

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

CORRELACION ENTRE METODOS DIFERENTES PARA SELECCION DE
MAICES CON GENE OPACO-2 Y ESTUDIO DE METODOLOGIA GENO-
TECNIA

4/56

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACO-BIOLOGO ORIEN
TACION: TECNOLOGIA DE ALIMEN-
TOS.

PRESENTA:

BEATRIZ VASQUEZ MORENO

MEXICO

1976



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Tesis
1974
FECHA
PREG

426



SINODALES

PRESIDENTE: Ninfa Guerrero De Callejas

VOCAL: Angela Sotelo López

SECRETARIO: Andrés Iruegas Evaristo

1^{er}. SUPLENTE: Magdalena Oliva González

2do. SUPLENTE: Fidel Figueroa Martínez

Lugar donde se desarrolló la Tesis: Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, INIA.

Director de Tesis: Angela Sotelo López

Nombre del Sustentante: Beatriz Vásquez Moreno

RECONOCIMIENTO

Manifiesto mi reconocimiento a los siguientes investigadores del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) del Departamento de Maíz y Sorgo.

Dr. Odón Miranda J.

MC. Gabriel Vega Z.

MC. Arturo Estrada Gómez

Ing. J. Sergio Oliveros G.

MC. Armando Valdez

Ing. Jose Luis Rodríguez Ontiveros

Ing. Luis Angel Muñoz

Ing. Eustacio Zerpa Figueroa

quienes trabajando en el Programa de Alta Calidad de Proteína (ACP), colaboraron en los procesos de incorporación del gene opaco-2 a las líneas básicas.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), por las facilidades para la realización de este trabajo.

A los Laboratorios de Cereales.

A Ma. del Carmen, Felipa, Bernardino y Ramón.

Y a todas aquellas personas que de una manera o de otra, colaboraron en la realización de la tarea que hoy se concluye.

DEDICATORIA

Agradeciéndole todo lo que hoy soy a mi madre.

A Memo.

A mis hermanos.

A Fernando.

A mi maestro: El Ing. M Sc y Ph. D. Andrés Iruegas Evaristo por
su valiosa ayuda en mi formación profesional.

CAPITULOS

OBJETIVO

GENERALIDADES

MATERIAL Y METODOS

RESULTADOS Y DISCUSION

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

OBJETIVO

El principal objetivo de este trabajo, es conocer el efecto del gene opaco-2, al ser introducido a las líneas básicas, en cuanto al contenido de proteína, triptófano, lisina y aminoácidos libres (AAL).

Lisina es uno de los aminoácidos esenciales que junto con triptofano, son limitantes en el maíz y que al incorporar el gene o₂, son incrementados . También se tiene un contenido mayor de AAL en el maíz opaco-2 que en el normal.

Considerando lo anterior se creyó conveniente hacer un estudio de las correlaciones existentes entre triptofano-lisina, AAL-lisina y AAL-triptofano. Con el objeto de evaluar al parámetro de AAL ya que en su evaluación se utiliza un método de fácil manejo, menor costo y tiempo en comparación con los métodos comunmente utilizados en lisina y triptófano. Se parte de la hipótesis de que existe una correlación alta y significativa entre AAL-lisina y AAL-triptófano, si se demostrara esta asociación tendríamos como resultado, un nuevo método que permitiría el manejo de gran cantidad de materiales para su identificación de calidad proteica en maíz.

GENERALIDADES

El problema nutricional en el mundo está relacionado principalmente con la falta de proteína. La eficiencia protéica a nivel nutricional está determinada por el contenido y balance de aquellos aminoácidos que son esenciales para la síntesis de tejidos, así como del mantenimiento del cuerpo. La proteína animal nutricionalmente es completa, es decir, de alto valor biológico, mientras que muchas proteínas vegetales son deficientes en uno o más aminoácidos esenciales. Los principales cereales de alimento humano cosechados en el mundo: trigo, arroz, maíz y sorgo; son deficientes en lisina y en otros aminoácidos esenciales.

El adecuado balance de aminoácidos en la proteína de estas fuentes alimenticias puede ser alcanzado por selección de alimentos vegetales que complementen los patrones de aminoácidos esenciales. Por ejemplo el frijol es rico en lisina y puede complementar la deficiencia de lisina de los cereales para proveer una dieta nutricionalmente mejorada. Desgraciadamente, la probabilidad de alcanzar un balance protéico a través de selección de alimentos vegetales es remoto en aquellos lugares en los cuales las deficiencias de la dieta diaria son en su mayoría agudas. Las limitaciones económicas, la escasez de conocimientos de los requerimientos nutricionales, las reglas para selección de alimentos y los patrones culturales ancestrales aferrados al consumo de fuentes alimenticias de bajo valor bio

lógico, hacen también difícil la posibilidad de mejorar la alimentación en las áreas que están grandemente necesitadas.

Pretender cambiar actitudes y hábitos es un propósito difícil y de largo alcance. Una forma de abordar el problema, consiste en mejorar la calidad de la proteína vegetal ya existente en un área determinada merced a cruzamientos y manipulación genética. Este último concepto ha merecido atención en relación al maíz, teniendo en cuenta que es un alimento de gran consumo en México, en donde anualmente se cultivan más de 9.5 millones* de toneladas de grano, de las cuales, aproximadamente, 6.8 se utilizan para la alimentación humana; siendo el consumo anual por habitante no menor de 146 a 150 kilogramos (4).

La gran participación del maíz, en la alimentación en México, se ve obstaculizada por el bajo valor biológico de la proteína del maíz. El principal factor limitante está constituido porque en el endospermo se localiza la prolamina zeína {fracción proteica soluble en (alcohol), de bajo contenido en los aminoácidos, lisina y triptofano (24). Esta fracción constituye el 50% de la proteína del endospermo, en donde se localiza del 80-85% de la proteína total del grano.

Varios intentos se hicieron para mejorar la calidad de proteína del maíz por medio de selección genética. Uno de estos intentos se

*Fuente de información: Departamento de Planeación, Dirección General de Agricultura, S.A.G.

inició en la Universidad de Illinois (1), en donde la proteína del maíz fue aumentada considerablemente (10.9-19.4%), pero el mejoramiento de la calidad nutricional del maíz no debe basarse solamente en aumentar el contenido de proteína, sobre todo si éste es alcanzado a costa de un balance de aminoácidos esenciales poco favorable (13). Así también el rendimiento no debe ser ignorado, por que la cantidad de proteína disponible para la alimentación esta determinada grandemente por la cantidad de grano que se produzca (31).

El descubrimiento de Mertz y sus colaboradores en 1963 (14), del gene opaco-2 (o_2) que cambiaba radicalmente las características bioquímicas del endospermo del maíz abrió las puertas en el mejoramiento del valor nutricional de la proteína de este cereal. Es irónico que el gene o_2 fue ra identificado hace mas de 40 años por Singleton y Jones (34), pero su efecto en el contenido de lisina permaneciera desconocido hasta 1964. Pero este gene comunica al grano de maíz un fenotipo harinoso opaco en lugar de aquel más comunmente observado en México de aspecto vitreo o duro. Desafortunadamente, no todos los genes que producen este fenotipo harinoso modifican la composición química de la proteína, solo el opaco-2 (o_2) el harinoso-2 (fl_2) y el opaco-7 (o_7) la modifica, (10, 19, 20, 22).

El gene o_2 , fl_2 y el o_7 afectan grandemente la proporción de los diferentes tipos de proteína que son sintetizados en el maíz normal, produciendo una reducción substancial en la síntesis de la fracción protéica soluble en solución alcohólica (prolamina-zeína); debido a és-

to aumentan tanto las proteínas solubles en agua y solución salina (albuminas y globulinas) como las solubles en álcali (glutelinas). (8, 12, 21, 32), por lo que se encuentra una proporción más alta de tales aminoácidos como lisina y triptofano, provenientes en su mayor parte de la fracción álcali soluble. Sin embargo aunque los genes fl₂ y o₇ produzcan un incremento similar en lisina y el fl₂ tenga mayor contenido de metionina y proteína total (22), el gene fl₂ y el o₇ son inconsistentes en su capacidad de aumentar el contenido de lisina, cuando se varía el genotipo a que se transfieren estos genes, esto puede ser debido a la interacción de estos genes (o₇, fl₂) con algunos otros genes ó factores genéticos que portan las diferentes líneas a las cuales se han incorporado. Por esta razón su utilización en programas de mejoramiento de proteína en maíz ha sido limitado (3, 10, 24).

El gene o₂ aunque incrementa la proporción de lisina y triptofano en la proteína, reduce a la vez el contenido total de la proteína (24), aumenta el contenido de aminoácidos libres (17, 29), reduce el peso y la densidad del grano en comparación con el maíz normal (23).

No es la intención de este trabajo discutir ampliamente los experimentos nutricionales con el maíz opaco-2, pero debe hacerse notar que al incrementar el gene o₂, las concentraciones de lisina y de triptofano los cuales son limitantes en el maíz normal y esenciales para el crecimiento de animales monogástricos, se ha mejorado la calidad protéica del maíz, como ha podido confirmarse en estudios realizados en animales monogástricos, en niños y adultos.

Los primeros estudios de evaluación biológica se obtuvieron con ratas obteniéndose 3.6 veces más el peso ganado con las dietas de maíz opaco que con las de maíz normal (15).

En cerdos, se encontró que la calidad del maíz opaco-2 utilizado como única fuente de proteína fue similar a la obtenida con la del maíz normal suplementado con harina de soya al mismo nivel de proteína y 50% más eficiente que con maíz normal (25).

En realidad, en grandes sectores de población de autoconsumo y de bajos ingresos económicos en México, prevalece una situación alimenticia de baja ingesta de proteína. Es por esto que la substitución de maíz comun por maíz opaco-2 en la dieta de esos sectores puede beneficiar en forma inmediata a sus consumidores. 2

Los resultados obtenidos en los experimentos efectuados con niños y adultos justifican lo anterior.

En el primer estudio, realizado por Bressani en el INCAP en Guatemala, se compararon leche y maíz opaco-2 desde el punto de vista nutricional. El maíz fue procesado para producir masa y elaborar tortillas en la forma convencional practicada en Guatemala. Se hicieron análisis químicos y pruebas biológicas con ambos alimentos, viéndose que en el proceso a que se somete el maíz los valores de calidad protéica no son alterados; el nitrógeno absorbido y retenido fue comparable para la dieta de leche y maíz opaco-2, estableciéndose que el valor protéico del maíz opaco equivale al 90% del valor biológico de la proteína de la leche (6, 7). 7

En Colombia los estudios nutricionales efectuados por Pradi-

lla y colaboradores, en niños severamente desnutridos a quienes se administró una dieta con 80% de proteínas de opaco-2 y 20% de otras fuentes, reportaron que su recuperación fue completa después del tratamiento (27). Posteriormente se estudió la recuperación en 7 niños desnutridos utilizando como única fuente de proteína aquella proveniente del endospermo del maíz opaco-2. El restablecimiento, fue muy similar a el de los niños nutridos con proteínas de origen animal (28).

Aún cuando las cualidades biológicas de la proteína del maíz opaco-2 son excelentes, la incorporación del gene o-2 a maíces adaptados de una latitud determinada no prospera agronómicamente en otras latitudes diferentes (26).

La forma más comun de superar esta limitación consiste en realizar cruzamientos de plantas adaptadas con otras que sean portadoras del gene o genes que interesan introducir. Este método llamado de cruce regresiva es el utilizado en la incorporación del gene o₂.

MATERIALES Y METODOS

Materiales

El Departamento de Maíz y Sorgo del Instituto Nacional de Ivestigaciones Agrícolas (INIA) se aboca a la formación de variedades mejoradas de maíz en las cuatro grandes regiones del del país: El Trópico Húmedo con altitudes de 0-1,200 metros sobre el nivel del mar (msnm) y alta precipitación y humedad ambiental; El Trópico Seco, con altitudes similares a la anterior con menor precipitación y humedad ambiental.

El Bajío y regiones similares con altitudes de 1,200-1,800 msnm; Valles Altos con altitudes de 2,000-2,600 msnm y algunas zonas de transición como la comprendida entre los 1,800 y 2,000 msnm.

El material utilizado en este estudio está formado por 15 líneas básicas (LB)* del programa del Centro de Investigaciones Agrícolas de El Bajío (CIAB), a las cuales se les incorporó el gene o₂, usando dos fuentes que son Celaya opaco-2 (C0) y Puebla opaco-2 (P0).

Las líneas básicas empleadas B₁, B₂, B₃, B₄, B₅, B₆, B₇, B₈, B₉, B₁₀, B₁₁, B₁₃, B_{1B}, B_{2B}, T₃.

* Con diferente número de autofecundaciones.

En cada línea se tiene la F_2 resultante de la cruce de las líneas básicas con las dos diferentes fuentes de opaco-2 (C0, P0) y cada una de éstas con cuatro niveles de retrocruza, como se ejemplifica a continuación con la línea básica B_1 .

$(B_1 \times C0)F_2$	$(B_1 \times P0)F_2$
$(B_1 \times C0)RC_1 F_2$	$(B_1 \times P0)RC_1 F_2$
$(B_1 \times C0)RC_2 F_2$	$(B_1 \times P0)RC_2 F_2$
$(B_1 \times C0)RC_3 F_2$	$(B_1 \times P0)RC_3 F_2$
$(B_1 \times C0)RC_4 F_2$	$(B_1 \times P0)RC_4 F_2$

El procedimiento utilizado para incorporación del gene o_2 , fue el de cruce regresiva, el cual se describe a continuación (2).

Método de Cruza Regresiva

Selección de los progenitores. El padre recurrente (A) es la línea básica**, con características agronómicas altamente deseables. El padre donante (B) se selecciona porque posee algún carácter en que A es deficiente, en este caso se trata del alto contenido de lisina y triptofano causado por el gene $ppaco-2$.

Se cruza A x B y la primera generación filial (F_1) así producida se

** Línea básica, implica: adaptada en la zona, con alta aptitud combinatoria general y alta aptitud combinatoria específica.

retrocruza con el padre recurrente A para tener la retrocruza uno (Ax³B)A.

Con las F₁ de esta primera retrocruza se efectúan cruzas fraternales $\overline{[(Ax^3B)Ax(Ax^3B)A]}$ para producir la segunda generación filial (F₂) de la primera retrocruza, donde se selecciona en grano por fenotipo opaco.

Las plantas seleccionadas con fenotipo opaco en la F₂ se cruzan con el padre recurrente A para tener la F₁ de la segunda retrocruza (A³x³B), las F₁ de esta segunda retrocruza se vuelven a cruzas fraternalmente $\overline{[(A^3x^3B)x(A^3x^3B)]}$ para producir otra vez la F₂ y seleccionar el grano por fenotipo opaco. Este procedimiento se repitió hasta obtener la F₂ de la cuarta retrocruza.

Este método, necesita para el caso de incorporar el gene o₂ de generaciones alternas de cruzas fraternales para permitir la identificación de los granos portadores del gene o₂. Esto es necesario por la condición recesiva del gene, que solo manifiesta su genotipo cuando se encuentra en forma homocigótica, es decir cuando el gene mutante, en el momento de la fecundación, haya estado presente tanto en el gameto femenino como en el gameto masculino (16).

Preparación de las muestras para el análisis del endospermo

Método

1.- Tomar al azar 2 muestras de 15 granos como representativas de cada línea en cada uno de sus diferentes niveles de retrocruza.

2. - Remojar las semillas en agua destilada. Eliminar con pinzas y bisturí el pericarpio y el germen, dejar secar al aire el endospermo durante la noche.

3. - Moler el endospermo, (molino pequeño de café)

4. - Desengrasar las muestras molidas, durante 6 horas con hexano, secar las muestras al aire y pulverizarlas.

Determinación de proteínas

El método empleado fue el micrométodo de Kjeldahl (5).

Fundamento

Se basa en la oxidación de la materia orgánica, en la fijación del nitrógeno en forma de sal $\overline{[\text{NH}_4(\text{HSO}_4)]}$ ó $\overline{[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]}$ su desprendimiento en forma de NH_3 y /o NH_4OH al agregarsele NaOH , el que va a ser fijado en el ácido bórico. Después su titulación con HCl 0, 02N.

Reactivos

H_2SO_4 Sp. gr. 1, 84 libre de nitrógeno.

Mezcla catalizadora la cual se prepara de la siguiente manera:

99.0 g de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, 4.1 g de HgO y 0.8 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Solución de hidróxido de sodio-tiosulfato de sodio (50% y 5% respectivamente).

Solución al 4% de ácido bórico.

Solución Indicadora. - Una parte de solución de rojo de metilo en etanol al 0. 2% con 5 partes de verde de bromocresol en etanol al 0. 2%.

Técnica

Se pesan de 30-40 mg de muestra en un matraz de digestión. Añadir 1.0 g de la mezcla catalizadora y 2 ml de ácido sulfúrico con centrado.

Digerir 40 minutos, enfriar y añadir la mínima cantidad de agua destilada para disolver los sólidos formados, enfriar. Transferir esta solución al aparato de destilación lavando el matraz de 5 a 6 veces con 1 - 2 ml de agua destilada. Poner un matraz erlenmeyer de 125 ml con 6 ml de solución de ácido bórico y 3 gotas de solución indicadora debajo del condensador, asegurando que la terminal de éste quede dentro de la solución.

Añadir al aparato de destilación 10 ml de solución de hidroxido de sodio-tiosulfato de sodio, y empezar la destilación hasta obtener 50 ml de destilado.

Titular con el ácido clorhídrico hasta obtener la formación del color gris o la primera aparición del color violeta. Efectuar la determinación de un blanco usando la misma cantidad de reactivos y el mismo proceso de digestión, destilación y titulación.

Cálculos

$$\% \text{ nitrógeno} = \frac{(\text{ml HCl en deter.} - \text{ml blanco}) \times N \times 14.007 \times 100}{\text{mg de muestra}}$$

$$\% \text{ proteína} = \% \text{ de nitrógeno} \times 6.25$$

en donde

N = Normalidad de HCl 0.02 N

Determinación de Triptofano

El método utilizado fue el método de Opienska-Blauth modificado por Hernández y Bates (11).

Fundamento

Se basa en una hidrólisis enzimática de las muestras con papaína, en la determinación colorimétrica de triptofano al reaccionar con FeCl_3 .

Reactivos

270 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ disueltos en 0.5 ml de agua destilada y diluido a 1 litro con ácido acético glacial (Reactivo A). Acido sulfúrico 30N. (reactivo B).

Mezclar los reactivos A y B (1:1 v/v), 1 a 2 horas antes de usarse. (Reactivo C).

Solución enzimática de papaína Merck (4mg/ml) en buffer de acetato de sodio 0.1 N y pH 7.

Solución estandar de triptofano (0.1 mg/ml) en solución enzimática de papaína (4 mg/ml) en buffer de acetato de sodio 0.1 y pH 7.

Procedimiento

Pesar entre 80 y 90 mg de muestra desengrasada y pulverizada en un tubo y añadir 3 ml de solución de papaína. Se tapan los tubos y se agitan (un tubo con unicamente solución de papaína es el blanco que se somete a todo el procedimiento).

Las muestras son incubadas a 65° C por 16 horas. Los hidrolizados se dejan enfriar a temperatura ambiente se centrifugan 5 min a 2,000 r. p. m. Se pipetea 1 ml del hidrolizado a un tubo de ensayo que contiene 4 ml del reactivo C. Se agita vigorosamente y se incuba a 65°C durante 15 minutos para que desarrolle el color. Dejar enfriar las soluciones coloreadas y transferirlas a tubos de colorímetro calibrados. Las lecturas se hacen en el fotocolorímetro (Bausch & Lomb Spectronic 20) a una longitud de onda de 545 nm.

Cálculos

$$\text{mg de Try} = (D. 0. \times m) + b$$

$$\% \text{ Try en muestra} = \frac{\text{mg Try}}{\text{mg de muestra}} \times 3 \times 100$$

$$\% \text{ try prot} = \frac{\% \text{ Try en muestra}}{\% \text{ proteína}} \times 100$$

Para los cálculos anteriores se preparó una curva estandar de la siguiente manera:

Curva estandar

Se pesan 50 mg de D-L triptofano y se aforan a 500 ml con solución enzimática de papaína (4 mg/ml) en buffer de acetato de sodio .1N y pH7. De esta solución que tiene una concentración de 0.1 mg/ml, se toman 1 ml, 2 ml, 2.5 ml, 3 ml hasta 4.5 ml y se lleva a un volúmen final de 10 ml con buffer de acetato de sodio 0.1 y pH 7. Las lecturas se hacen a 545 nm.

Con las cuales se calculan la m y b. La recta de aproximación por

mínimos cuadrados, de los valores:

$$X = \text{D.O.}$$

$$Y = \text{mg de triptofano}$$

se obtiene por medio de la ecuación:

$$Y = b + mX$$

donde las constantes "b" (intersección en Y) y "m" (pendiente de la recta)

se calculan por medio del sistema de ecuaciones (30):

$$m = \frac{(\sum XY) - \frac{(\sum X)(\sum Y)}{n}}{(\sum X^2) - \frac{(\sum X)^2}{n}} \quad \text{--- (1)}$$

$$b = \frac{(\sum Y) - m(\sum X)}{n} \quad \text{--- (2)}$$

Determinación de Lisina

En la actualidad, en los programas de mejoramiento de calidad proteica del maíz en México se usan principalmente dos parametros de la proteína, uno es por ciento de la proteína total, y el otro es porcentaje de triptofano en proteína, los cuales se utilizan como criterio de cantidad y calidad proteica respectivamente. Las razones para utilizar estos criterios, entre otras son su relativa facilidad de análisis por métodos rápidos de suficiente confiabilidad. En el caso de triptofano, en el endospermo del maíz su alta correlación positiva con el contenido de lisina permite usarlo para seleccionar indirectamente por contenido de lisina (9, 11).

Se volvió a estudiar la correlación de triptofano a lisina, para lo cual se seleccionaron 4 líneas básicas de las 15 que se tenían en estudio.

Las 4 líneas básicas seleccionadas fueron aquellas que presentaron mayor variabilidad, tanto en porcentaje de proteína como en el contenido de triptofano en proteína.

El método empleado para la determinación de lisina fue el de Tsai modificado por Villegas (33).

Fundamento

Se basa en una hidrólisis enzimática de las muestras con papaína, bloqueo de los grupos alfa-amino de los aminoácidos libres con cobre, la formación del ϵ - dinitropiridil-lisina (ϵ -DNPyr-lisina) al reaccionar el 2- cloro - 3,5 - dinitropiridina con el grupo epsilon amino de lisina. La absorción leída en 390 nm de el ϵ -DNPyr-lisina.

Reactivos

Solución enzimática de papaína Merck (4 mg/ml) en buffer de fosfatos 0.03 M, pH 7.4.

Buffer de carbonatos 0.5 M, pH9.

Buffer de tetraborato de sodio 0.05 M y pH 9.0.

Suspensión de fosfato cúprico. - Solución A; 2.8 g de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml de agua destilada. Solución B: 13.6 g de $\text{Na}_3\text{P}_0_4 \cdot 12\text{-H}_2\text{O}$ en 200 ml de agua destilada. Mezclar A en B con agitación, centrifugar, tirar el sobrenadante y el precipitado resuspenderlo 3 veces en 15 ml de

buffer de tetraborato de sodio pH 9, centrifugar después de cada suspensión, después del tercer lavado resuspender el fosfato cúprico en 80 ml de buffer de tetraborato de sodio. El reactivo puede ser usado por una semana.

Solución de ácido clorhídrico 1.2 N.

Mezcla de aminoácidos: cada uno de los siguientes aminoácidos fue adquirido de Nutritional Biochemical Corporation.

Cistina	20 mg	Fenilalanina	40 mg
Metionina	20 mg	Valina	40 mg
Histidina	30 mg	Arginina	50 mg
Alanina	30 mg	Serina	50 mg
Isoleusina	30 mg	Acido Aspartico	60 mg
Treonina	30 mg	Acido Glutámico	300 mg
Tirosina	30 mg	Leucina	80 mg
Glicina	40 mg	Prolina	80 mg

pesar 100 mg de la mezcla de aminoácidos y disolverla en 10 ml de buffer de carbonatos (Sol. de aminoácidos).

Solución estandar de lisina (L-lisina HCl de NBC) 2500 ug/ml. en solución de buffer de carbonatos.

Solución de 2-cloro-3, 5-dinitropiridina (NBC): 30 mg de 2-cloro-3, 5-dinitropiridina por ml de metanol.

Procedimiento

Pesar 100 mg de muestra desengrasada y pulverizada en un tubo de ensaye y adicionar 5 ml de solución enzimática de papaína. Asegurandose de que la muestra esté completamente mojada y agitar 2 veces durante la primera hora de incubación. Preparar blanco con solución de papaína.

Incubar a 65° C durante 16 horas. Agitar y enfriar a temperatura ambiente y centrifugar.

Pipetear una alicuota de 1 ml del sobrenadante en un tubo de centrífuga y añadir 0.5 ml de solución buffer de carbonatos y 0.5 ml de suspensión de fosfato cúprico.

Agitar durante 5 minutos y centrifugar a 2,000 rpm.

Pipetear una alicuota de 1 ml del sobrenadante en un tubo de ensayo y añadir 0.1 ml de solución de 2-cloro-3,5-dinitropiridina. Agitar vigorosamente.

Dejar los tubos durante dos horas a temperatura ambiente agitando cada 30 minutos.

Añadir 5 ml de HCl - 1.2 N. a cada tubo y agitar.

Añadir 5 ml de acetato de etilo. Tapar los tubos mezclar invirtiendo los tubos 10 veces, extraer la fase superior con una jeringa que tenga adaptado un tubo de polietileno. Este paso debe repetirse 3 veces.

Transferir la fase acuosa a tubos de colorímetro calibrados.
Leer en el fotocolorímetro ("Spectronic 20") a una longitud de onda de 390 nm contra el blanco.

Cálculos

$$\text{mg de Lys} = (\text{D.O.} \times m) + b$$

$$\% \text{ Lys en muestra} = \text{mg Lys} / \text{mg muestra} \times 5 \times 100$$

$$\% \text{ Lys en proteína} = \% \text{ Lys en muestra} / \% \text{ proteína} \times 100$$

en donde: m (pendiente), b (ordenada al origen) fueron calculadas de las ecuaciones 1 y 2.

Para el cálculo de las constantes m y b se preparó una curva estandar de la siguiente manera.

Curva estandar

De la solución estandar de lisina que tiene 2500 ug/ml se toman 0, 1, 2, 3 y 4 ml y se lleva a un volúmen final de 10 ml con buffer de carbonatos.

Tomar 1 ml de c/u de los tubos anteriores pasarlos a otro tubo,

adicionar 4 ml de solución de papaína (450 mg en 45 ml de buffer de fosfatos).

Tomar 1 ml de la solución de cada uno de los tubos anteriores y agregar .5 ml de la solución de aminoácidos y .5 ml de la solución de $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$, agitar vigorosamente durante 5 minutos y centrifugar a 3500 r. p. m.

Pipetear 1 ml del sobrenadante y agregar 0.1 de la solución de 2-cloro-3,5-dinitropiridina, dejar los tubos a temperatura ambiente agitando cada media hora, continuar con el procedimiento seguido para las muestras.

Determinación de aminoácidos libres

El método empleado para la determinación de aminoácidos libres (AAL) fue el método empleado por Mertz (18), con algunas modificaciones.

Fundamentos

Se basa en la extracción de los aminoácidos libres de las muestras con agua y la determinación colorimétrica de estos al reaccionar con ninhidrina.

Reactivos

Disolver 400 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en 250 ml de buffer de citrato de sodio 0.2 M, pH 5 (reactivo A).

Disolver 10 g de ninhidrina (N. B. C.) en 250 ml de metilcellosolve (Reactivo B).

Mezclar los reactivos A y B en el momento de usarse, (Reactivo C).

Solución de N-propanol al 50%

Solución estandar de Leucina .002 M.

Procedimiento

Pesar 50 mg de muestra finamente molida (utilizando una malla del número 40) en un tubo de ensayo y adicionar 5 ml de agua destilada.

Agitar las muestras durante cinco minutos, centrifugar. Preparar blanco únicamente con agua.

Pipetear una alicuota de 0.2 ml a un tubo de ensayo, adicionar 1 ml del reactivo C.

Poner los tubos en baño maría a ebullición durante 3 minutos, dejar enfriar las soluciones coloreadas a temperatura ambiente y adicionar 4 ml de N-propanol al 50%, agitar los tubos invirtiendolos 5 veces.

Transferir a tubos de colorimetro calibrados. Las lecturas se hacen en el fotocolorimetro a una longitud de onda de 570 nm.

Curva estandar

Se pesan 0.2624 g de leucina se afora a 1 lt con agua destilada, de esta solución se toman alicuotas de 0.5 ml, 1 ml, 1.5 ml, 2 ml y 3 ml y se llevan a un volúmen de 10 ml con agua destilada, de cada una de estas soluciones se pipetea 0.2 ml, añadir 1 ml del reactivo C, agitar y transferir a tubos calibrados, las lecturas se hacen

a 570 nm.

Cálculos

Microequivalentes de Leucina = (D. 0. x m) + b

% Microequivalentes de Leucina en muestra =

$$= \frac{\text{Microequivalentes de leucina} \times 25}{.050} \times 100$$

$$\% \text{AAL/Prot} = \frac{\% \text{AAL en muestra}}{\% \text{proteína}} \times 100$$

En donde:

m = pendiente y b = ordenada al origen; se calculan de las ecuaciones 1 y 2 respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSION

a) Contenido de proteína

El efecto del gene opaco-2 sobre el contenido de proteína en el endospermo se puede observar en el cuadro 1. Los valores presentados de desviación estandar, demuestran una amplia variabilidad para este caracter, tanto para líneas normales como para sus versiones Celaya opaco-2 (CO) y Puebla opaco-2 (PO). Estos materiales segregantes provienen de la F_2 de la cruce de la línea básica con la fuente de opaco-2 y sus correspondientes niveles de retrocruza (C0RC₁, C0RC₂, C0RC₃, C0RC₄), (P0 RC₁, P0 RC₂, P0 RC₃, P0 RC₄).

Las dos fuentes del gene o_2 redujeron el contenido de proteína total de las líneas básicas. En las progenies segregantes de la cruce de las líneas básicas con el CO hay mayor variabilidad en el contenido de por ciento de proteína. En las líneas con el PO, al ser incorporado en gene o_2 , se encuentra menor contenido de proteína que en el CO.

En los valores obtenidos en desviación estandar, se observa que ha medida que se aumentan los niveles de retrocruza hay una tendencia a aumentar la variabilidad en el contenido del por ciento de proteína para ambas fuentes de opaco-2. Sin embargo la media de contenidos del por ciento de proteína obtenida con relación a las líneas básicas no demuestran diferencia significativa entre los cuatro niveles de retrocruza de los dos casos.

Cuadro 1. Contenido de proteína en endospermo en promedio de 15 líneas básicas (N) y sus versiones Celaya opaco-2* (CO), Puebla opaco-2* (PO) y cada una de estas con cuatro niveles de retrocruza (RC₁, RC₂, RC₃, RC₄).

Líneas	% proteína \bar{x} a	sx ^b	% proteína ^c
(N x CO)F ₂	8.58	.73	91.76
(N x PO)F ₂	8.12	.69	86.84
Normales	9.35	.76	100.00
(N x CO)F ₂ RC ₁	8.45	.90	90.38
(N x CO)F ₂ RC ₂	8.21	.76	87.81
(N x CO)F ₂ RC ₃	7.88	.92	84.28
(N x CO)F ₂ RC ₄	7.97	1.04	85.24
(N x PO)F ₂ RC ₁	8.06	.68	86.21
(N x PO)F ₂ RC ₂	8.15	.63	87.17
(N x PO)F ₂ RC ₃	7.64	.85	81.71
(N x PO)F ₂ RC ₄	8.09	1.20	86.53

* Líneas producto de la segregación en F₂ de la cruce de la línea básica con la fuente de opaco-2 (CO ó PO)

a Media (\bar{x}) de % proteína en 15 líneas.

b Desviación estandar (Sx) de % de proteína.

c Porcentaje de proteína expresado en relación al contenido de proteína de las 15 líneas normales.

b) Contenido de triptofano en proteína.

El efecto del gene opaco-2 sobre el contenido de triptofano en proteína se puede observar en el cuadro 2.

En general hay un incremento de triptofano no menor de 2.9 veces en todas las líneas tanto en las versiones Celaya opaco-2 como en el Puebla opaco-2.

Por las desviaciones estandar presentadas puede decirse que hay una amplia variabilidad debida posiblemente al plasma germinal o debida al contenido de proteína.

Puede también observarse que el C0 presenta una variabilidad mayor que el P0.

Los valores obtenidos para las medias del contenido de triptofano en proteína, demuestran que el incremento producido en este parametro por el gene o2 no es afectado al avanzar en los diferentes niveles de retrocruza, sin importar la fuente de opaco-2 utilizada.

c) Contenido de lisina en proteína

El efecto del gene opaco-2 sobre el contenido de lisina en proteína se observa en el cuadro 3.

Existe una relación aproximada de 1:4 de triptofano: lisina en general en todas las líneas con cualesquiera de las fuentes de opaco-2.

Las desviaciones estándar muestran que hay una amplia variabilidad debida posiblemente a diversidad genética, o debida al muestreo en el campo y a diversidad ambiental.

Cuadro 2. Contenido de triptofano en proteína del endospermo en promedio de 15 líneas básicas (N) y sus versiones Celaya opaco-2* (C0) y Puebla opaco-2* (P0) y cada una de estas con cuatro niveles de retrocruza (RC₁, RC₂, RC₃, RC₄).

Líneas	Trip/prot x a	Sx ^b	% de Trip / Prot. ^c
(N x C0)F ₂	1.01	.11	327.92
(N x P0)F ₂	.92	.11	299.67
Normales	.31	.07	100
(N x C0)F ₂ RC ₁	.95	.21	307.79
(N x C0)F ₂ RC ₂	.94	.26	305.80
(N x C0)F ₂ RC ₃	.96	.20	312.66
(N x C0)F ₂ RC ₄	.96	.30	310.39
(N x P0)F ₂ RC ₁	.90	.19	293.83
(N x P0)F ₂ RC ₂	.94	.16	303.89
(N x P0)F ₂ RC ₃	1.01	.24	329.22
(N x P0)F ₂ RC ₄	.92	.19	298.70

* Líneas producto de la segregación en F₂ de la cruce de la línea básica con la fuente de opaco-2 (C0 ó P0)

a = Media del % de triptofano en proteína.

b = Desviación estandar del % de triptofano en proteína.

c = Porcentaje incrementado de triptofano en proteína al ser incorporado el gene opaco-2, tomando como cien por ciento a las 15 líneas básicas.

La variabilidad en el contenido de lisina en proteína es más o menos semejante en el C0 y en el P0.

Se observa que no existen valores bajos de lisina en proteína que correspondan a valores altos de triptofano en proteína aún cuando exista una gran variabilidad para este caracter.

d) Contenido de aminoácidos libres en proteína (AAL)

En el cuadro 3 puede observarse, que hay una mayor cantidad de AAL en los maíces con el gene opaco-2 que en los normales. Lo cual está de acuerdo con lo reportado en la literatura (17, 29). Existiendo para todas las familias una amplia variabilidad en las desviaciones estandar (Sx^h) por lo cual no se puede precisar la cantidad que exista de AAL en los maíces opacos.

La variabilidad observada es debida posiblemente a diversidad genética, ambiental o a muestreo en el campo.

Cuadro 3. Contenido de triptofano, lisina y equivalentes de aminoácidos libres expresados en microequivalentes de leucina (AAL), cada valor es el promedio de la cruce de 4 líneas básicas (N) con Celaya opaco-2* (C0) y Puebla opaco-2* (P0) y cuatro niveles de retrocruza (RC₁, RC₂, RC₃, RC₄) hacia la línea normal.

Líneas	Try/prot \bar{X} ^a	Sx ^b	% Try de normales ^c	Lys/Prot \bar{X} ^d	Sx ^e	% Lys de normales ^f	AAL/prot \bar{X} ^g	Sx ^h	%AAL de normales ⁱ
(N x C0)F ₂	.97	.04	323	3.60	.43	178	31.83	8.34	485.95
(N x P0)F ₂	.96	.10	320	3.55	.42	176	45.61	12.79	696.18
Normales	.30	.05	100	2.02	.32	100	6.55	1.81	100.00
(N x C0)F ₂ RC ₁	.93	.11	310	3.67	.39	182	34.54	5.88	527.32
(N x C0)F ₂ RC ₂	.97	.23	323	3.85	.44	190	31.49	10.11	480.60
(N x C0)F ₂ RC ₃	.78	.15	257	3.51	.93	174	23.71	14.79	361.98
(N x C0)F ₂ RC ₄	.84	.30	280	3.15	.56	156	27.95	19.75	426.56
(N x P0)F ₂ RC ₁	.88	.22	293	3.53	.26	175	39.98	6.04	610.38
(N x P0)F ₂ RC ₂	.86	.19	287	3.31	.58	164	22.07	11.05	336.79
(N x P0)F ₂ RC ₃	.76	.26	253	3.15	.69	156	18.68	7.80	285.19
(N x P0)F ₂ RC ₄	.86	.09	287	3.78	.27	187	30.55	7.80	466.25

* Líneas producto de la segregación en F₂ de la cruce de la líneas básica con la fuente de opaco-2 (C0, P0) seleccionadas por fenotipo opaco.

- a = Media promedio (22 observaciones) del contenido de Try/Prot.
- b = Desviación estandar (Sx) del contenido de Try/Prot.
- c = Porciento de triptofano en proteína incrementando al ser incorporado el gene opaco-2 tomando como 100% a las líneas normales.
- d = Media promedio (22 observaciones) del contenido de Lys/Prot.
- e = Desviación estandar del contenido de Lys / prot.
- f = Porciento incrementado de lisina, en comparación con los normales.
- g = Media promedio del contenido de aminoácidos libres (AAL) expresados como micromoles equivalentes de leucina en proteína (22 observaciones).
- h = Desviación estandar del contenido de AAL/Prot.
- i = Porciento incrementado de AAL, en comparación con los normales.

d) Estudio de correlaciones

En el cuadro 4 pueden observarse las correlaciones para cada una de las fuentes de opaco-2 (C0, P0) con las diferentes líneas básicas.

Correlación triptofano-lisina (r_{T-L})

En general las correlaciones obtenidas son altas y en su mayoría significativas, variando de $r_{T-L} = 0.74-0.94^*$

Sin embargo, al obtener la correlación general para las 4 líneas básicas cada una de éstas con dos fuentes de opaco-2 y sus diferentes niveles de retrocruza, el valor de la asociación es reducido a 0.71 (altamente significativo).

Por lo que, existe la posibilidad aún cuando en el presente trabajo se haya incluido una amplia variabilidad genética, de llegar a tener correlaciones bajas cuando se tenga mayor diversidad de germoplasma.

Correlación AAL-triptofano (r_{AAL-T}) y AAL-lisina (r_{AAL-L})

Las correlaciones (r) observadas en forma separada para cada una de las líneas básicas con la fuente C0 son altas; presentándose una variabilidad mayor para $r_{AAL-L} = 0.75 - 0.91$ en donde algunas r_{AAL-L} no son significativas al compararlas con los valores de $r_{AAL-T} = 0.82-0.99$ en donde hay una menor variabilidad, siendo todas las r_{AAL-T} significativas y de valores más altos.

Para el P0 se observa una amplia variabilidad. Tanto para $r_{AAL-L} = 0.47-0.87$ como para $r_{AAL-T} = 0.25-0.92^*$

Cuadro 4. Correlaciones (r) triptofano a lisina (r_{T-L}), aminoácidos libres a lisina (r_{AAL-L}) y aminoácidos libres a triptofano (r_{AAL-T}), obtenidas de 4 líneas básicas con las versiones Celaya opaco-2, Puebla opaco-2 y cada una de éstas, con cuatro niveles de retrocruza.

Líneas	Observaciones	r_{T-L}	r_{AAL-L}	r_{AAL-T}
B ₈ x C0	6	0.893*	0.752	0.842*
B ₉ x C0	6	0.783	0.858*	0.969**
B ₁₀ x C0	6	0.897*	0.913*	0.824*
T ₃ x C0	6	0.751	0.762	0.839*
B ₈ x P0	6	0.943**	0.474	0.258
B ₉ x P0	6	0.813**	0.579	0.814*
B ₁₀ x P0	6	0.886*	0.761	0.920*
T ₃ x P0	6	0.742	0.874*	0.919*
Correlación Gral	44	0.711**	0.586**	0.657**

* Correlación significativa a un nivel de probabilidad comprendido entre 0.05 - 0.01

** Correlación altamente significativa a un nivel de probabilidad menor de 0.01.

Las correlaciones generales considerando las 4 líneas básicas; cada una de estas con las dos fuentes de opaco-2 y sus diferentes niveles de retrocruza, son de valor bajo r_{AAL-L} 0.58 y r_{AAL-T} 0.65 (altamente significativos). Puede decirse al observar las correlaciones de cada una de las líneas con el P0, que el efecto del gene o_2 de incrementar el contenido de AAL es dependiente de la fuente de opaco-2 que se utilice para incorporar este carácter.

Al igual que para el caso de la correlación r_{T-L} , existe la posibilidad de llegar a tener correlaciones bajas, que ya en estos materiales pueden observarse, debidas a la diversidad genética, fuente de opaco-2 y muestreo en el campo, ya que las muestras donde se presentaron la mayoría de los valores bajos de AAL contenían cantidades variables de granos con fenotipo de normales.

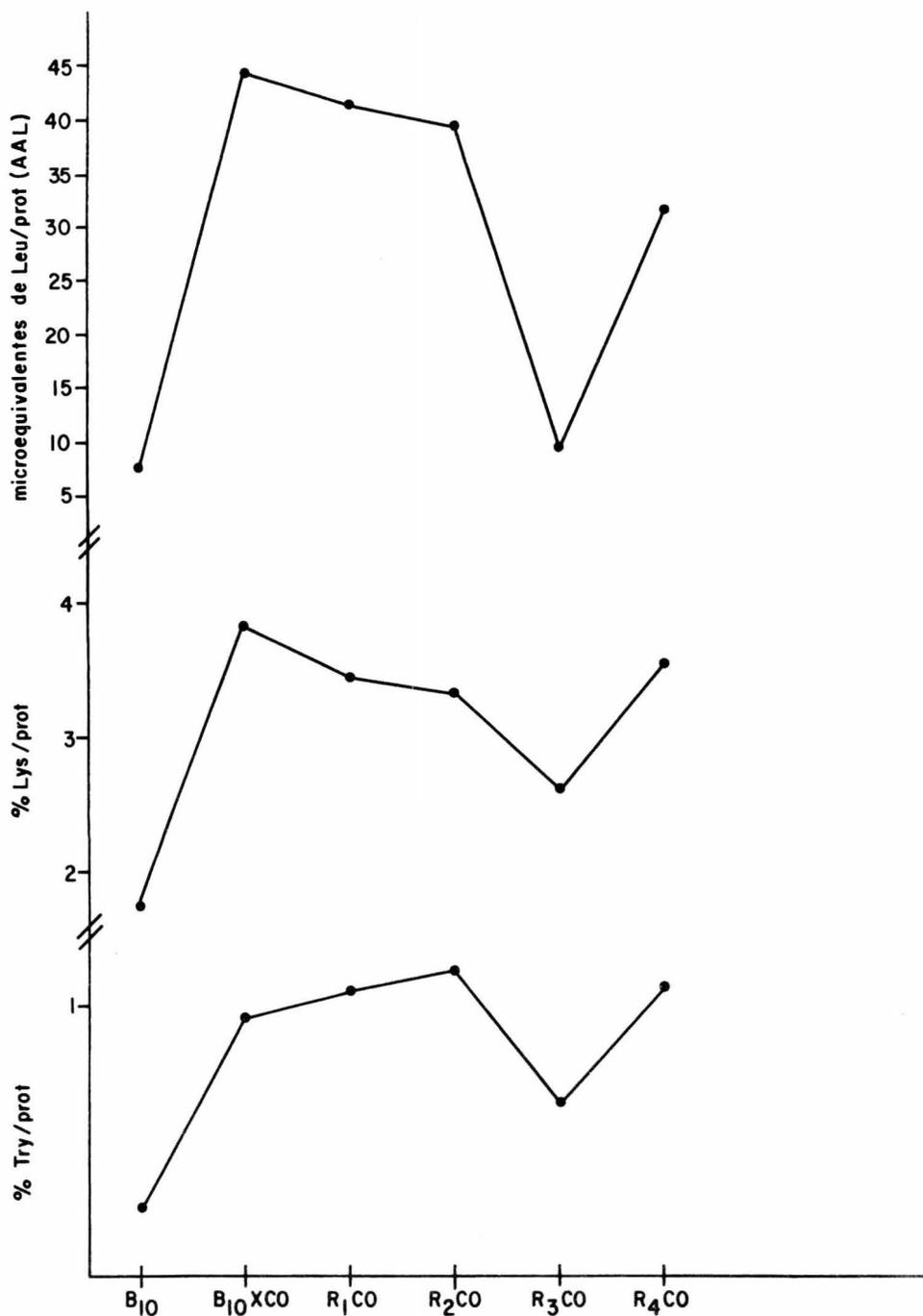
Una mejor explicación a los valores bajos de correlación de AAL-lisina y de AAL-triptofano, puede tenerse al observar las gráficas 1-8 donde se graficaron los valores obtenidos en los parámetros lisina, triptofano y AAL, para cada una de las líneas básicas con sus diferentes niveles de retrocruza con ambas versiones de opaco-2 (C0, P0).

Los valores obtenidos por el método de AAL al igual que el de lisina y triptofano detecta las características de los maíces con el gene opaco-2 de los normales (gráficas 1, 2, 3, 4, 5, 8). Además se puede ver en las gráficas 4 y 5 en los puntos (R_2 P0 y R_3 C0) respectivamente que el método de AAL puede detectar valores bajos de lisina en proteína, que correspondieron a valores comprendidos

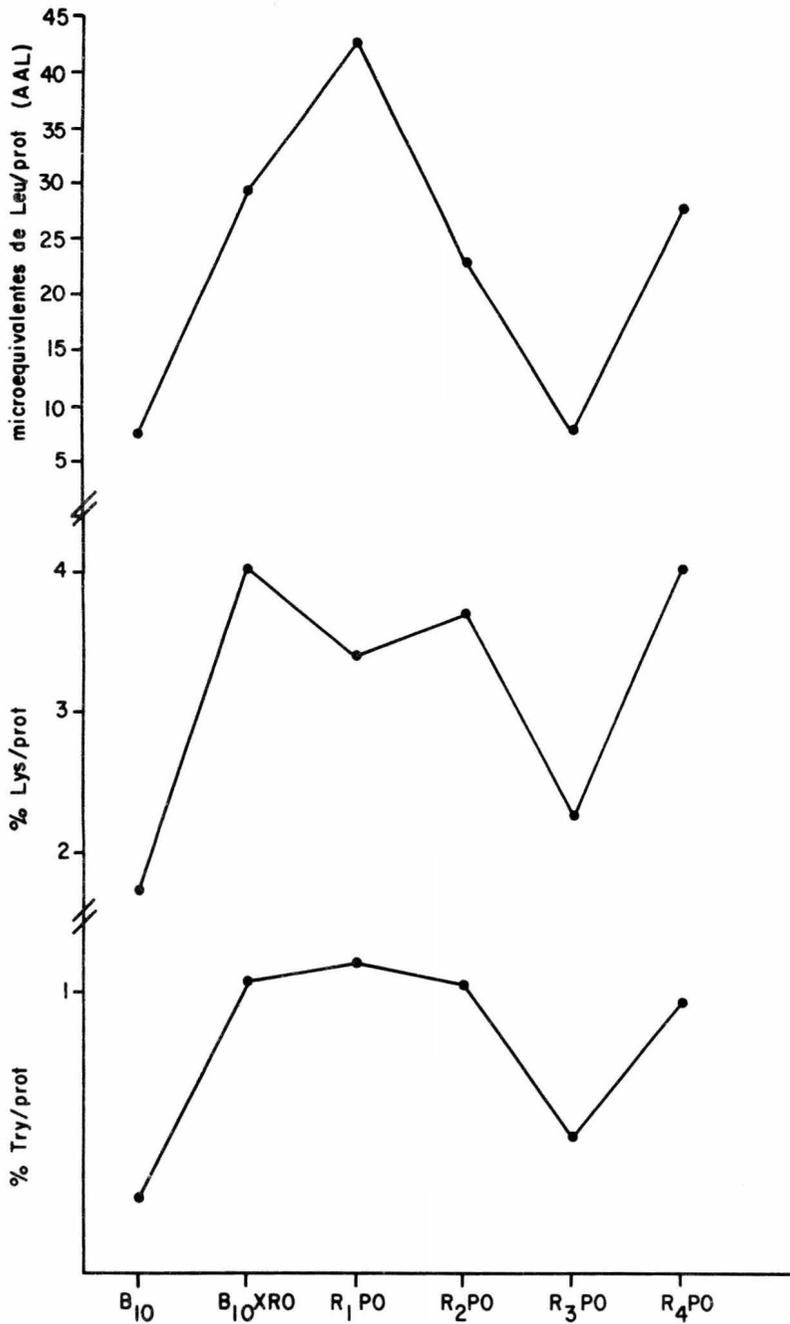
entre 0.55-0.64 de triptofano en proteína, dichos valores se consideran altos para maíces normales, en donde gradualmente varían de 0.30-0.51, pero que también son encontrados en maíces con fenotipo opaco de genotipo normal. Estos valores son dudosos al seleccionar por triptofano y sólo se puede diferenciar si tienen el gene o_2 determinando lisina.

En la gráfica 6 en los puntos ($R_2 P0$) y ($R_3 P0$), puede observarse que existen valores de AAL, que son bajos para los correspondientes a lisina y triptofano, en comparación con los observados en las otras gráficas. Estos valores aún cuando son ligeramente mayores a los de las gráficas 4, en el punto ($R_2 P0$) y 5 en el punto ($R_3 C0$) y a los encontrados generalmente en los maíces normales son poco frecuentes en los maíces con el gene opaco-2.

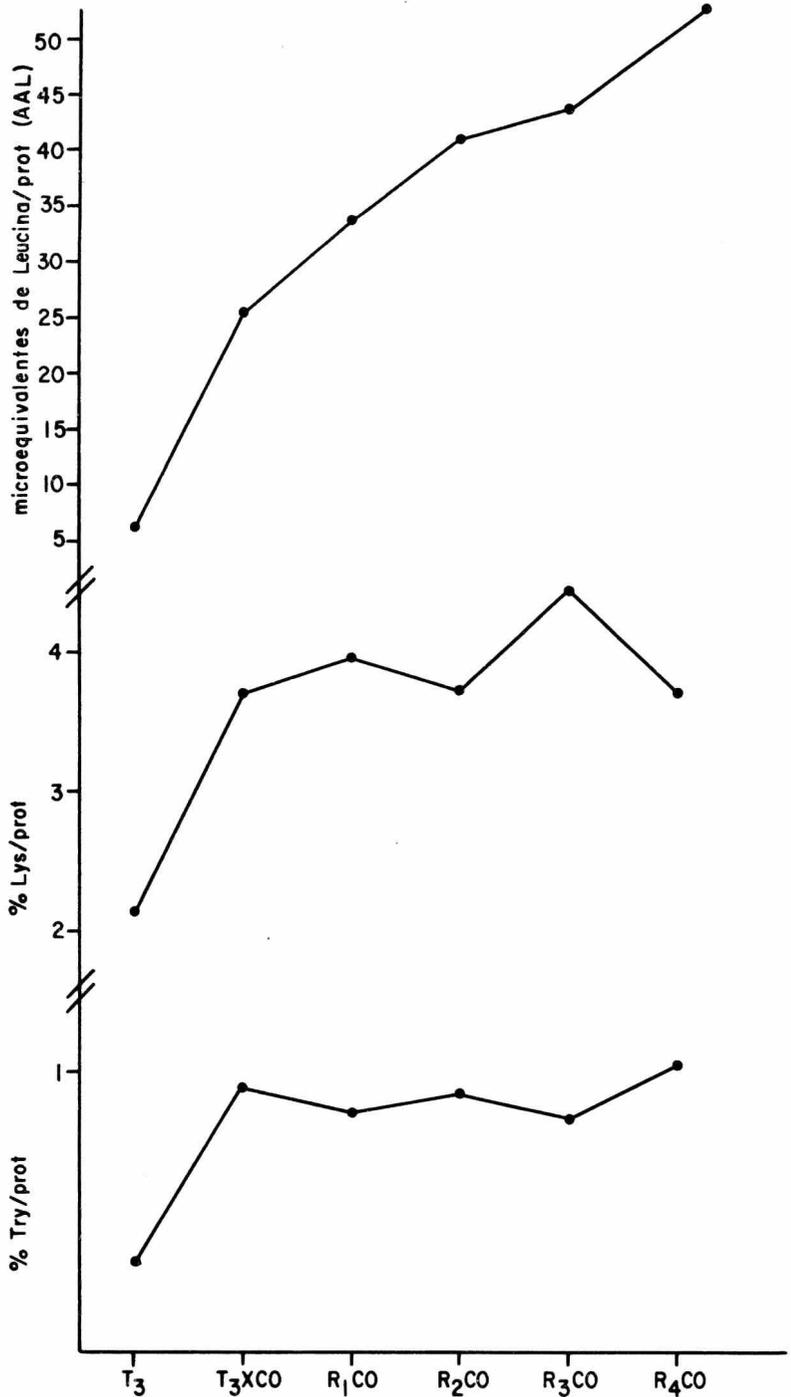
En forma contraria a lo observado en la gráfica 6, en la gráfica 7 en el punto ($R_4 C0$) se tiene un valor de AAL mayor a los encontrados en los maíces normales, correspondiente a valores bajos de lisina y triptofano, pero aún así no alcanza los valores reportados para las líneas con el gene opaco-2.



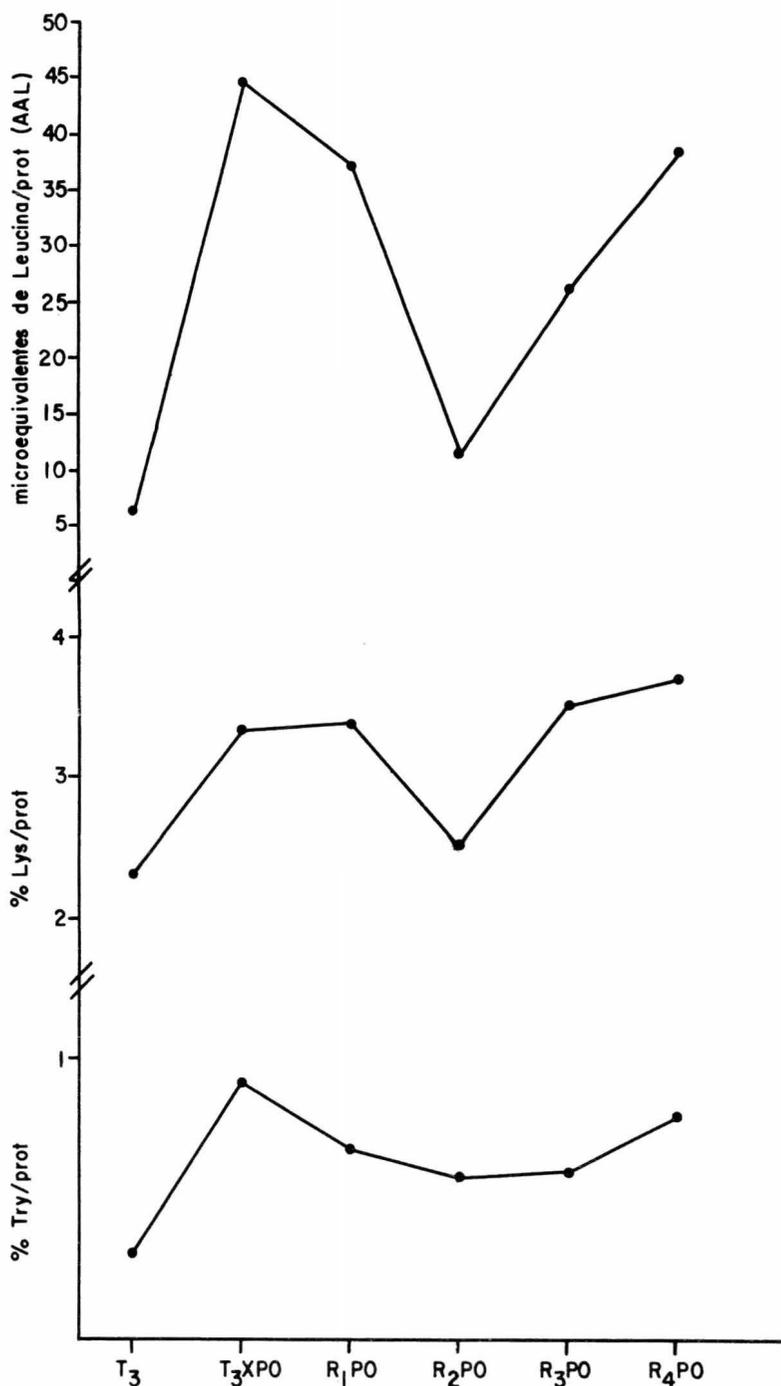
Gráfica 1. - Contenido de aminoácidos libres (AAL) expresado en microequivalentes de leucina en proteína, lisina en proteína y triptofano en proteína del endospermo de la línea básica original B₁₀, de su F₂ seleccionada por fenotipo opaco, de la primera cruce con el Celaya opaco-2 (B₁₀xCO), así como las F₂ seleccionadas por fenotipo opaco de sus cuatro cruces regresivas. (RC₁, RC₂, RC₃, RC₄).



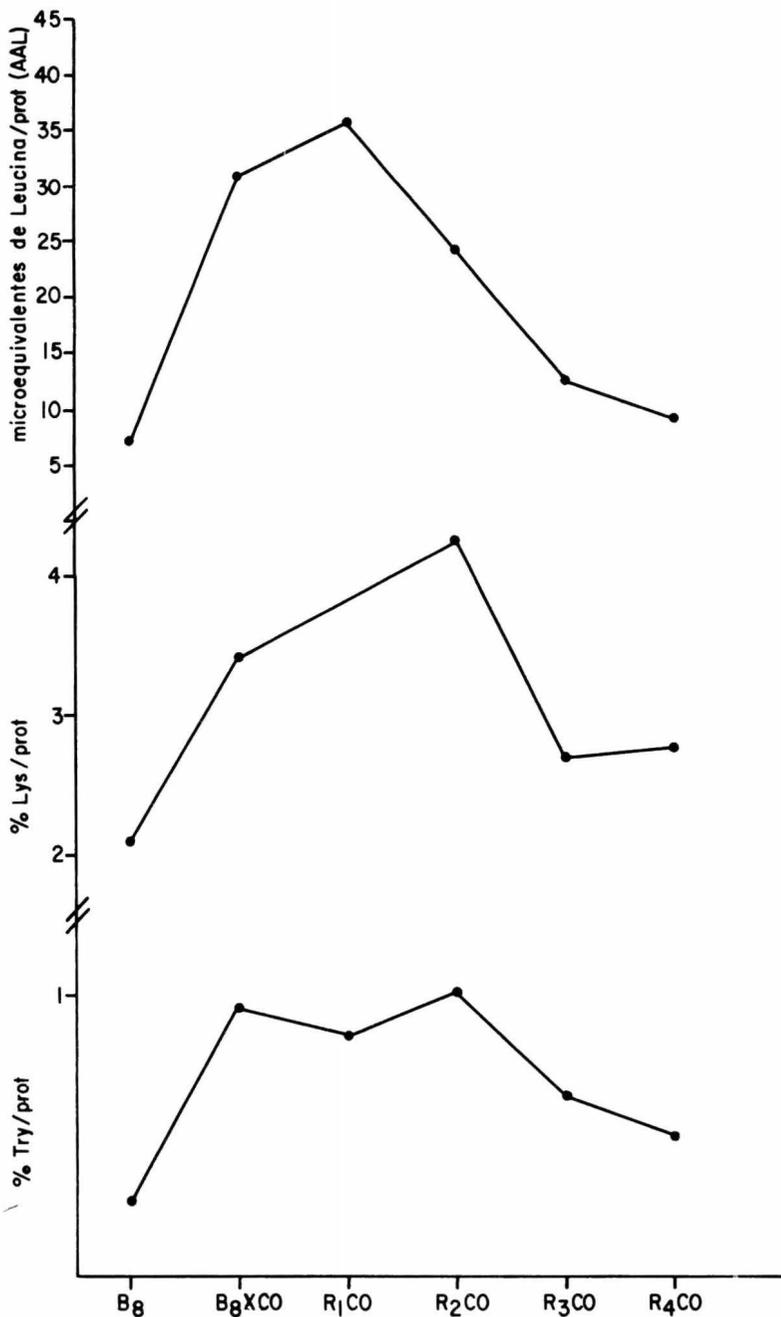
Gráfica 2. - Contenido de aminoácidos libres (AAL) expresado en micro equivalentes de leucina en proteína, lisina en proteína y triptofano en proteína del endospermo de la línea básica original B₁₀, de su F₂ seleccionada por fenotipo opaco, de la primera cruce con el Puebla opaco-2 (B₁₀ x P₀), así como las F₂ seleccionadas por fenotipo opaco de sus cuatro cruces regresivas. (RC₁, RC₂, RC₃, RC₄)



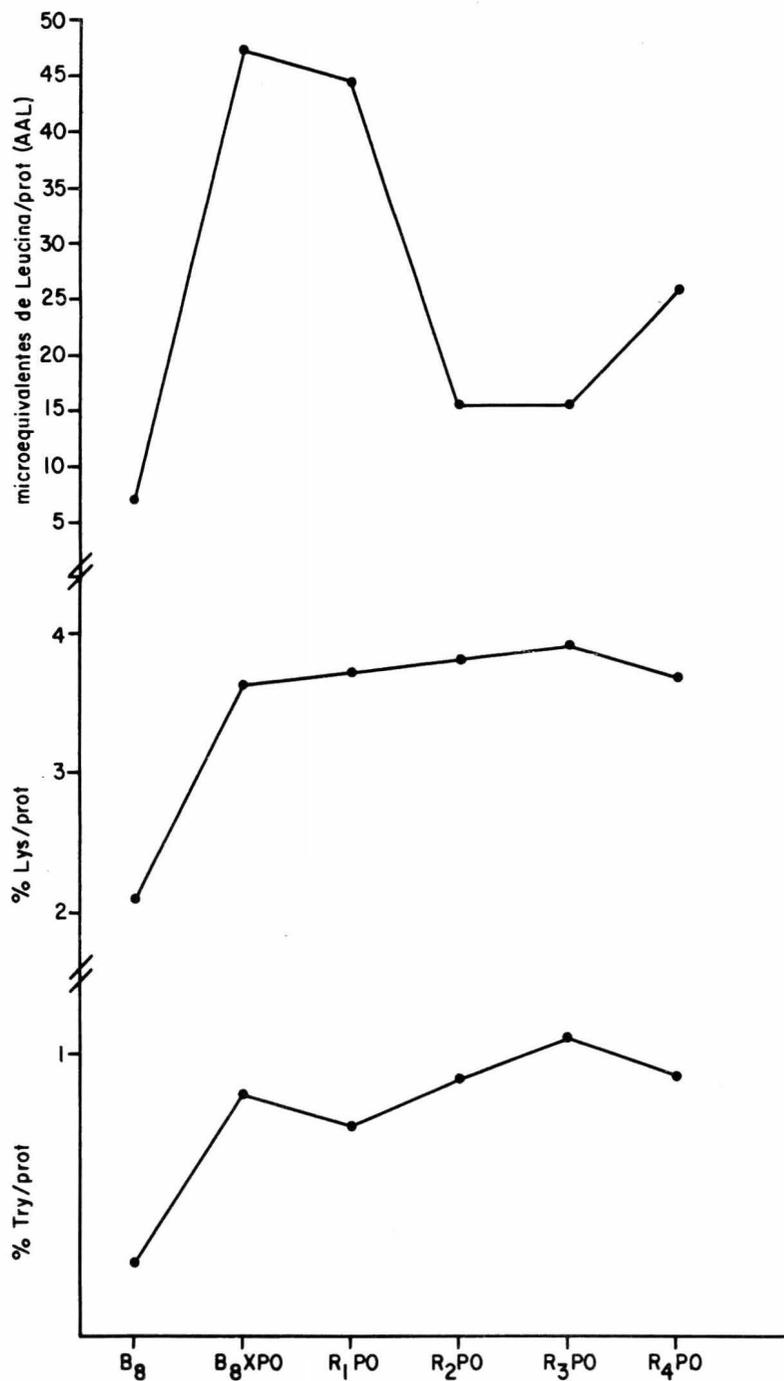
Gráfica 3.- Contenido de aminoácidos libres (AAL) expresado en microequivalentes de leucina en proteína, lisina en proteína y triptofano en proteína del endospermo de la línea básica original T₃, de su F₂ seleccionada por fenotipo opaco, de la primera cruce con el Celaya opaco-2 (T₃ x C₀), así como las F₂ seleccionadas por fenotipo opaco de sus cuatro cruces regresivas. (RC₁, RC₂, RC₃, RC₄).



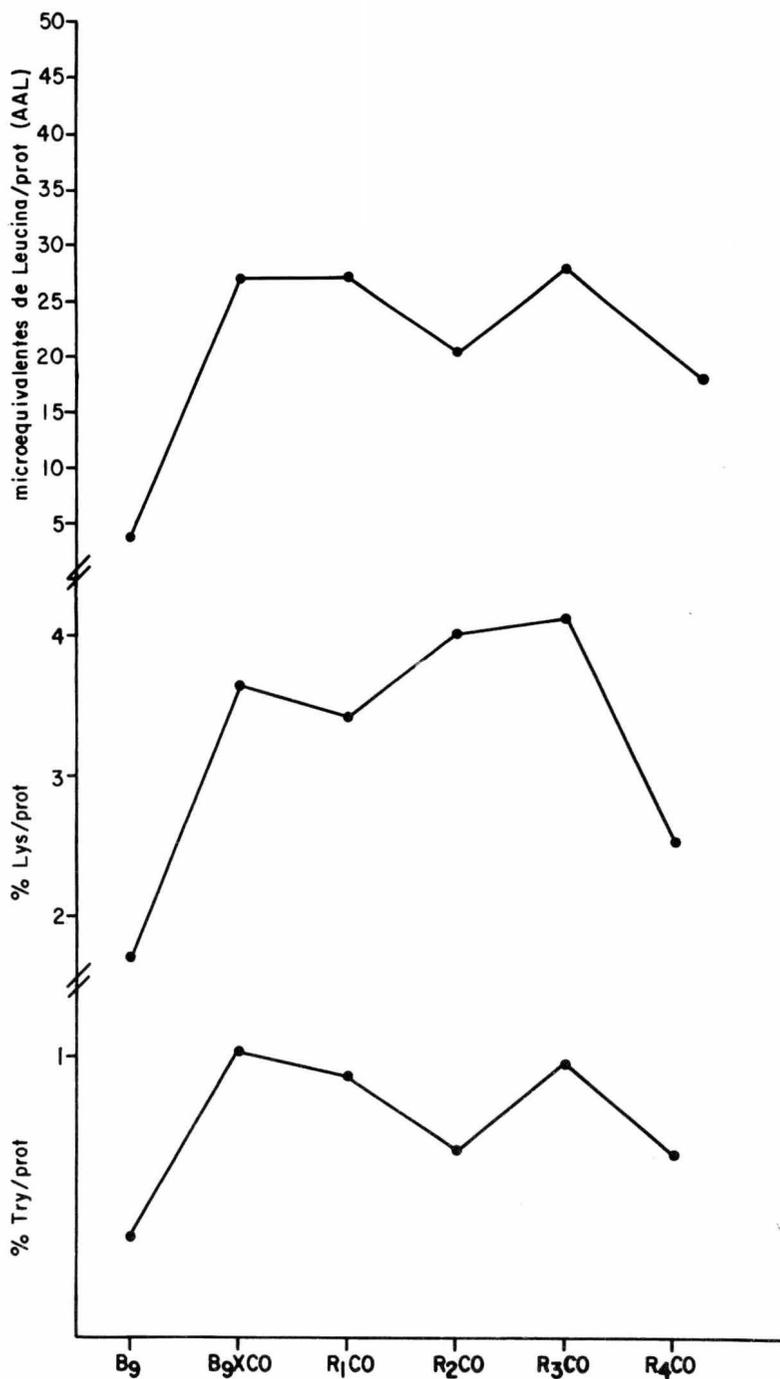
Gráfica 4. - Contenido de aminoácidos libres (AAL) expresado en microequivalentes de leucina en proteína, lisina en proteína y triptofano en proteína del endospermo de la línea básica original T₃, de su F₂ seleccionada por fenotipo opaco, de la primera cruce con el Puebla opaco-2 (T₃ x P₀), así como las F₂ seleccionadas por fenotipo opaco de sus cuatro cruces regresivas. (RC₁, RC₂, RC₃, RC₄).



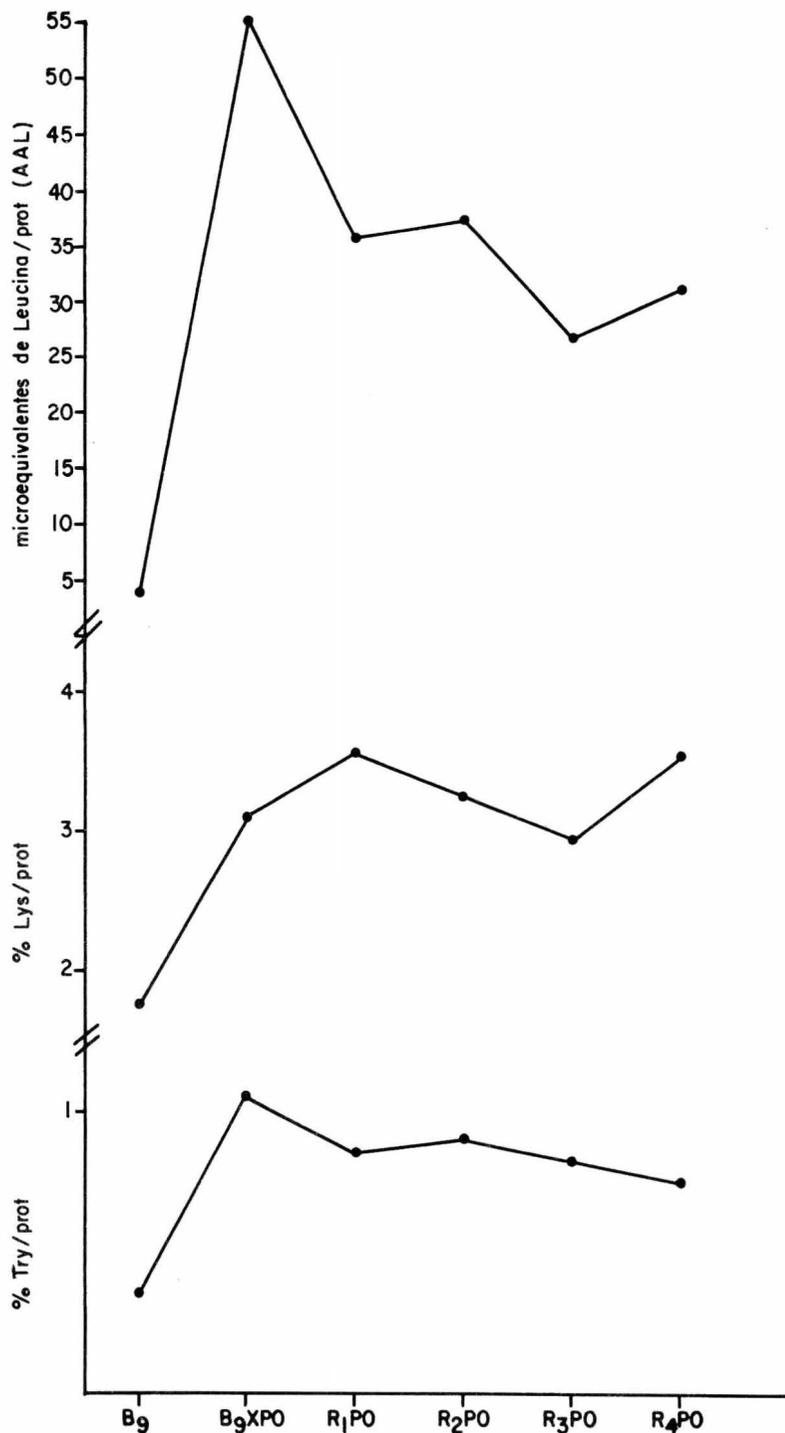
Gráfica 5. - Contenido de aminoácidos libres (AAL) expresado en micro equivalentes de leucina en proteína, lisina en proteína y triptofano en proteína del endospermo de la línea básica original B₈, de su F₂ seleccionada por fenotipo opaco, de la primera cruce con el Celaya opaco-2 (B₈ x C₀), así como las F₂ seleccionadas por fenotipo opaco de sus cuatro cruces regresivas. (RC₁, RC₂, RC₃, RC₄).



Gráfica 6. - Contenido de aminoácidos libres (AAL) expresado en microequivalentes de leucina en proteína, lisina en proteína y triptofano en proteína del endospermo de la línea básica original B₈, de su F₂ seleccionada por fenotipo opaco, de la primera cruce con el Puebla opaco-2 (B₈ x P₀), así como las F₂ seleccionadas por fenotipo opaco de sus cuatro cruces regresivas. (RC₁, RC₂, RC₃, RC₄).



Gráfica 7. - Contenido de aminoácidos libres (AAL) expresado en microequivalentes de leucina en proteína, lisina en proteína y triptofano en proteína del endospermo de la línea básica original B₉, de su F₂ seleccionada por fenotipo opaco, de la primera cruce con el Celaya opaco-2 (B₉ x C₀), así como las F₂ seleccionadas por fenotipo opaco de sus cuatro cruces regresivas, (RC₁, RC₂, RC₃, RC₄).



Gráfica 8. - Contenido de aminoácidos libres (AAL) expresado en microequivalentes de leucina en proteína, lisina en proteína y triptofano en proteína del endospermo de la línea básica original B₉, de su F₂ seleccionada por fenotipo opaco, de la primera cruce con el Puebla opaco-2 (B₉ x P₀), así como las F₂ seleccionadas por fenotipo opaco de sus cuatro cruces regresivas. (RC₁, RC₂, RC₃, RC₄).

CONCLUSIONES

1. - El contenido de proteína en el endospermo es disminuído al ser incorporado el gene opaco-2 sin importar la fuente, C0 ó P0, de la cual provenga el gene o_2 .
2. - En general el gene o_2 aumenta el contenido de triptofano en proteína hasta 3 veces más del normal, mejorando considerablemente la calidad proteíca, así también el gene opaco-2 aumenta el contenido de lisina en proteína desde 56% hasta un 90%, sin depender de la fuente de opaco-2.
3. - Debido a la alta correlación existente entre lisina y triptofano, el parámetro triptofano en proteína es un buen método de selección a utilizar en los progrmas de fitomejoramiento de calidad proteíca en maíz.
4. - El método colorimétrico de ninhidrina para la cuantificación de AAL aún cuando en comparación con los de triptofano y lisina resulte de muy fácil manejo, bajo costo y de tiempo de análisis menor, es de poca confiabilidad para predicción de lisina en comparación con el método de triptofano que comunemente se usa; debido a la variabilidad que existe en el contenido de AAL en los maíces con el gene o_2 . De utilizarse el método de ninhidrina se tendría que seleccionar posiblemente por valores altos de AAL tales como 25 microequivalentes de Leucina (AAL) en proteína como valor límite aceptable de selección para tener valores altos de Lys/Prot.

5. - Las correlaciones para cualesquiera de los parámetros; triptofano, lisina y aminoácidos libres son altas cuando se obtienen intra familias y no así, al obtenerse entre familias, debido a que al aumentar la diversidad genética los valores de las correlaciones son disminuidos.

BIBLIOGRAFIA

1. - Alexander, D. E. Lambert, R. J. , Dudley, J. W. Breeding problems and potentials of modified protein maize. New Approaches to Breeding for Improved Plant Protein. Viena. IAEA. 55-65(1969).
2. - Allard, R.W. Principles of plant Breeding. John Wiley & Sons, Inc. New York, 1 Ed. 163-178 (1967)
3. - Angeles, A. H. y Ortiz, C. J. Mejoramiento genético del maíz por calidad de proteína en el INIA de México. VIII Reunión ALAF Bogotá, Colombia (1970). En prensa.
4. - Angeles, A. H. Obtención de variedades mejoradas de maíz de alta calidad de proteína en Mexico. En Simposio sobre desarrollo y utilización de maíces de alto valor nutritivo. CP, ENA, Chapingo, México 85-111. (1972)
5. - A.O.A.C. Official methods of analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. 10th Ed. 744-45 (1965)
6. - Bressani, R. , Alvarado J. y Viteri, F. Evaluación en niños de la calidad de la proteína del maíz opaco-2. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 19: 129-140 (1969)
7. - Bressani, R. Evaluación nutricional del maíz opaco-2 en niños y adultos. En Simposio sobre desarrollo y utilización de maíces de alto valor nutritivo. CP, ENA, Chapingo, México 21-39 (1972)
8. - Fromberg, H. K. , Christ, W. , and Pallmer, W. C. A Rapid method based on butanol extraction for selectin high-lysine maize. Crop. Sci. 11: 567-569 (1971).

9. - Gevers, H.O. A note on the correlation between lysine and tryptophan content in maize kernel endosperms. *Cereal Chem.* 52: 115-118 (1975)
10. -Glover, D. V., Crane, P. L., Misra, P. S., Mertz, E. T. Genetics of endosperm mutants in maize as related to protein quality and quantity. Proc. of CIMMYT - Purdue International symposium on protein quality in maize. Dowden, Hutchison & Ross, Inc. (eds). Stroudsburg, Pnnsylvania 228-240 (1975).
11. -Hernández H., and Bates, L. S. Modified method for rapid tryptophan analysis of maize. Research Bull. No. 13 CIMMYT (1969)
12. -Jiménez, J.R. Protein studies of high lysine corn. Proc. of the High Lysine Corn Conf. Mertz, E. T. Nelson, O. E. (Eds), Washington, D. C. 74-79 (1966).
13. -Johnson, V.A. Schmidt, J. W., and Mattern, P.J. Cereal Breeding for better protein impact. Proc. Integrated Research in Economic Botany VII. "Protein for food". University of Miami, Coral Gables, Florida. 16-25 (1967).
14. -Mertz, E. T.; Bates, L. S. and Nelson, O. E. Mutant gene that changes protein composition of maize. *Science* 145 : 279-280 (1964)
15. -Mertz, E. T.: Veron, O. A. and Bates. L. S. Growth of rats fed on opaque-2 maize. *Science* 148: 1741-1742 (1965)
16. - Mertz, E. T. High lysine corn. *Agricultural Science Review* 6: 1-6 (1968)

17. -Mertz, E. T. Recent improvements in corn proteins. Symposium Seed proteins. C. Inglett ed., The Avi Pub. Co. westport, Conn. 136-143 (1972).
18. -Mertz, E. T. "Rapid Ninhydrine color test for screening high lysine mutants of maize, sorghum, barley and other cereal grains" Cereal Chem. 51: 304-307 (1974)
19. -Mc Whirter, K. S. A fluory endosperm high lysine locus on chromosome 10. Maize Genet. Coop. Newslett., 45: 184 (1971)
20. -Misra, P. S., Jambunathan, R., Mertz, E. T., Glover, D. U., Barbosa, H. M., and Mc Whirter K. S. Endosperm protein syntesis in high lysine maize mutants. Science 176: 1425-1426 (1972).
21. -Mossé, J. Alcohol soluble proteins of cereal grains. Fedn Proc. Fedn Am. Socs exp. Biol. 25: 1663-69 (1966).
22. -Nelson, O. E., Mertz, E. T., and Bates, L. S. Second mutant gene affecting the amino acid pattern of maize endosperm proteins. Science 150: 1469-70 (1965)
23. -Nelson, O. E. Opaque-2, Fluory-2 and high protein maize. Proc of the High Lysine Corn Conf. Mertz, E. T., Nelson O. E. (eds) Washington D. C. 156-160 (1966)
24. - Nelson, O. E. The modification by mutation of protein quality in maize. New Approaches to Breeding for Improved Plant Protein Viena. IAEA 41-54 (1969).
25. -Pickett, R. A. Opaque-2 corn in swine nutrition. Proc. of The

- High Lysine Corn Conf. Mertz, E. T., Nelson, O. E. (eds.)
Washington D. C. 19-22 (1966).
26. -Poey, R. F. Mejoramiento genético de la calidad nutritiva del maíz. En Simposio sobre el desarrollo y utilización de maíces de alto valor nutritivo. CP, ENA, Chapingo, México 69-82 (1972)
27. -Pradilla, A., Harpstead, D., Linares, F., Sarria, D. y Tripathy, K. Ensayos analíticos y biológicos de la proteína del maíz modificado por el gene opaco-2. *Antioquia Médica* 19: 201 (1969).
28. -Pradilla, A. El Maíz de alta lisina en nutrición humana . En Simposio sobre desarrollo y utilización de maíces de alto valor nutritivo, CP, ENA, Chapingo, México 41-48 (1972)
29. -Sodek, L., and Wilson, C.M. Aminoacid composition of proteins isolated from normal, opaque-2 and fluory-2 corn endosperms by modified procedure. *J. Agr. Food Chem.* 19: 1144 (1971)
30. -Steel, R. G., and Torrie, J. H. Principles and procedures of statistics. Mc Graw - Hill Book Co. New York. Ed. 83-93 (1960).
31. -Thielebein, M. The world's protein situation and crop improvement New Approaches to Breeding for Improved Plant Protein. Viena, IAEA 3-6 (1969)
32. -Tsai, C. Y. Dalby, A. Comparison of the effect of Shrunken-4, Opaque-2, Opaque-7, and Fluory-2 genes on the zein content

of maize during endosperm development. Cereal Chem. 51:
825-28 (1974).

33.-Villegas, E. y Mertz, E. T. Chemical screening methods for
maize protein quality at CIMMYT. Research Bull No. 20. (1971)

34.-Villegas, E. Míces de alta calidad nutricional. En Simposio
sobre el desarrollo y utilización de maíces de alto valor nutri-
tivo. CP, ENA, Chapingo, México 13-19 (1972)

