

Jornada de Actualización
Calidad del grano de maíz para la industria y la producción en bovinos
Balcarce, 15 de Noviembre de 2013

Determinantes genéticos de la calidad de maíz

por **Guillermo H. Eyhérbide**

Ing Agr MSc PhD, INTA

La literatura científica es abundante en documentación respecto de los efectos genéticos sobre las propiedades del grano de maíz. Una de las evidencias más notables son los experimentos de selección recurrente a largo plazo iniciados en Illinois en 1896 sobre la población Burr's White y que se prolonga hasta nuestros días. Se trata de un programa de selección divergente para porcentajes de proteína y de aceite en el grano. Las respuestas observadas para ambos caracteres excedieron veinte desvíos estándares la media original de la población en el sentido positivo y cuatro en el sentido negativo. Estos valores extremos alcanzados no han sido posibles de duplicar mediante mutagénesis ni por transgénesis. Debe destacarse el nivel de mantenimiento de variabilidad genética, que permitió respuestas "en reversa" y "doble reversa" aún después de transcurridos muchos ciclos de selección (Dudley, 2007).

El endosperma es el principal reservorio de almidones, proteínas y pigmentos, y el embrión de lípidos. Según Liu (2008), durante el desarrollo de la semilla se expresan cerca de 5000 genes, un tercio de los cuales no tiene aún función conocida. Los análisis de expresión génica permitieron demostrar que diferentes grupos de genes difieren en sus patrones temporales de expresión.

Por ejemplo, los genes responsables de las zeínas tienen un pico de expresión entre los 15 y 25 días después de la fertilización, y los relacionados con el transporte de nutrientes, defensa y metabolismo del almidón y ácidos grasos lo presentan a los 15 días desde la fertilización. También pudo establecerse que algunos genes se expresan durante todo el período de desarrollo del grano, y otros lo hacen en etapas más acotadas.

El almidón es un polímero formado por dos tipos de moléculas, la amilosa y la amilopectina, que difieren en el grado de ramificación y peso molecular. Estos dos tipos de moléculas se ensamblan en los gránulos de almidón, cuyo tamaño y forma varía, y está afectado por la relación amilosa/amilopectina. Esta relación afecta además la textura del almidón, aumentando su viscosidad cuanto más amilopectina posea (Motto *et al.*, 2011). La síntesis del almidón presenta dos fases de reacciones: las relacionadas con la interconversión de azúcares intermedios y la síntesis de ADPG, que es el sustrato inmediato para la biosíntesis del almidón, y las relacionadas con la síntesis del almidón a partir de ADPG. Las mutaciones en los genes que controlan el primer grupo de reacciones tienen generalmente efectos drásticos en el fenotipo de la semilla. Las reacciones del segundo grupo dependen básicamente de las enzimas almidón sintetasas que agregan unidades de glucosa mediante uniones α -1,4, o que producen ramificaciones al romper algunas uniones α -1,4 y armar uniones α -1,6. Se han reportado al menos 28 isoformas para diferentes enzimas que intervienen en la síntesis del almidón. En la Tabla 1 se presenta el control genético para algunas características de interés en la industria y en la alimentación. La industria prefiere almidones naturales con propiedades funcionales ajustadas a sus

necesidades para reducir la dependencia de tratamientos químicos para modificarlas. En el procesamiento industrial interesan las características térmicas de la gelatinización del almidón, las cuales dependen, entre otros factores, del tamaño del gránulo, el grado de cristalinidad, la relación amilosa/amilopectina y la estructura fina de la amilopectina. El fenómeno inverso, la retrogradación, también depende de la relación amilosa/amilopectina. La cristalinidad de los gránulos de almidón, además de afectar sus propiedades funcionales, modifica la accesibilidad al ataque enzimático, lo cual tiene importantes efectos en la elaboración de bioetanol. Se evaluaron las propiedades térmicas del almidón de doce líneas argentinas en diferentes años a fin de establecer la contribución del genotipo, el ambiente y sus interacciones. En comparación con la literatura sobre germoplasma de otros orígenes, las líneas argentinas tuvieron menor entalpía promedio para gelatinización lo cual permitiría utilizar estos almidones con menor energía. Por otra parte la relación entre las entalpías de gelatinización y retrogradación resultó por encima de los valores habituales, sugiriendo que estos almidones podrían emplearse como sustituto de la fibra dietaria. Más allá de las diferencias significativas entre las líneas para algunas de las propiedades térmicas, también se encontraron diferencias entre ellas en cuanto a la estabilidad a través de ambientes para algunas de las características térmicas (Eyhéabide *et al.*, 2007).

En los últimos años se efectuaron inversiones privadas en plantas para elaboración de etanol a partir de grano de maíz. La Figura 1 muestra los rendimientos de etanol obtenidos a escala de planta piloto de laboratorio por unidad de peso de maíz para 17 híbridos de maíz evaluados en el norte de Buenos Aires. Se

encontraron diferencias significativas entre híbridos, aunque no superaron entre ellos una brecha del 7% (Alegre & Eyherabide, 2012).

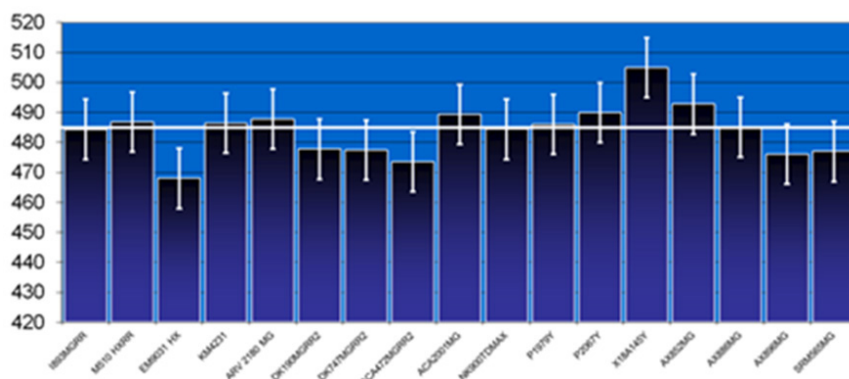


Figura 1. Producción de etanol por unidad de peso de grano de maíz (litros/tonelada). Fuente: Alegre M & Eyherabide G. 2012. Jornada de Actualización de Maíz 2012. INTA Pergamino-AIANBA-MAIZAR

Los mismos autores determinaron que los híbridos que tenían a rendir menor volumen de etanol eran los de endosperma más duro. No se encontró correlación significativa entre el rendimiento de grano y el rendimiento de etanol por unidad de peso, pero sí una correlación casi perfecta entre el rendimiento de grano y el rendimiento de etanol por hectárea. Ello significa que con los híbridos actualmente disponibles en el mercado, el criterio de elección del híbrido para bioetanol debe basarse en la producción de grano por hectárea. Además del almidón del grano, existen en la planta otros carbohidratos complejos que forman parte de las paredes celulares. Unos y otros pueden ser sustrato para procesos de fermentación que permitan la obtención de etanol, aunque el grado de exposición a la acción enzimática sea diferente. La elevada correlación entre el rendimiento de etanol y de grano

por hectárea justifica que el mejoramiento de la productividad de grano y la tolerancia a estrés se utilicen también como criterio de selección con fines energéticos. Por ingeniería genética pueden desarrollarse genotipos para producción de etanol empleando dos enfoques no mutuamente excluyentes: aumentar la cantidad de biomasa producida por hectárea, o adaptar las propiedades de esa biomasa a los requerimientos de la fermentación. Un ejemplo del primer enfoque fue sobreexpresar la enzima ADPG utilizando un promotor de la zeína de 27-kDa, logrando mayor síntesis de almidón y 15% más de peso del grano (Wang et al., 2007). Como ejemplos de la aplicación del segundo enfoque podemos mencionar la reducción del contenido de lignina empleando genes *bm* o nervadura marrón, o utilizar secuencias antisentido para alterar el contenido de lignina en maíz, como si se tratara del mutante *bm* (Piquemal et al., 2002). Sin embargo estas estrategias no resultan convenientes por sus efectos agronómicos indeseables. Alternativamente puede lograrse que la propia planta sintetice enzimas que digieren las lignocelulosas, utilizando una β 1-4 endoglucanasa termoestable proveniente de la bacteria *Acidothermus cellulolyticus*, aunque no se ha logrado suficiente expresión, ni que ésta ocurra en el momento apropiado de la vida entera de la planta. Existen híbridos transgénicos para un evento de α -amilasa termo-resistente proveniente de una cepa de *Thermococcus spp.* que se expresa en el endosperma. Ello simplifica, abarata y hace más eficiente el proceso de licuefacción (Torney et al., 2007).

Tanto el contenido de aceite como su composición relativa de ácidos grasos están bajo control genético. Se han relevado al menos 50 QTLs asociados a la acumulación de lípidos. El fenómeno de xenia, es decir el efecto inmediato que produce el grano

de polen sobre el fenotipo de la semilla es empleado como estrategia para el desarrollo de cultivares de alto contenido de aceite. Se trata de emplear un polinizador caracterizado por una alta relación entre el peso del germen y el peso de la semilla entera, y por lo tanto con un alto porcentaje de aceite en el grano. El polen del donante de alto porcentaje de aceite fecunda a plantas androestériles de alta productividad y contenido normal de aceite, pero que por efecto de xenia forman granos de alta relación germen/semilla (Lambert, 2001). Otra forma de aumentar el contenido de aceite del grano es utilizar la transformación genética mediante genes de trigo que codifican para puroindolinas A y B. Los genes que codifican para estas proteínas fueron colocados bajo el control de un promotor de maíz y se logró aumentar el tamaño relativo del germen y elevar el contenido total de aceite en la semilla en un 25% (Zhang *et al.*, 2010). La composición de ácidos grasos puede modificarse por la acción de genes mayores y menores (Tabla 1). Los genes menores tienen efecto aditivo y mediante tres ciclos de selección recurrente fue posible aumentar significativamente el porcentaje de ácido oleico de la población y obtener líneas con porcentaje de ácido oleico levemente superiores al 65% (Eyhérabide *et al.*, 2012).

Característica	Control genético
Alta Amilosa (amilomaíz clase V y VII)	Gen mayor recesivo ae (amilosa extender) y genes modificadores con efecto aditivo
Amilopectinoso (maíz waxy)	Gen mayor recesivo wx (waxy)
Dulce	Gen mayor recesivo su1 (sugary)
Alto contenido de aceite	Genes menores con efecto aditivo
Alto contenido relativo de ácido oleico	Gen mayor recesivo olc1; genes menores
Alto contenido relativo de ácido linoleico	Gen mayor recesivo ln1; genes menores
Rendimiento de germen, gluten, fibra, tamaño de grano	Genes menores, con efecto aditivo y no aditivo
Dureza del grano (Flint)	Genes menores, con efecto aditivo
Pigmentos y antioxidantes	Genes mayores (Y1, Vp5, Vp9) y menores
Maíz alta lisina	Genes mayores recesivos de la serie opaco (o2, o6, o7, o15). Genes mayores con dominancia parcial de la serie floury (fl1, fl2, fl3)
Maíz alta lisina y con endosperma vítreo (QPM)	Gen mayor recesivo o2 y genes modificadores con dominancia parcial
Bajo contenido de ácido fitico	Gen mayor serie lpa

Tabla 1. Control genético de algunas características físicas y de composición química del grano de interés en la industria y la alimentación humana y animal. Fuente: Adaptado de Motto *et al.* (2011), Naqvi *et al.* (2009), Lambert (2001).

Las proteínas del maíz representan aproximadamente el 10% del peso del grano, y difieren en su abundancia relativa y valor nutricional. El grupo más importante son las zeínas. Estas poseen poco valor nutricional debido a que son pobres en lisina y triptofano, aunque son ricas en glutamina, prolina, alanina y leucina. Dentro de las zeínas, las α - son el grupo más importante y son codificadas por varios grupos de genes ubicados en diferentes cromosomas. Existen varios mutantes que por afectar el momento y tasa de síntesis de zeínas provocan una disminución de su contenido en el grano maduro. Algunos de ellos pueden utilizarse para producir genotipos de alta lisina (por disminución relativa del contenido de zeínas, pobres en lisina y triptofano). Una manera de mejorar el valor nutricional del maíz es el uso del gen *opaco-2* en estado homocigota recesivo. Sin embargo este mutante tiene efectos pleiotrópicos indeseables, como el acor-

tamiento del período del llenado de grano con las consiguientes pérdidas de rendimiento de grano, y la mayor susceptibilidad de los granos a enfermedades y plagas del almacenaje. Para reducir estas desventajas se utilizan genes modificadores que convierten el endosperma suave y opaco en vítreo, pero manteniendo el contenido de alta lisina. Maíces de esta característica son designados genéricamente QPM (Quality Protein Maize). Otra alternativa ideada por Wu y Messing (2011) utiliza un esquema de silenciamiento de zeínas y recuperación de modificadores, que tienen la ventaja de reducir los efectos negativos del gen opaco2 mutante y de simplificar y acelerar el proceso de conversión de líneas progenitoras de híbridos QPM. En general el aumento de lisina por medios de selección convencional tiene la desventaja de que se producen efectos pleiotrópicos indeseados. Aprovechando que el metabolismo de la síntesis de lisina en plantas guarda bastante similitud con el de las bacterias, se han utilizado a algunas del género *Corynebacterium* y *Escherichia* que sintetizan abundante cantidad de lisina. La estrategia fue transformar maíz y otras especies vegetales con los genes bacterianos que codifican para esas enzimas y que son insensibles a la acumulación de lisina, con la intención de acumular lisina en el endosperma. Entre los genes involucrados están los de la aspartato quinasa y ácido dihidropicolínico sintetasa (Reyes *et al.*, 2009) Otra alternativa es actuar sobre el catabolismo de la lisina, aprovechando genes claves como los de la lisina α -cetoglutarato reductasa y la sacaropina dehidrogenasa.

La dureza endospermica es una característica física determinada por el contenido de ciertas fracciones de las zeínas del endosperma, y su interacción con los gránulos de almidón. Un

estudio de validación de selección por dureza endospermica utilizando un método indirecto de transmitancia de infrarrojo cercano desarrollado por Robutti *et al.* (1994) permitió observar modificaciones significativas en el contenido de ciertas fracciones de zeína (Eyhérbide *et al.*, 1996).

Los granos de maíz deben su coloración amarillo-anaranjada a pigmentos carotenoides (carotenos y xantofilas). Entre los primeros podemos mencionar al α -, β -, y γ -caroteno, y entre las xantófilas a la zeaxantina, la luteína (las más abundantes) y la β -criptoxantina. Los pigmentos carotenoides totales se encuentran principalmente en el endosperma vítreo (80%), en el harinoso (16%), en el germen (3%) y en el pericarpio (1%), pero los porcentajes varían levemente dependiendo del genotipo y del tipo de pigmento. En el caso de β - caroteno y β - criptoxantina, la mayor abundancia ocurre en el germen . Son importantes para la nutrición por cuanto tienen actividad provitáminica A y antioxidante, especialmente el β - caroteno, α -caroteno, β - criptoxantina y γ -caroteno, en orden decreciente. Aún no se conoce en profundidad cuál es la contribución particular de cada pigmento al color del grano. Algunos de los genes de la biosíntesis de carotenoides han sido ya clonados. El primer paso de la biosíntesis está bajo el control del gen Y1, que codifica la fitoeno sintetasa. El alelo mutante causa la ausencia total de pigmentos carotenoides. Muestra además un efecto de dosis sobre el contenido de carotenoides. Otros genes involucrados son también genes mayores, entre ellos *vivíparo 5* y *vivíparo 9* y otros menores que terminan determinando la acumulación de β - y α -carotenos. Mediante mejoramiento convencional y transformación genética ha sido posible mejorar el contenido de provitamina A, vitamina C y ácido fólico. Colocando

el gen de la fitoeno sintetasa de maíz bajo control de un promotor de glutenina de bajo peso molecular del trigo y el gen *crtl* de la bacteria *Pantoea ananatis* bajo control de un promotor de proteína de cebada se logró aumentar en 169 veces el contenido de β -caroteno. Con el gen que codifica para la dihidroascorbato reductasa (*dhar*) de arroz puesto bajo control de un promotor para un gen de proteína de cebada se logró sextuplicar el contenido de ácido ascórbico, y mediante el gen *folE* de *Escherichia coli* bajo control de un promotor de cebada se duplicó el contenido de ácido fólico (Naqvi *et al.*, 2009). Otros aportes posibles al mejoramiento de la calidad nutricional consisten en aumentar significativamente el contenido de vitamina E (γ -tocoferol), y reducir el de compuestos antinutricionales, como el ácido fítico. Ello puede lograrse utilizando mutantes de la serie *lpa*, pero frecuentemente tienen efecto pleiotrópico indeseable desde el punto de vista agronómico. Existen experiencias alentadoras de silenciamiento génico del alelo silvestre para el locus *lpa1*.

Los continuos avances en el mejoramiento genético vegetal, en genética molecular, y las demandas de los mercados, amplían el foco de interés sobre cultivos tradicionales como el maíz, no solamente como fuente de materia prima y de ingredientes para la industria alimentaria, sino también para la industria farmacéutica, textil, química, y de biocombustibles. En el caso de características relacionadas con la calidad del grano, tal vez como en ninguna de las otras, existe hoy una enorme oportunidad para aplicar técnicas de mejoramiento convencional por sí solo o combinado con biotecnologías, que posibiliten una mayor adecuación de las propiedades físicas y químicas de los granos de maíz para su utilización en la industria y la alimentación humana y animal,

incluyendo desarrollos que impacten sobre el nivel nutricional y la salud. Las posibilidades del mejoramiento genético también son extensivas a la modificación de otros componentes de la planta.

BIBLIOGRAFÍA

Alegre M & Eyhérabide G. 2012. Obtención de etanol a partir de granos de maíz de diferentes calidades. *Jornada de Actualización de Maíz 2012*. INTA Pergamino-AIANBA-MAIZAR

Dudley JW. 2007. From means to QTL: The Illinois Long-term selection experiment as a case study in quantitative genetics. *Crop Sci.*, 47 (S3): S20-S31

Eyhérabide G, Robutti JL & Borrás FS. 1996. Effect of near-infrared transmission-based selection on maize hardness and the composition of zeins. *Cereal Chem.*, 775-778

Eyhérabide G, Borrás F, Robutti J, Presello D & White P. 2007. Characterization of thermal traits of starches from Argentinian maize inbreds: genotypic and crop year variability. *Cereal Chem.*, 84(1): 92-96

Eyhérabide G, Percibaldi M, Borrás F & Presello D. 2010. Respuesta a la selección recurrente fenotípica por composición relativa de ácidos grasos en maíz. *Actas IX Congreso Nacional de Maíz*. AIANBA, Rosario: 325-327

Lambert R. 2001. High-oil corn hybrids. En: Hallauer A (Ed). *Specialty corns*. Chapter 5. 2nd. Edition. CRC Press

Liu X, Fu J, Gu D, Liu W, Liu T, Peng Y, Wang J & Wang G. 2008. Genome-wide analysis of gene expression profiles during the kernel development of maize (*Zea mays* L.). *Genomics*, 91: 378-387

Motto M, Hartings H, Fracassetti M & Consonni G. 2011. Grain quality-related traits in maize: gene identification and exploitation. *Maydica*, 56: 1770. Advance Access publication: 291-314

Naqvi S, Zhu C, Farre G, Ramessar K, Bassie L, Breitenbach J, Perez Conesa D, Ros G, Sandmann G, Capell T & Christou P. 2009. Transgenic multivitamin corn through biofortification of endosperm with three vitamins representing three metabolic pathways. *PNAS*, 106 (19): 7762-7767

Piquemal J, Chamayou S, Nadaud I, Beckert M, Barriere Y, Mila

I, Lapierre C, Rigau J, Puigdomenech P & Jauneau A et al. 2002. Down regulation of caffeic acid O-methyltransferase in maize revisited using a transgenic approach. *Plant Physiol.*, 130: 1675-1685

Reyes A, Bonin C, Houmard N, Huang S & Malvar T. 2009. Genetic manipulation of lysine catabolism in maize kernels. *Plant Mol. Biol.*, 69: 81-89

Robutti JL, Borrás F & Colazo JC. 1994. Las zeínas de alto contenido de azufre y su relación con la textura endospermica del maíz. *Rev. Invest. Agropecuarias*, 25: 105-114

Torney F, Moeller L, Scarpa A & Wang K. 2007. Genetic engineering approaches to improve bioethanol production from maize. *Current opinion in Biotechnology*, 18: 1-7

Wang Z, Chen X, Wang J, Liu T, Liu Y, Zhao L & Wang G. 2007. Increasing maize seed weight by enhancing the cytoplasmic ADP-glucose pyrophosphorylase activity in transgenic maize plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 2007, 88: 83-92

Wu Y & Messing J. 2011. Novel genetic selection system for quantitative trait loci of quality protein maize. *Genetics*, 188: 1019-1022

Zhang J, Martin J, Beecher B, Lu C, Curtis Hannah L, Wall M, Altosaar I & Giroux M. 2010. The ectopic expression of the wheat Puroindoline genes increase germ size and seed oil content in transgenic corn. *Plant Mol. Biol.*, 74: 353-365