinion in Plant Biol*, 7(2), 210-218. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2003.12.001>.
40. Kleber, N. R., Albrechtová, J.T.P., Fleig, S., Huck, N., Michalke, W., Wagner, E., Speth, V., Neuhaus, G., Fischer, I.C. (2003). Plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase is involved in auxin mediated cell elongation during wheat embryo development. *Plant Physiology*, 131(1). 302-312. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.013466>.
41. Krishnan P, Joshi DK, Nagarajan S, Moharir AV. (2004). Characterization of germinating and non-viable soybean seeds by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. *Seed Science Research*, 14 (1), 355–362. DOI: <http://doi.org/10.79/SSR2004189>.
42. Kühn, C. (2003). A comparison of the sucrose transporter systems of different plant species. *Plant Biology*, 5(3), 215-232. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-2003-40798>.
43. Kühn, C. y Grof, C. P.L. (2010). Sucrose transporters of higher plants. *Plant Biology*, 13(3), 287-297. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)62135-X](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62135-X).
44. Kutschera, U. (2004). The Biophysical bases of cell elongation and organ maturation in coleoptiles of rye seedlings: implications for shoot development. *Plant Biology*, 6(2), 158-164. DOI: <http://doi.org/10.1055/s-2004-815734>.

45. Lafon-Placette, C. y Köhle, C. (2014). Embryo and endosperm, partners in seed development. *Plant Biology*, 17(1), 64-69. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.11.008>.
46. Lalonde, S., Boles, E., Hellmann, H., Barker, L., Patrick, J.W., Frommer, W.B. y Ward J.M. (1999). The dual function of sugar carriers: transport and sugar sensing. *Plant Cell*, 11(4), 707-726. DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.11.4.707>.
47. Lalonde, S., Tegeder, M., Throne, H.M., Frommer W.B y Patrick, J.W. (2003). Phloem loading and unloading of sugar and amino acids. *Plant Cell and environment*, 26(1), 37-56. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2003.00847.x>.
48. Lalonde, S., Wipf, D. y Frommer W.B. (2004). Transport mechanism for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. *Annual Review of Plant Biology*, 55(1), 341-372. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141758>.
49. Lehninger, A., L., Nelson, D.L. & Cox, M., M. (1993). *Principles of biochemistry*. 2a ed. Worth, New York. U.S.A.
50. Lee, S.C. y Prosky, L. (1995). International survey on dietary fiber: definition, analysis and reference materials. *Journal of AOAC international*, 78(1), 22-36. DOI: <http://doi.org/10.1093/JAOAC/78.1.22>.
51. Lemoine R. (2000). Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochimical et Biofysica Acta*, 1465(1), 113-125. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00142-5](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00142-5).
52. Leopold, N., Leopold, L.F., Diehl, H.A. y Socaciu, C. (2011). Quantification of carbohydrates in fruit juices using FTIR spectroscopy and multivariate analysis. *Spectroscopy*, 26(1), 93-104. DOI: <https://doi.org/10.3233/SPE-2011-0529>.

53. Levites, E. V., y Kirikovich, S. S. (2013). Effect of Triton X-100 on the Viability and Morpho-physiological traits in sugarbeet. *Sugar Tech*, 16(4), 442–445. DOI: <http://doi:10.1007/s12355-013-0289-7>.
54. Lin, C.S., Liu, N.T. y Liao, D.C. (2008). Differential protein expression of two photosystem II subunits, PsbO and PsbP in an albino mutant of *Bambusa edulis* mutants, ab 1 and ab 2. *Plant Cell*. 88(1). 147-156. DOI: <https://doi.org/10.21273/JASHS.133.2.270>.
55. Liu, S.Y. y Lin, C.Y. (2009). development and perspective of promising energy plants for bioetanol production in Taiwan. *Renewable Energy*, 34(8), 1902-1907. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2008.12.018>.
56. Logan, D.C., Millar, A.H., Sweetlove, L.J., Hill, S.A. y Leaver, C.J. (2001). Mitochondrial biogénesis during germination in maize embryos. *Plant Physiology*, 125(2), 662-672. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.125.2.662>.
57. McDonald, R., Fieuw, S. y Patrick, J.W. (1997). Sugar uptake by the dermal transfer cells of developing cotyledons of *Vicia faba* L. Experimental systems and general transport properties. *Planta*, 198(1), 54-63. DOI: <http://doi.org/10.1007/BF00262635>.
58. MacNeill G.J., Mehrpouyan, S., Minow M.A.A., Patterson, J.A., Tetlow, I.J., Emes, M.J. (2017). Starch as a source, starch as a sink: the bifunctional role of starch in carbon allocation. *Journal Experimental Botany*, 68(16), 4433-4453. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/erx291>.
59. Manfrini, D. (2004). Aspectos a tener en cuenta, análisis del vigor de semillas. *Revista del plan agropecuario*, 2(1), 56-58.
60. Miller, G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>.

61. Murray, K., R.; Bender, A.,D.; Botham, K.,M.;Kenelly, P., J.; Rodwell, V.,W., Weil, P.,A. 2010. *Harper Bioquímica ilustrada. Ed.28*. Mcgraw-Hill, Barcelona, España.
62. Nonogaki, H. (2010). MicroRNA gene regulation cascades during early stages of plant development. *Plant and cell Physiology*, 51(11), 1840-1846. DOI: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcq154>.
63. Nonogaki, H. (2018). Seed germination and dormancy - the classic story, new puzzles, and evolution. *Journal of Integrative Plant Biology*. DOI: <https://doi.org/10.1111/jipb.12762>.
64. Paliwal, R. L.; Granados, G.Lafitte, H. R. Violic, A. D. y Marathée J. P. (Eds.). (2001). El maíz en los trópicos. Mejoramiento y producción. Colección FAO: producción y protección vegetal 28. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Roma. 13-19. <https://curlacavunah.files.wordpress.com/2010/04/el-maiz-en-los-tropicos.pdf>.
65. Padilla, C.D. y Martínez, B.E. (2007). Factores involucrados en la distribución de azúcares en las plantas vasculares: comunicación entre los tejidos fuente y tejidos demanda. *Revista de Educación Bioquímica*, 26(3), 99-105.
66. Pritchard, S.L., Charlton, W.L., Baker, A. y Graham, I.A. (2002). Germination and storage reserve mobilization are regulated independently in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 31(5), 639-647. DOI: <http://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2002.01376.x>.
67. Oge, L., Bourdais, G., Bove, J., Collet, B., Godin, B., Granier, F., Boutin, J.P., Job, D., Jullien, M., Grappin, P. (2008). Protein repair-lisoaspartyl methyltransferase1 is involved in both seed longevity and germination vigor in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 20 (1). 3022–3037.
68. Öner-Sieben, S., Rappl, C., Sauer, N., Stadler, R. y Lohaus, G. (2015). Characterization, localization, and seasonal changes of the sucrose transporter FeSUT1 in the phloem of

- Fraxinus excelsior. *Journal Experimental Botany*, 66(15), 4807–4819. DOI: <http://doi.org/10.1093/jxb/erv255>.
69. Rae, L. A., Perroux, J.M. y Grof P.L.C. (2005). Sucrose partitioning between vascular bundles and storage parenchyma in the sugarcane stem: a potential role for the ShSUT1 sucrose transporter. *Planta*, 220(6), 817-825. DOI: <http://doi.org/10.1007/s00425-004-1399-y>.
70. Reinders, A., Sivitz, A.B., Hsi, A., Grof, C.P., Perroux, J.M. y Ward, J.M. (2006). Sugarcane ShSUT1: analysis of sucrose transport activity and inhibition by sucralose. *Plant Cell Environ*, 29(10), 1871-80. DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01563.x>.
71. Riesmeier, J.W., Willmitzer, L. y Frommer W.B. (1992). Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *EMBO Journal*, 11(13), 4705-4713.
72. Riesmeier, J.W., Hirner, B. y Frommer, W.B. (1993). Potato sucrose transporter expression in minor veins indicates a role in phloem loading. *Plant Cell*, 5(11), 1591-1598. DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.5.11.1591>.
73. Roberts, J. y Srivastava L.M. (2003). Plant growth and development hormones and the environment. *Annals of Botany*, 92(6), 846. DOI: <http://doi.org/10.1093/aob/mcg209>.
74. Villa-Hernández, J. M., Dinkova, T. D., Aguilar-Caballero, R., Rivera-Cabrera, F., Sánchez de Jiménez, E., & Pérez-Flores, L. J. (2013). Regulation of ribosome biogenesis in maize embryonic axes during germination. *Biochimie*, 95(10), 1871–1879. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.06.011>.
75. Salisbury, F. B.; Ross, C.,W. (1992). *Fisiología vegetal*. Grupos Editorial Iberoamerica.
76. Sánchez-Linares, L., Gavilanes-Ruíz, M., Díaz-Pontones, D., Guzmán-Chávez, F., V. Calzada-Alejo, V., Zurita-Villegas, V., Luna-Loaiza, V., Moreno-Sánchez, R., Berbal-Lugo,

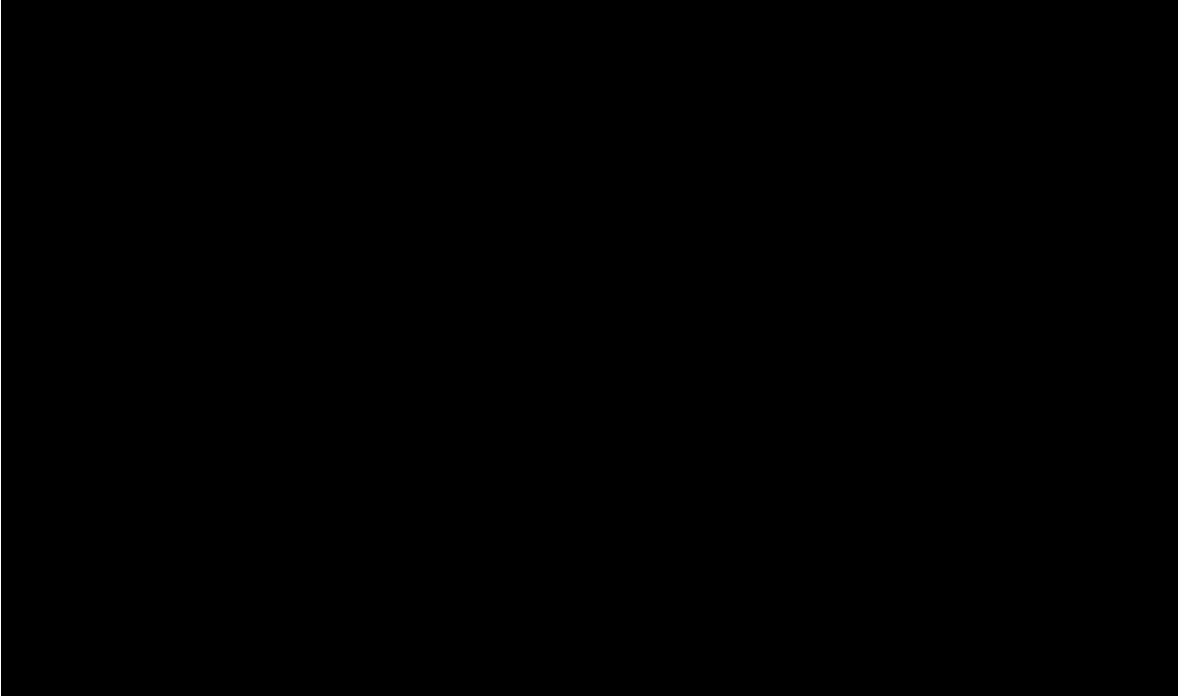
- I., Sánchez-Nieto, S. (2012). Early carbon mobilization and radicle protrusión in maize germination. *Journal of Experimental Botany*, 63(12), 4513-4526. DOI: <http://doi.org/10.1093/jxb/ers130>.
77. Sánchez C. (2009). Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, 27(2), 185-194. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.001>.
78. SIAP. 2019. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera Acciones y Programas Avance de Siembras y Cosechas Resumen nacional por estado. (Última consulta 21/06/21) Recuperado de [http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola\\_siap\\_gobmx/AvanceNacionalCultivo.do](http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalCultivo.do)
79. Sierra-Macías, M., Rodríguez-Montalvo, F.A., Palafox-Caballero, A. y Espinosa-Calderón, A. (2016). Adopción e impacto de la variedad sintética de maíz VS-536 en la región tropical del sureste de México. *Revista de Desarrollo Económico*, 3(9), 32-40.
80. Simone, O., Haase, K., Müller, E., Junk, W.J., Gonsior, G., Schmidt, W. (2002). Impact of root morphology on metabolism and oxygen distribution in roots and rhizosphere from two central amazon floodplain tree species. *Funct Plant Biol*, 29(1), 1025-1035. DOI: <http://doi.org/10.1071/PP01239>.
81. Snell, J.F. y Stanley, R.B. (1903). A Method for the Estimation of Chlorides, Bromides and Iosides. *Journal of The American Chemical Society*, 25(1), 1138-1141.
82. Sondergaard, T.E., Schulz, A. y Palmgren, M.G. (2004). Energization of transport processes in plants roles of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant Physiology*, 136(1), 2475-2482. DOI: <http://doi.org/10.1104/pp.104.048231>.
83. Stanley, R.B. (1909). A reagent dor the detection of reducing sugars. *Journal Biology Chemistry*, 5(1), 485-487. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)91645-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)91645-5).

84. Stanley, R.B. (1907). Detection and estimation of reducing sugars. *Biochemistry*, 3(1), 408-411. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)45999-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)45999-0).
85. Srivastava, A., Heise, C., Garg, A. y Bell J.B. (2002). The Relationship Between The Dominant Additional Vein Mutant in *Drosophila Melanogaster* and *Engrailed*. *Genome*, 45(6), 1077-1082. DOI: <http://doi.org/10.1139/g02-078>.
86. Sun, M., Lariviere, L., Dengl, S., Mayer, A. y Cramer, P. (2010). A tandem SH2 domain in transcription elongation factor Spt66 binds the phosphorylated RNA polymerase II C-terminal repeat domain. *Journal Biology Chemistry*, 285(53), 41597-603. DOI: <http://doi.org/10.1074/jbc.M110.144568>.
87. Tanner, W. y Caspari, T. (1996). Membrane transport carriers. *Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47(1), 595-626.
88. Tester, R.F., Karkalas, J. y Qi, X. (2004). Starch structure and digestibility enzyme-substrate relationship. *World's Poultry Science Journal*, 60(1), 186-196. DOI: <http://doi.org/10.1079/WPS200412>.
89. Tiwari, P. y Misra, A.K. (2006). Selective removal of anomeric O-acetate groups in carbohydrates using  $\text{HClO}_4\text{-SiO}_2$ . *Tetrahedron Letters*, 48(21), 3573-3576. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2006.03.050>.
90. Truernit, E. y Sauer, N. (1995). The promoter of *Arabidopsis thaliana* SUC2 sucrose-H<sup>+</sup> symporter gene directs expression of  $\beta$ -Glucuronidase to the phloem: evidence for phloem loading and unloading by SUC2. *Plant Physiology*, 196(3), 564-570. DOI: <http://doi.org/10.1007/BF00203657>.
91. Turgeon, R. y Medville, R. (2004). Phloem loading a reevaluation of the relationship between plasmodesmatal frequencies and loading strategies. *Plant Physiology*, 136(3), 3795-3803. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.104.042036>.

92. Turgeon, R., Reidel, E.J., Rennie, E.A., Amiard, V. y Cheng, L. (2009). Phloem loading strategies in three plant species that transport sugar alcohols. *Plant Physiology*, 149(3), 1601-1608. DOI: <http://doi.org/10.1104/pp.108.134791>.
93. Turgeon, E. G., y Medville, R. (2010). Amborella trichopoda, plasmodesmata, and the evolution of phloem loading. *Protoplasma*, 248(1), 173-180. DOI: <http://doi.org/10.1007/s00709-010-0237-2>.
94. Uzma, S., Khan, S., Murad, W., Taimur, N. y Azizullah, A. (2018). Phytotoxic effects of two commonly used laundry detergents on germination, growth, and biochemical characteristics of maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Environ Monit Assess*, 190(11), 651-675. DOI: <http://doi.org/10.1007/s10661-018-7031-6>.
95. Weitbrecht, K., Muller, K., Leubner-Metzger, G. 2011. First off the mark: early seed germination. *Journal of Experimental Botany*, 62(10), 3289–3309. DOI: <http://doi.org/10.1093/jxb/err030>.
96. Weschke, W., Panitz, R., Sauer, N., Wang, Q., Neubohn, B., Weber, H. y Wobus, U. (2000). Sucrose transport in to barley seeds: molecular characterization of two transporters and implications for seed development and starch accumulation. *Plant Journal*, 21(5), 455-67. DOI: <http://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00695.x>.
97. Yang, P., Li, X., Wang, X., Chen, H., Chen, F. y Shen, S. (2007). Proteomic analysis of rice (*Oryza sativa*) seeds during germination. *Proteomics*, 7(18), 3358-3368. DOI: <http://doi.org/10.1002/pmic.200700207>.
98. Zossi, S., Ruíz, R.M., Sorol, N. y Sastre, M. (2010). Espectroscopia por infrarrojo cercano (NIRS): su aplicación en análisis de jugos de caña de azúcar. *Revista Industrial Agrícola Tucumán*. 87(1).1-6.

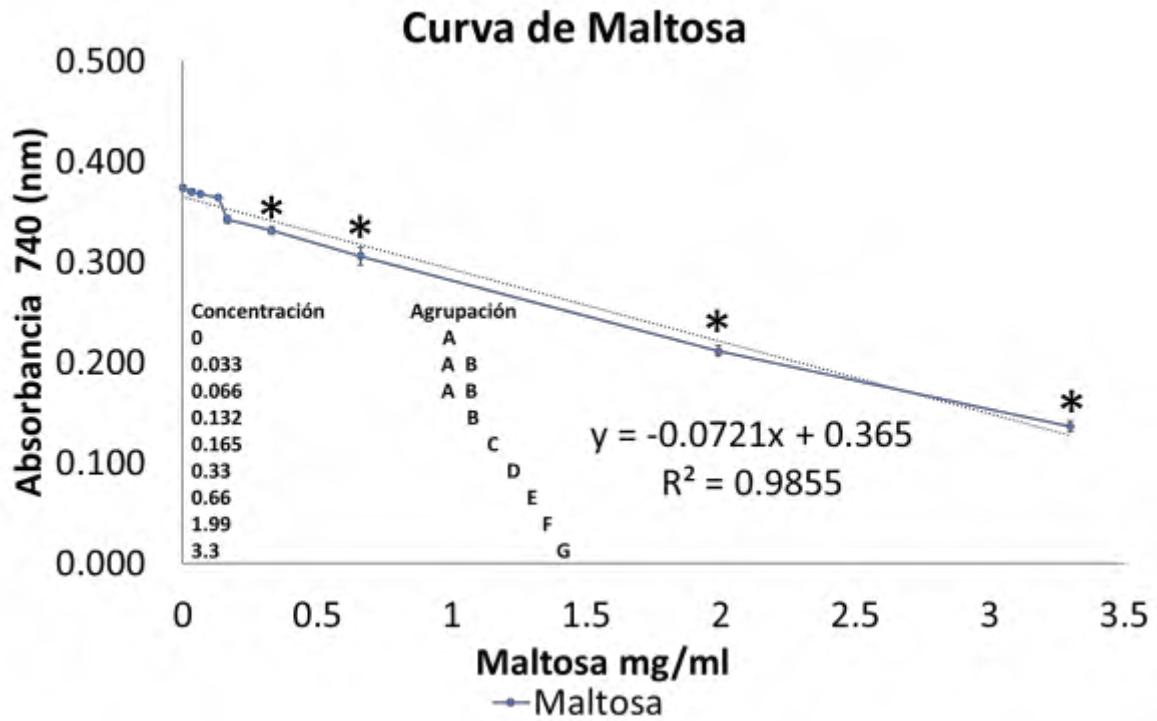
## ANEXOS.

Estadístico de la relación entre los diferentes volúmenes de agua con respecto a las horas de germinación

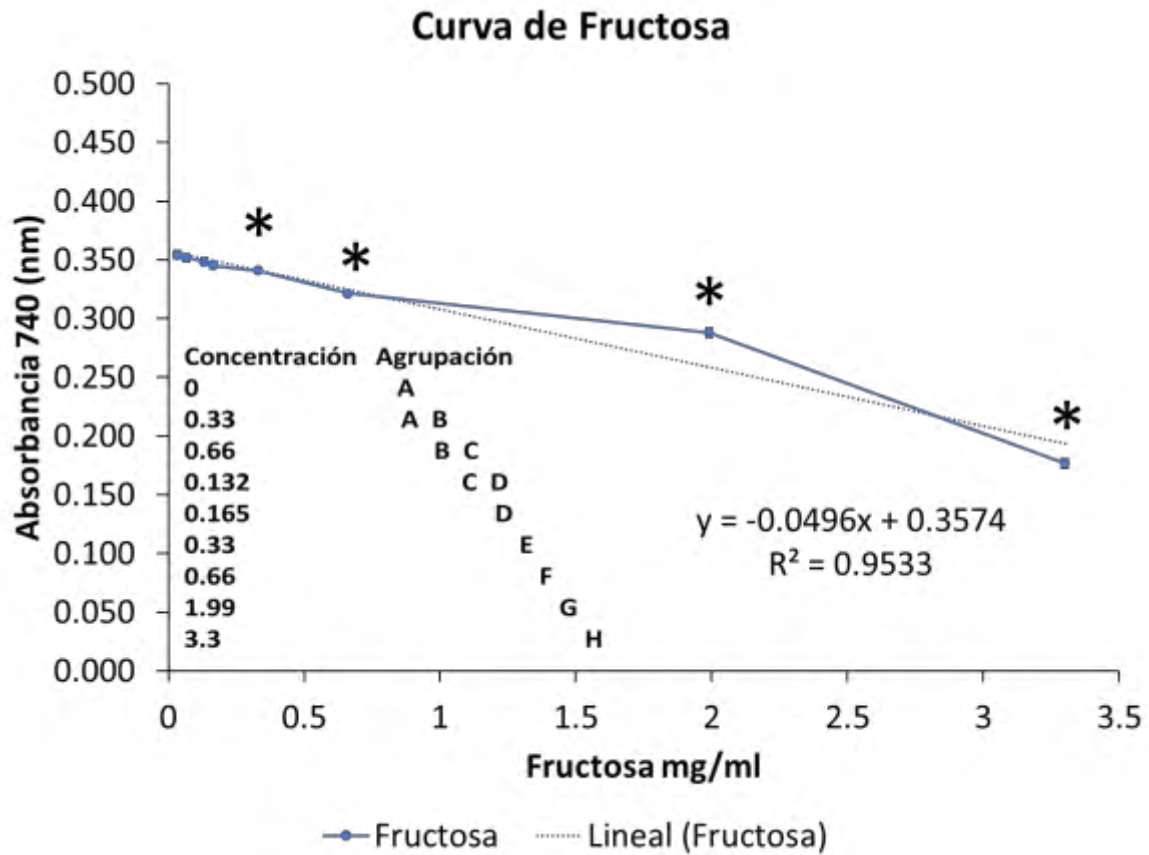


*Tukey para verificar diferencias significativas en el uso de diferentes volúmenes de agua durante la germinación de maíz en caja.*

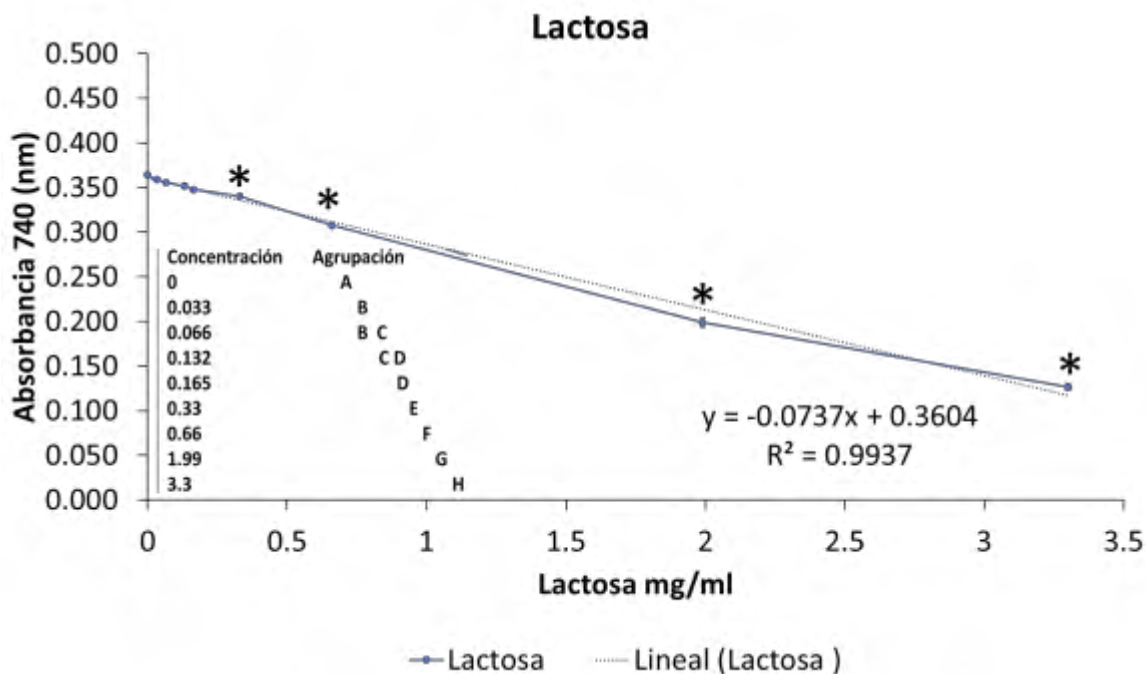
Curvas de Calibración de los Azúcares reductores y Sacarosa.



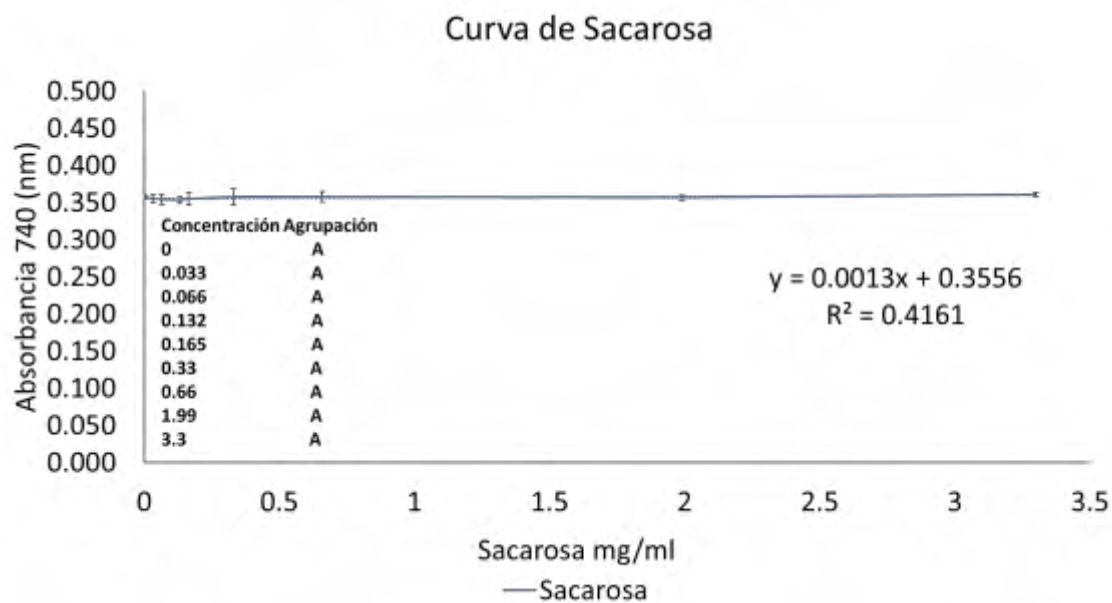
Curva estándar de maltosa a una concentración de sulfato de cobre 2.59% analizados por ANOVA de una sola vía de Tukey como pruebas ad hoc para diferencias entre parejas. Letras diferentes indican diferencias significativas  $\alpha = 0.05$ .



Curva estándar de fructosa a una concentración de sulfato de cobre de 2.59% analizado por ANOVA de una sola vía y Tukey como prueba ad hoc para diferencias entre parejas. Letras diferentes indican diferencias  $\alpha = 0.05$ .



Curva estándar de lactosa a una concentración de sulfato de cobre de 2.59% analizado por ANOVA de una sola vía y Tukey como prueba ad hoc para diferencias entre parejas. Letras diferentes indican significativas  $\alpha = 0.05$ .



Curva estándar de sacarosa a una concentración de sulfato de cobre 2.59% analizado por ANOVA de una sola vía y Tukey como prueba ad hoc para diferencias entre parejas. Letras diferentes significan diferencias significativas  $\alpha = 0.05$ .