



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

---

---

## Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología

### ANÁLISIS FISIOLÓGICO DE SEMILLAS DE MAÍZ AZUL

Trabajo correspondiente a la opción de Titulación:

**Curricular en la modalidad de Proyecto de Investigación**

Que para obtener el Título de Ingeniera en Biotecnología

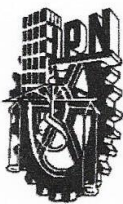
Presenta:

Samaí Tamara Castillo García

Dirigida por: Dr. Germán Fernando Gutiérrez Hernández

Ciudad de México, mayo 2017.





## AUTORIZACIÓN DE USO DE OBRA

### INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL PRESENTE

En la Ciudad de México el día 31 del mes de mayo del año 2017, la que suscribe Samaí Tamara Castillo García, alumna del Programa Académico de Ingeniería Biotecnológica (Boleta 2014620064), adscrita a la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional, manifiesta ser autora de la presente Tesina, intitulada "Análisis fisiológico de semillas de maíz azul", realizada bajo la dirección del Dr. Germán F. Gutiérrez H., y acepta ceder los derechos del mencionado trabajo, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, siempre y cuando se le otorguen los créditos correspondientes.

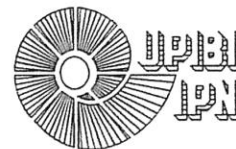
Cabe señalar que para consultar a la autora y para solicitar mayor información sobre la referida obra, o bien, para tramitar permisos de uso de la misma, favor de dirigirse a la dirección electrónica [stcg2503@gmail.com](mailto:stcg2503@gmail.com).

ATENTAMENTE

Samaí Tamara Castillo García



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

**SUBDIRECCIÓN ACADÉMICA**

**ACTA DE TRABAJO ESCRITO**

En la Ciudad de México el día 31 de Mayo del 2017, siendo las 1:40 se reunieron los integrantes de la Comisión de Evaluación para Titulación por Opción Curricular con el fin de revisar el trabajo escrito titulado: **Análisis fisiológico de semillas de maíz azul** que presenta la alumna Samaí Tamara Castillo García con número de boleta 2014620064, aspirante a Ingeniera Biotecnóloga.

Después de intercambiar opiniones los integrantes de la Comisión de Evaluación manifiestan APROBAR EL TRABAJO ESCRITO, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes para la opción curricular de titulación.

**COMISIÓN REVISORA.**

*German J. Gutiérrez AA.*  
Nombre y firma Director Interno

*Fabida Moreno Zavala*  
Nombre y firma Evaluador 1

*Luis Jorge Corzo Rios*  
Nombre y firma Evaluador 2

*Jonas Martínez Salas*  
Nombre y firma  
Director de Programa Académico

## AGRADECIMIENTOS

Al **Instituto Politécnico Nacional** por acogerme durante mi formación técnica y profesional, por haberme dado una educación de calidad y haberme formado como una Ingeniera que busca siempre el desarrollo de su país y la mejora continua de la tecnología en México, aplicando siempre el lema *“La Técnica al Servicio de la Patria”*.

Quiero agradecer de manera muy especial **a mi querida familia** por haberme apoyado a lo largo de mi trayectoria académica y en todas las metas que me he propuesto hasta la fecha.

**A mi mamá**, por ser una gran inspiración, una mujer fuerte y con convicciones, por haberme enseñado a ser una persona con principios y que lucha por lo que quiere en la vida, por enseñarme a nunca darme por vencida aún en los momentos más difíciles. Todos mis logros te los debo a ti y te dedico especialmente la culminación exitosa de mi carrera, gracias desde el fondo de mi corazón.

**A mi papá** por darme un hogar sin falta de nada, por ayudarme a mi mamá a criarnos a mí y mis hermanos. Por hacer de mis hermanos unos hombres trabajadores y de bien. Por ayudarme a realizar mi cambio de carrera técnica, lo cual conllevó a mi elección de carrera.

**A mis hermanos** por siempre alentarme a realizar lo que yo quisiera sin importar lo que dijeran los demás, por siempre cuidarme y preocuparse por mí, aún teniendo a sus familias. Por enseñarme desde pequeña a ser una persona de bien. Gracias por su apoyo incondicional y su cariño.

**A mis sobrinos** por enseñarme a ser más responsable, por mostrarme un cariño genuino e incondicional, y por indirectamente alentarme a cumplir mis metas para poder darles un país mejor en donde se les facilite crecer.

**A mis cuñadas**, gracias a ambas por apoyarme, por mostrarme en varias ocasiones lo que conlleva la responsabilidad no sólo de tener una familia, sino de querer superarse, de siempre luchar por aquellas metas que quieren alcanzar.

**A mi novio** muchas gracias por aguantar los días en los que más trabajo tenía, por apoyarme y en ocasiones ayudarme con mis tareas. Gracias por alentarme a siempre hacer las cosas bien, a mejorar conforme el tiempo pasa. Muchas gracias por siempre estar ahí, por ayudarme a tranquilizarme con la presentación de dicho trabajo. Gracias por todo.

**Al equipo TAYMA** muchas gracias, Adri, Yere, Mariana y Ana. Gracias por siempre hacerme reír, por hacer mi estancia en UPIBI una de las más amenas. Gracias por asistir a mi exposición y por ayudarme a corregir esos errores que tenía, siempre he disfrutado mucho de su compañía, de sus bromas, de nuestras pocas salidas juntas y de nuestras escasas fotos juntas.

**A mi director de proyecto**, muchas gracias Dr. Germán, gracias por creer en mí, por ayudarme a cualquier hora que lo necesitara. Gracias por confiar en mi trabajo y en el resultado que obtendría de este proyecto. Gracias por todas las enseñanzas, por las nuevas experiencias a lo largo de la realización del proyecto. Gracias por toda la ayuda a lo largo del proyecto y desde que tomé clase con usted.

**A mis evaluadores**, gracias a la QFB. Fabiola y al Dr. Luis, a ambos por el apoyo, por las diversas correcciones que hicieron a mi trabajo. Gracias a ambos por acceder a ser mis evaluadores y hacer de toda mis evaluaciones de estancia de titulación algo más, mostrarme que realizar un proyecto de investigación no es fácil, que debo ser responsable, dedicada y perseverante; y que siempre debo defender mis trabajos.

**Al equipo del grupo GIIIM-2017**, gracias de nuevo a Ana, Yere, Adri y también a Alexa, gracias por hacer de éste trabajo de investigación una bonita experiencia, por siempre ayudarme a la obtención de datos, por mostrarme que un equipo de trabajo no es sólo eso, sino que debe existir una amistad y un cariño muy profundo. Gracias por ayudarme a perfeccionar mi exposición, por estar ese día tan importante conmigo y por preocuparse siempre de cómo iban mis avances del trabajo.

**A mis profesores de UPIBI**, gracias a cada uno de ustedes, que aunque no puedo mencionarlos todos, los recuerdo con mucho cariño, gracias por enseñarme lo que saben, por procurar siempre que no sólo pasemos las materias sino que verdaderamente aprendamos y seamos unos excelentes ingenieros e ingenieras. Gracias sobre todo a mis profesores de octavo semestre, siempre me apoyaron con la realización de mi proyecto y me hacían sentir segura de lo que estaba haciendo, gracias por ayudarme con dudas de mi proyecto, o a veces darme permisos de salir a checar mis avances. Gracias a todos y cada uno de ustedes.

**A mis amigos del CECyT 9 y profesores**, gracias a mis amigos por apoyarme después de egresar de la vocacional, por recordarme, por alentarme en mi exposición (gracias por asistir Jessy y Hugo), por ayudarme a llegar hasta donde estoy ahora. A mis profesores les agradezco todo lo que me enseñaron y apoyaron, todo lo que me aconsejaron durante mi decisión de que estudiar.

**A mis compañeros, amigos y profesora de Taekwondo**, gracias a todos porque fueron un punto clave para egresar, gracias Sandy por siempre exigirme, en torneos y entrenamientos, esa disciplina me ayudó mucho durante la realización de mi proyecto. Gracias a mis amigos y compañeros porque siempre hicieron que los entrenamientos fueran duros, pero divertidos y amenos. Gracias Sergio y Janice por siempre hacerme reír y por mantener ésta amistad.

**A mis amigos**, agradezco a mis amigos en general de la secundaria (Héctor, gracias por seguirme apoyando como en la secundaria), vocacional y universidad, gracias a todos por el apoyo, por ayudarme cuando tenía dudas, por hacerme disfrutar de cada etapa de mi vida y de mi formación tanto personal como profesional. Gracias a todos.

**¡GRACIAS A TODOS!**

## ÍNDICE

RESUMEN.....	7
PALABRAS CLAVE .....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
OBJETIVOS .....	9
MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
Material genético.....	12
Diseño experimental.....	12
EVALUACIONES FÍSICAS .....	12
Peso Hectolítrico .....	12
EVALUACIONES FISIOLÓGICAS .....	12
Viabilidad .....	12
Prueba de germinación normal .....	13
Materia seca .....	13
Análisis estadístico.....	13
Germinación Normal .....	13
Protocolo prueba de tetrazolio para viabilidad de semillas y vigor .....	14
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	15
CONCLUSIONES .....	17
BIBLIOGRAFÍA.....	18
ANEXOS.....	20

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Cuadros medios del análisis de varianza de las variables físicas bajo estudio .....	15
Cuadro 2 Comparación de medias de las variables físicas de los genotipos L 11, L 12 y el híbrido L 11 x L 12 .....	16
Cuadro 3 Coeficientes de correlación de las variables físicas bajo estudio .....	17

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Prueba de viabilidad con tetrazolio del genotipo L 11. ....	20
Figura 2 Prueba de viabilidad con tetrazolio del genotipo L 12. ....	21
Figura 3 Prueba de viabilidad con tetrazolio del híbrido L 11 x L 12.....	22
Figura 4 Clave de interpretación para la prueba de tetrazolio en maíz.....	23

## RESUMEN

Con los objetivos de analizar el comportamiento fisiológico de semillas de tres genotipos de maíz azul y de establecer las asociaciones entre las variables evaluadas, así como de estimar el efecto de su constitución genética, se realizó el presente estudio durante el 2017 en el Laboratorio de Biotecnología de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional. Los genotipos empleados fueron un híbrido de cruce simple de maíz azul y sus progenitores femenino y masculino. Las variables evaluadas fueron peso hectolítrico, viabilidad, plántulas normales y anormales, y semillas muertas. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones y una unidad experimental de 10 semillas. Los resultados obtenidos se sometieron a análisis de varianza, comparación de medias (Tukey, 0.05) y se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson, para todo el procedimiento estadístico se utilizó el programa SAS (ver. 9.2).

Los resultados muestran varianzas significativas para casi todas las variables, excepto para las variables de plántula normal y peso seco total. Esto indicó que nuestras semillas fueron sanas. Además la aptitud fisiológica es excelente ya que las semillas tienen un potencial germinativo muy alto. Se observó una cantidad de plántula normal muy parecida entre los tres genotipos. Los procesos fisiológicos de viabilidad fueron muy altos en las semillas del híbrido, teniendo una actividad metabólica alta (alto vigor).

En la prueba de tinción con tetrazolio se detectaron algunas zonas en pocas semillas sin actividad metabólica distribuidas al azar en las estructuras del embrión, aunque en las semillas del híbrido L 11 x L 12 fueron nulas esas zonas. En cambio en la hembra L 11 y el macho L 12, muestran varias zonas sin actividad metabólica.

El haber obtenido largas plántulas en nuestros 3 tratamientos, explicaría el resultado en la correlación entre longitud de total y absorbancia ( $r=0.7^{**}$ ), pues se tiene una estrecha relación entre ambas variables, ya que si se obtiene una alta absorbancia se puede afirmar que tenemos una viabilidad de las semillas.

## PALABRAS CLAVE

*Zea mays L.*, fisiología germinativa, cloruro de tetrazolio, maíz azul, viabilidad de semillas.

## INTRODUCCIÓN

El maíz azul, variedad llamada así por el color de sus granos, tiene menos almidón y menos índice glucémico (IG). El menor índice de almidón puede hacer al maíz azul excelente para la elaboración de pinole, atole, de palomitas de maíz y tiene muy buen rendimiento de tortillas, ya que aporta menos calorías lo que le hace ideal para la alimentación y, sobre todo, para prevenir padecimientos tales como la diabetes y enfermedades cardíacas. Además la carga proteínica que aporta a nuestro organismo es superior en un 20% con respecto al maíz blanco y sus carbohidratos son de fácil digestión.

Dicha variedad se caracteriza por sus mazorcas alargadas con granos cristalinos y semi harinosos de coloración azul o violáceo en la aleurona (capa interna del grano). Endémica del estado de Chihuahua, distribuida en la Alta, Baja Babícora y Sierra Tarahumara.

Se relaciona con la raza de maíz Gordo por los caracteres de planta, espiga y algunos caracteres de mazorca y grano; se han colectado muestras con cierto abultamiento de la base que atribuyeron a la influencia de la raza Olotón del sureste de México.

Se ha utilizado para extraer pigmentos de exportación a los Estados Unidos y a la Comunidad Económica Europea para colorear alimentos. También se usa para elaboración de totopos y frituras en Estados Unidos.

Los colores azul púrpura típicos del maíz azul son poco frecuentes en la naturaleza y se lo confieren unos pigmentos hidrosolubles conocidos como antocianinas, compuestos considerados antioxidantes que también se encuentran en las frutas azules y moradas, o en el vino tinto.

El maíz azul tiene un contenido cuatro veces superior de antocianinas en comparación con el arándano azul, siendo la cianidina C3G la más abundante en el maíz azul y la que posee más actividad antioxidante.

En el contexto anterior, es necesario desarrollar híbridos y variedades de maíz azul para cumplir con la demanda de maíz azul en la Mesa Central de México con características agronómicas superiores a los criollos prevalentes en la zona, así como también con características favorables de germinación, por lo que para este trabajo los objetivos fueron:



## OBJETIVOS

1. Analizar el comportamiento fisiológico de semillas de tres genotipos de maíz azul en términos de peso hectolítrico, viabilidad y formación de plántulas normales y anormales y presencia de semillas muertas.
2. Establecer las asociaciones entre las variables anteriores.
3. Estimar el efecto de la constitución genética de las semillas bajo estudio, sobre la expresión de las variables analizadas.

## REVISIÓN DE LITERATURA

El grano de maíz es importante para la alimentación humana en América Latina y África (OCDE/FAO, 2011). En México es el cultivo principal, Ocupa el 33% de la superficie Sembrada nacional (7.5 millones de hectáreas), durante el año 2013 se produjeron 22.7 millones de toneladas de grano, el rendimiento nacional medio es de 3.2 toneladas por hectárea, lo cual representa el 18% del valor de la producción agrícola (78 mil millones de pesos) (FAOSTAT, 2015) y se estima un consumo anual aparente de 2010 kilogramos de grano por persona (Morris y López, 2000).

En México se cultivan maíces criollos (*Zea mays L.*) porque poseen características de adaptación específicas para una región geográfica o de consumo para un sector de la población debido a que satisfacen necesidades específicas de dichos sectores por su adaptación, sabor o color. Es deseable entonces depurarlos, o utilizar su variación genética mediante fitomejoramiento para incrementar sus rendimientos. Además, estos criollos constituyen la base genética sobre la cual se realiza la actividad agrícola tradicional, de modo que es prioritario su conocimiento básico (Hernández y Esquivel, 2004).

Los maíces de color han estado presentes en la mitología, rituales religiosos y en la alimentación de las culturas indígenas de México (Arellano *et al.*, 2003).

En los Valles Altos Centrales de México (en los Estados de Puebla, Tlaxcala, México e Hidalgo) se cultivan alrededor de 1.5 millones de hectáreas de maíz, de las cuales 85 % son de temporal (secano) y de ellas 15 % se siembran con maíz criollo pigmentado, azul principalmente; de estas últimas se estima una cosecha anual de 300 mil toneladas (Antonio *et al.*, 2004).

En el Altiplano Central de México se siembran bajo condiciones de temporal 150 mil hectáreas de maíz azul que producen 300 mil toneladas y la producción se aprovecha para la elaboración de alimentos como tortillas, tlacoyos, quesadillas, harina para atole y pinole (Arellano, 2014). Se estima que la demanda actual de maíz azul en la Mesa Central del País es de 450 mil toneladas para aprovechamiento tradicional y 5 mil para industria de la harina nixtamalizada. El precio actual del maíz azul es de \$4,500 por tonelada, lo que es superior 80% respecto al precio del maíz blanco. Para satisfacer la demanda se requieren nuevas variedades o híbridos que dupliquen el rendimiento actual, y tengan resistencia al acame, textura de grano semicristalina, coloración intensa del grano, tolerancia a plagas y enfermedades y de estructura de planta adecuada para mecanizar siembras de alta densidad de población. La demanda actual se puede satisfacer, en primera instancia, generando y liberando nuevos genotipos con alto desempeño agronómico y mejores caracteres de calidad industrial y en instancias posteriores generando tecnología de manejo del cultivo y la semilla de los progenitores en calidad original y registrada que esté a disposición de los comercializadores de semilla certificada.

Los pigmentos vegetales han adquirido un uso importante en la industria de los cosméticos y recientemente se ha demostrado que presentan un efecto fisiológico importante al disminuir la presencia de enfermedades crónico-degenerativas como el cáncer, también se han relacionado con la disminución de problemas cardiovasculares así como con la oxidación de proteínas de bajo peso molecular (Guzmán, 1999).

Por otro lado, se ha reportado que las antocianinas presentes en alimentos de origen vegetal son altamente inestables a la luz y el oxígeno. Por lo anterior se ha intentado establecer protocolos para estabilizar estos compuestos y poder utilizarlos como pigmentos naturales en alimentos, para propiciar la salud humana y promoción de la belleza (Hollman *et al.*, 1996). Abdel-Aal y Hucl (2003) realizaron un estudio en trigo azul y encontraron que la estabilidad de las antocianinas está en función del pH de extracción y la concentración del SO<sub>2</sub>, el cual actúa como agente estabilizador.

Los colores del grano de maíz (negro, morado, azul o rojo) se deben a la presencia de pigmentos en la capa de aleurona, en el pericarpio o en ambas estructuras de la semilla (Salinas *et al.*, 1999; Hernández–Uribe *et al.*, 2007); en particular, la antocianina azul se encuentra en la capa de aleurona (Beltrán *et al.*, 2001).

El grano de maíz azul presenta mayoritariamente una fracción harinosa (78%) y un contenido de proteína de 9.16%. En nixtamal presenta un contenido de humedad de 48.1% que resultó mejor que la de los híbridos comerciales de maíz blanco, además, produce masa suave y viscosa, lo que permite confeccionar tortillas suaves y con menor grado de ruptura, adicionalmente presenta alto rendimiento en tortilla y fritura (Macías *et al.*, 2000). Respecto a la calidad para la elaboración de productos nixtamalizados, se ha observado que los maíces que presentan el pigmento en la capa de aleurona, mantiene el color después del proceso de nixtamalización, por lo que son los adecuados para elaborar alimentos teñidos de forma natural (Salinas *et al.*, 2000).

Además de su exótico y atractivo color, el maíz azul posee antioxidantes (flavonoides) y antimutagénicos (Pedreschi y Cisneros-Zeballos, 2006), así como un mejor sabor (Antonio *et al.*, 2004), atributos sensoriales que han elevado su demanda en el mercado (Hernández-Uribe *et al.*, 2007) y su precio ha superado al del maíz amarillo e incluso al del blanco. A pesar de la existencia de numerosas variedades criollas de maíz azul y de ser muy apreciado por los productores de autoconsumo y más recientemente por consumidores urbanos, estas variedades tienen serias limitantes para su almacenamiento por su alta susceptibilidad al ataque de las plagas y por la rápida pérdida de vigor y viabilidad de sus semillas (Salinas-Moreno *et al.*, 2010), aspectos relacionados con el tipo de endospermo (harinoso o vítreo). Sin embargo, la gran mayoría de ellas carece de una descripción varietal precisa.

Se ha demostrado fehacientemente la disminución paulatina del potencial fisiológico de las semillas, ocasionada por el proceso de envejecimiento, mermándose progresivamente la capacidad germinativa, la velocidad de crecimiento inicial de la plántula y la tolerancia a condiciones adversas (Gutiérrez *et al.*, 2005). Tales efectos están asociados con alteraciones bioquímicas evidenciadas durante las primeras horas posteriores a la imbibición de los tejidos seminales (Cruz *et al.*, 1995). Los síntomas de la semilla deteriorada incluyen, además: crecimiento lento o anormal, pérdida de compuestos solubles, ocasionada por una excesiva permeabilidad de la membrana, reducción de la actividad enzimática y producción de sustancias tóxicas, tales como ácidos grasos libres (Anderson, 1973). El deterioro de las semillas es un fenómeno complejo, dado que difiere para cada genotipo, que es influenciado por factores ambientales y biológicos y porque no ocurre uniformemente en las semillas, aún dentro de un mismo lote (McDonald, 1999).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se emplearon semillas de una crusa simple de maíz azul, que son la crusa del híbrido doble L 11 x L 12; y sus respectivos progenitores (L 11 y L 12), para un total de 3 tratamientos. Las semillas se encontraban almacenadas a 4° C. El estudio se efectuó en el Laboratorio de Biotecnología de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del IPN, durante el 2017.

### **Material genético**

Un híbrido de maíz azul de crusa simple con adaptación para Valles Altos (2400-2800 msnm):

**L 11 x L 12**

Donde:

L 11 es el progenitor femenino (♀)

L 12 es el progenitor masculino (♂)

### **Diseño experimental**

Se empleó un diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones y con una unidad experimental de 10 semillas.

## **EVALUACIONES FÍSICAS**

### **Peso Hectolítrico**

Se determinó empleando una probeta de 100 mL, donde se añadieron 100 semillas en la probeta previamente tarada y se procedió a pesar todo el contenido; es decir se obtuvo el peso específico de las semillas en unidades de gramo/hectolitro

## **EVALUACIONES FISIOLÓGICAS**

### **Viabilidad**

Se determinó mediante la prueba de tetrazolio (Delouche *et al.*, 1971). Las semillas fueron embebidas en agua destilada por 24 h a temperatura ambiente y luego se diseccionaron longitudinalmente por el eje embrional; se eligieron las mitades de las semillas que mostraron mayor definición de sus componentes morfológicos y se mantuvieron sumergidas en agua destilada, para posteriormente colocarlas en cajas petri con el corte hacia abajo y agregarles 10 mL de la solución de cloruro-2-3,5-trifenil tetrazolio (1 %, p/v). Las cajas petri permanecieron en incubación por 4 h a  $25 \pm 2$  °C, y enseguida se reemplazó la solución de tetrazolio con agua destilada. La lectura de viabilidad se hizo en las estructuras embrionales escaneando las semillas. A cada semilla se le asignó uno de los

16 casos de la clave de interpretación para la prueba de tetrazolio en maíz (Delouche *et al.*, 1971).

### **Prueba de germinación normal**

Se realizó la prueba de germinación normal o estándar (ISTA 1995). Las semillas se colocaron sobre toallas de papel húmedo las cuales se enrollaron y se colocaron verticalmente dentro de bolsas de plástico a  $25 \pm 4^{\circ}\text{C}$ . A los siete días se evaluó el número de plántulas normales (PN), y anormales (PA) y la presencia de semillas muertas (SM).

### **Materia seca**

En el experimento anterior se cuantificó el peso seco (mg/plántula) acumulado en plúmula, radícula y total (PSP, PSR y PST, respectivamente).

### **Análisis estadístico**

Las variables fisiológicas se analizaron con el paquete estadístico SAS (SAS Institute, 2002). Los datos se analizaron bajo un diseño completamente al azar, con 3 tratamientos, cuatro repeticiones por tratamiento y con 10 semillas como unidad experimental. La comparación de medias se hizo mediante la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). Los datos porcentuales se normalizaron mediante la transformación por arcoseno antes de realizar los análisis de varianza y la comparación de medias correspondientes (Reyes, 1980). Además, se calcularon los coeficientes de correlación lineal entre las variables.

### **Germinación Normal**

Para lograr determinar el desempeño germinativo de las semillas se realizó la germinación normal con el siguiente procedimiento:

- Se lavó todo el material a empleado para evitar contaminaciones. Se le dio un enjuague a todos los materiales con agua destilada.
- Mantuvimos un recipiente con agua destilada donde se sumergieron las toallas de papel. Se acomodaron 3 toallas de tal manera que coincidieran todas sus esquinas y se procedió a sumergirlas. Se escurrió con cuidado el exceso de agua y evitamos que se rompieran las toallas.
- Se procedió a acomodar las semillas de maíz azul con el embrión hacia abajo para permitir así su crecimiento sin obstaculizarlo. Se hicieron 2 filas, 5 semillas arriba y 5 abajo formando un tipo de zigzag.

- Se utilizaron otras 3 toallas para cubrir las semillas (Evitamos formaciones de burbujas de aire). Ya mojadas las toallas se pusieron encima de las semillas cuidando que coincidieran todas las esquinas ahora de las 6 toallas.
- Se doblaron las toallas de la orilla inferior hacia arriba aproximadamente 1 centímetro y de izquierda a derecha también 1 centímetro, posterior a ello se hizo una especie de taco de izquierda a derecha sin presionar mucho y cuidando que el rollo final no estuviese muy apretado para con ello evitar que la germinación de nuestras semillas estuviese obstaculizada.
- Se colocaron todos los rollos en una incubadora a 25°C durante 7 días hasta su germinación.

### **Protocolo prueba de tetrazolio para viabilidad de semillas y vigor**

Para determinar la viabilidad de las semillas de maíz azul se realizó la prueba de tetrazolio cumpliendo con el siguiente protocolo:

- Previo análisis de pureza física, se descartaron frutos vanos, con daños por plagas y enfermedades, incompletos o en estado de descomposición.
- Se colocaron las semillas en cajas petri forradas con papel húmedo y se mantuvieron a 25 ° C durante la noche.
- Se realizó un corte longitudinal sobre el costado dorsal del fruto siguiendo el eje central con el fin de dejar expuesto el embrión.
- Se sumergieron los embriones cortados en solución acuosa de Cloruro 2, 3, 5 trifenilTetrazolio al 1%. (pH 6.5 y 7.0).
- Posteriormente se incubaron en oscuridad a 25 ° C durante 4 horas.
- Transcurrido el lapso de tiempo se decantó la solución y se lavaron los embriones con agua destilada para eliminar adherencias superficiales de la sal.
- Se sumergieron los ejes en 1 mL de dimetil celulosa durante 18 horas hasta que se completó la extracción del formazán de color rojo.
- Se evaluó la intensidad de color bajo los 16 casos de la clave de interpretación para la prueba de tetrazolio en maíz (Delouche *et al.*, 1971).
- Se decantó el extracto y se determinó la intensidad del color a 480 nm en un espectrofotómetro de 10 coloreados usando dimetil celulosa como blanco.
- Se cuantificaron los embriones viables y no viables según patrones topológicos establecidos. Los resultados se expresaron en porcentaje de semillas viables.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se detectaron varianzas significativas en el análisis de varianza para todas las variables de estudio, excepto para las variables de plántula normal y peso seco total (Cuadro 1). Es importante destacar que las semillas del híbrido y sus respectivos progenitores tuvieron valores similares en plántula normal y en peso seco total, eso nos indica que el grano está sano, es decir, cuanto más sano sea el grano, menor cantidad de impurezas, granos dañados o con presencia de cualquier enfermedad lograremos encontrar, y por consiguiente mayor será la proporción de lo extraído del maíz (harina).

**Cuadro 1 Cuadrados medios del análisis de varianza de las variables físicas bajo estudio**

Variable	Cuadrado medio
Peso hectolítrico (P100)	216.1 **
Plántula normal (PN)	139.6 ns
Plántula anormal (PA)	364.6 **
Semilla muerta (SM)	514.6 **
Longitud total (LT)	2132.3 *
Peso seco total (PST)	1330.2 ns
Absorbancia (ABS)	3.1 **
Viable (V)	400.0 **
No viable (NV)	400.00 **

\*,\*\* =Significativo( $P \leq 0.05$  y  $P \leq 0.01$ , respectivamente);ns =No significativo

La aptitud fisiológica es excelente ya que las semillas tienen un potencial germinativo muy alto. Se observa una cantidad de plántula normal muy parecida entre el híbrido y sus progenitores (Cuadro 2). Para la variable de semilla muerta el progenitor masculino obtuvo el primer nivel significativo, mientras que el progenitor femenino obtuvo el segundo nivel significativo, sin embargo al relacionar el híbrido con sus progenitores comparte tanto el primer nivel como el segundo nivel significativo sin tener relación alguna en sus niveles significativos ambos progenitores.

**Cuadro 2 Comparación de medias de las variables físicas de los genotipos L 11, L 12 y el híbrido L 11 x L 12**

<b>Genotipo</b>	<b>P100</b>	<b>PN</b>	<b>PA</b>	<b>SM</b>	<b>LT</b>	<b>PST</b>	<b>ABS</b>	<b>V</b>	<b>NV</b>
L 11	21.8 b	31.3 a	58.8 ab	10.0 ab	88.4 b	137.6 a	2.4 b	80 c	20 a
L 12	16.8 c	20.0 a	52.5 b	27.5 a	133.7 a	104.2 a	4.1 a	90 b	10 b
L 11 x L 12	31.2 a	22.5 a	71.3 a	6.3 b	103.3 ab	133.5 a	3.4 ab	100 a	0 c

Medias con la misma letra, en cada columna, son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

Los procesos fisiológicos de viabilidad (Cuadro 2) fueron muy altos en las semillas del híbrido, teniendo una actividad metabólica alta (alto vigor).

En la prueba de tinción con tetrazolio se detectaron algunas zonas en pocas semillas sin actividad metabólica distribuidas al azar en las estructuras del embrión, aunque en las semillas del híbrido L 11 x L 12 fueron nulas esas zonas (Figura 3). En cambio en la hembra L 11 y el macho L 12 (Figura 1 y Figura 2, respectivamente), muestran varias zonas sin actividad metabólica, es decir, aquellas zonas donde no se produjo el formazán, compuesto rojo insoluble que se produce al reducirse la solución de tetrazolio con los electrones del proceso respiratorio de las células activas al inicio de su hidratación (Moore y Goodsell, 1965).

El haber obtenido largas plántulas en nuestros 3 tratamientos, explicaría el resultado en la correlación entre longitud de total y absorbancia ( $r=0.7^{**}$ ), pues se tiene una estrecha relación entre ambas variables, ya que si se obtiene una alta absorbancia se puede afirmar que tenemos una viabilidad de las semillas, hipótesis comprobada con la germinación normal de las semillas y la longitud de radícula y plúmula.



**Cuadro 3 Coeficientes de correlación de las variables físicas bajo estudio**

Variables	P100	PN	PA	SM	LT	PST	ABS	V	NV
<b>P100</b>	1	-0.03 ns	0.7 **	-0.6 *	-0.3 ns	0.2 ns	-0.2 ns	0.6 *	-0.6 *
<b>PN</b>		1	-0.1 ns	-0.5 ns	-0.3 ns	0.7 **	-0.6 *	-0.4 ns	0.4 ns
<b>PA</b>			1	-0.8 **	-0.4 ns	0.2 ns	-0.02 ns	0.3 ns	-0.3 ns
<b>SM</b>				1	0.5 ns	-0.6 *	0.4 ns	0 ns	0 ns
<b>LT</b>					1	0.2 ns	0.7 **	0.3 ns	-0.3 ns
<b>PST</b>						1	-0.2 ns	0.07 ns	-0.07 ns
<b>ABS</b>							1	0.5 ns	-0.5 ns
<b>V</b>								1	-1.0 **
<b>NV</b>									1

\*,\*\* =Significativo( $P \leq 0.05$  y  $P \leq 0.01$ , respectivamente);ns =No significativo

## CONCLUSIONES

El híbrido L 11 x L 12 mostró en el análisis estadístico una tendencia a ser el genotipo con mayor vigor.

El genotipo femenino fue el que mostró mayor relación con el híbrido, de acuerdo a la comparación de medias de las variables evaluadas.

Los progenitores tienen los valores más bajos de viabilidad; mientras el valor más alto corresponde al híbrido, demostrando que en la cruce de dos líneas endogámicas se obtendrá un híbrido heterocigótico con mayores índices de crecimiento.

La variable absorbancia no tiene ninguna relación con la viabilidad debido a que no se realizaron las suficientes repeticiones y además la evaluación de correlación se realizó a los 3 genotipos en conjunto.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Aal, E-S y Hucl, P. 2003. Composition and stability of anthocyanin in blue-grained wheat. *J Agric. Food Chem.* 51:2174-2180.
- Anderson, J D (1973) Metabolic changes associated with senescence. *SeedSci. And Technol.* 1, 401- 406.
- Antonio, MM; Arellano, JL; García, G; Miranda, S; Mejía, JA; González, FV. 2004. Variedades criollas de maíz azul raza chalqueño. Características Agronómicas y Calidad de Semillas. *Revista Fitotecnia Mexicana* 27(1):9-15.
- Arellano V., J.L., C. Tut C., A.M. Ramírez, y. Salinas Moreno y O. R. Taboada Gaytán. 2003. Maíz azul de los valles altos de México. 1. Rendimiento de grano y caracteres agronómicos. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 26 (2): 101-107.
- Arellano V., J. L. 1. Rojas M., G. F. Gutiérrez H. 2014. Variedades de maíz azul Chalqueño seleccionadas por múltiples caracteres y estabilidad del rendimiento. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* Vol. 5 (18): 1469-1480.
- Beltrán, F, J., A. J. Bockholt and L. Rooney. 2001. Blue corn. In: *Speciality corns.* A. R. Hallauer ed. Iowa State University, Ames, Iowa, USA p. 293-337.
- Cruz G, F, V A González H, J Molina M y J M Vázquez R. (1995) Seed deterioration and respiration as related to DNA metabolism in germinating Maize. *Seed Sci. and Technol.* 23, 477-486.
- Delouche J C, T Wayne S, M Raspet, M Lienhard (1971) Prueba de viabilidad de semillas con tetrazol. CRAT, AID. Buenos Aires, Argentina. 256 p.
- Gutiérrez H, G F, M Ramírez M y E M. Fragoso P (2005) Simulación del deterioro en semillas de maíz. In extenso CIBIA V
- Guzmán-Maldonado, S. H. y Paredes-López, O. 1999. Funcional products of plant indigenous to Latin America: Amaranth, quinoa, common beans and botanical. In *Functional Foods: Biochemical & Processing Aspects.* G. Mazza (ed). Technomic Publishing Co. Inc. Lancaster PA., pp. 293-328.
- Hernández, JM; Esquivel, G. 2004. Rendimiento de grano y características agronómicas en germoplasma de maíz de valles altos de México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 27:27-31.
- Hernández–Uribe J P, E Agama–Acevedo, J J Islas-Hernández, J Tovar, L A Bello–Pérez (2007) Chemical composition and in vitro starch digestibility of pigmented corn tortilla. *J. Sci. Food Agric.* 87:2482–2487.

- Hollman, P. C. H, Hertog, M. G. L., Katan, M. G. 1996. Analysis and health effects of flavonoids *Food.Chem* 57:43-46.
- ISTA (International Seed Testing Association). 1995. Handbook of vigour test methods. 2 Ed. Zurich, Suiza. 117 p
- López H A (1995) Manual de Prácticas de Laboratorio de Producción y Tecnología de Semillas. Fitotecnia, UACH. Chapingo, México. 29.
- McDonald, M B (1999) Seed deterioration: physiology, repair, and assessment. *Seed Sci. and Technol.* 27, 177-237.
- Moore R P, S F Goodsell (1965) Tetrazolium test for predicting cold test performance of seed corn. *Agron. J.*1:489-491.
- Pedreschi R, L Cisneros-Zeballos (2006) Antimutagenic and antioxidant properties of phenolic fractions from Andean purple corn (*Zea mays* L.). *J. Agric. FoodChem.* 54:4557-4567.
- Reyes C. P. (1980) Bioestadística Aplicada: Agronomía, Biología, Química. Ed. Trillas, México, D. F. 213 p.
- Salinas–Moreno Y, J Soria-Ruiz, E Espinosa-T (2010) Aprovechamiento y distribución del maíz azul en el Estado de México. Folleto Técnico 42. Campo Experimental Valle de México. CIRCE INIFAP. Coatlinchán, México. 56 p.
- Salinas M., Y., M. Soto S., F. Martínez B. V. González H. y R. Ortega P. 1999. Análisis de antocianinas en maíces de grano azul y rojo provenientes de cuatro razas. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol 22:161-174.
- SAS, Statistic Analysis System (2002) SAS/STAT. Ver. 9. SAS Inst. Inc. Cary NC, USA.

## ANEXOS

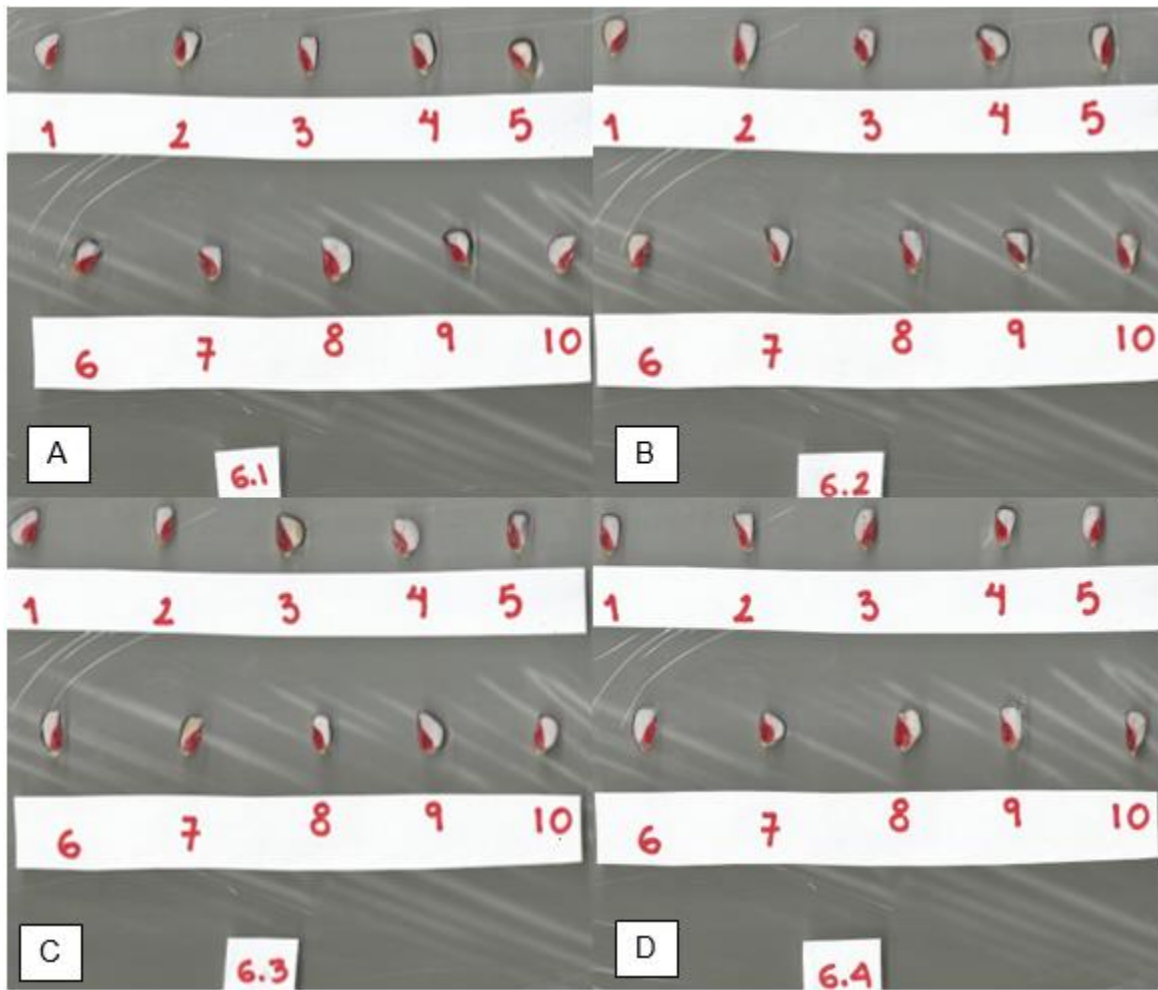


Figura 1 Prueba de viabilidad con tetrazolio del genotipo L 11.

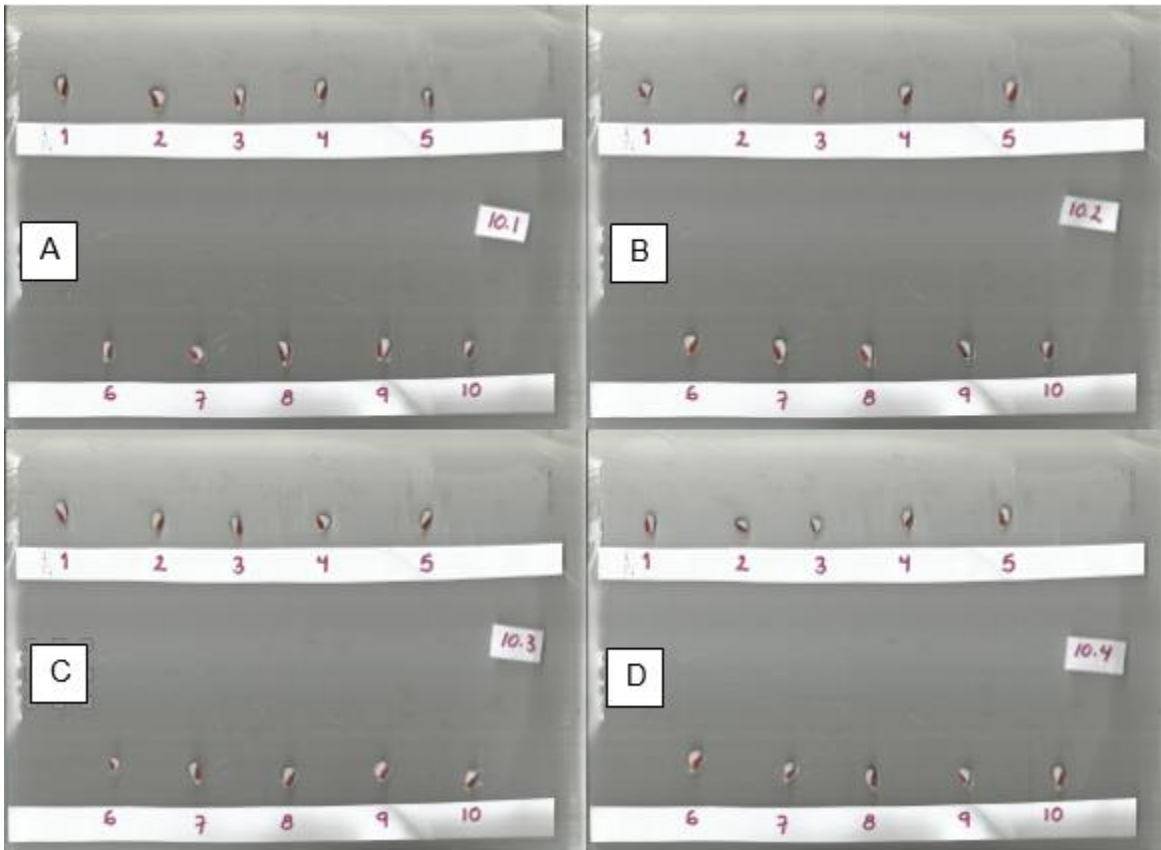


Figura 2 Prueba de viabilidad con tetrazolio del genotipo L 12.

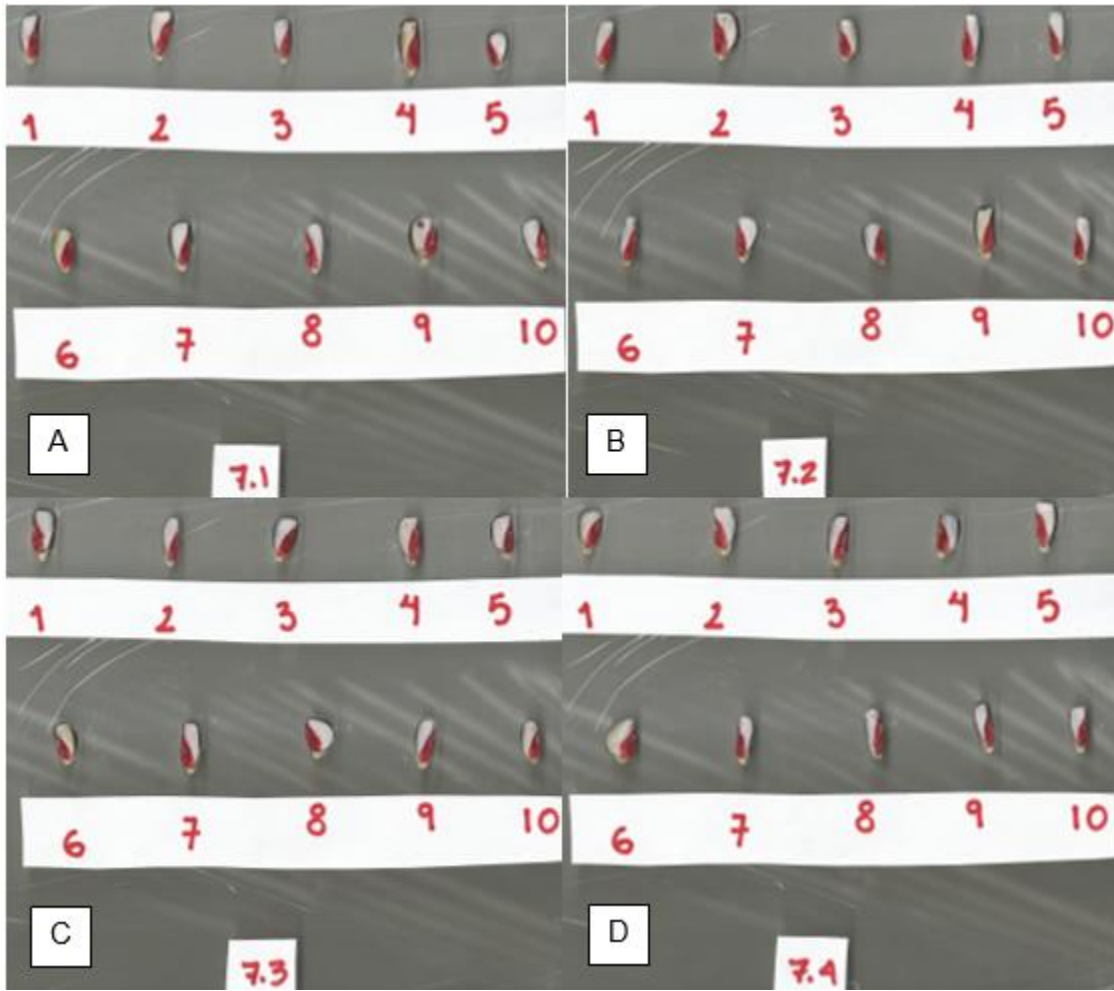


Figura 3 Prueba de viabilidad con tetrazolio del híbrido L 11 x L 12.

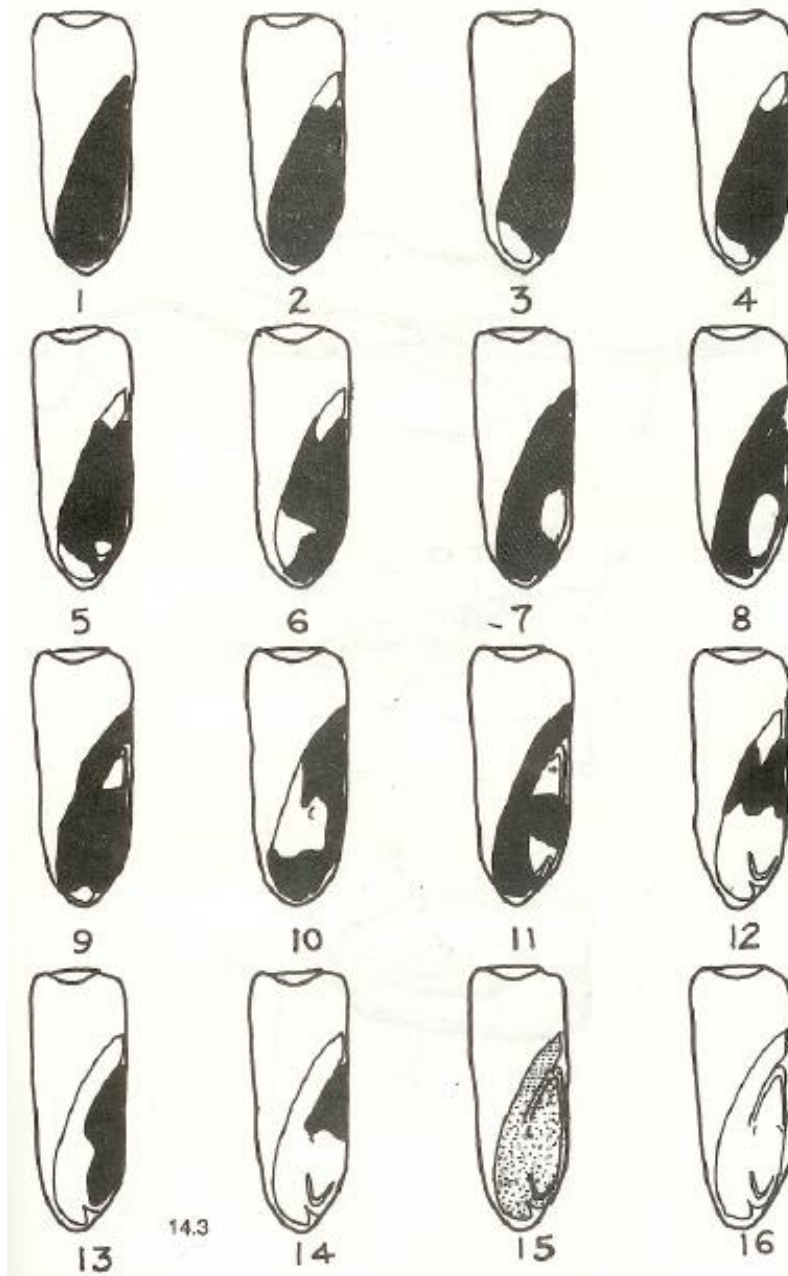


Figura 4 Clave de interpretación para la prueba de tetrazolio en maíz