



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FISIOLOGÍA VEGETAL

NIVEL DE METIONINA EN PROTEÍNA DE MAÍZ (*Zea
mays* L.) DETERMINADA MEDIANTE UN BIOSENSOR
DE AMINOÁCIDO

EMIR MANCILLA JUAN

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO



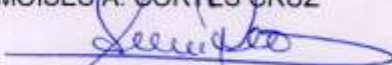
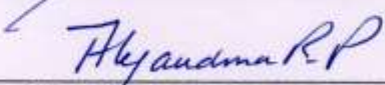
2016

La presente tesis titulada: "**Nivel de metionina en proteína de maíz (*Zea mays* L.) determinada mediante un biosensor de aminoácido**". Realizada por el alumno: **Emir Mancilla Juan**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FISIOLOGÍA VEGETAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO	 _____
	Dr. F. VÍCTOR CONDE MARTÍNEZ
DIRECTOR	 _____
	Dr. MOISÉS A. CORTÉS CRUZ
ASESORA	 _____
	Dra. HILDA VICTORIA SILVA ROJAS
ASESORA	 _____
	Dra. ALEJANDRINA ROBLEDO PAZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Julio de 2016

NIVEL DE METIONINA EN PROTEÍNA DE MAÍZ (*Zea mays* L.) DETERMINADA MEDIANTE UN BIOSENSOR DE AMINOÁCIDO

Emir Mancilla Juan
Colegio de Postgraduados, 2016
RESUMEN

El maíz (*Zea mays* L.) es el cultivo más importante en México debido a factores culturales, económicos y alimentarios. Por ello existe un creciente interés por elevar la calidad y cantidad de aminoácidos en dicho cultivo, el cual es básico para la alimentación y fuente de nutrientes para millones de personas en el mundo. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue identificar genotipos élite de maíz con alto contenido de metionina y desarrollar técnicas bioquímicas y biotecnológicas que permitan la caracterización de los mismos. El experimento tuvo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones por genotipo. Se evaluaron 277 genotipos de maíz distribuidos en tres grupos conformados por líneas puras, sintéticos y criollos mejorados, con contenido desconocido de proteína y metionina. El contenido de proteína y de metionina se evaluó por métodos colorimétricos, para el caso de proteína (Bradford, 1976) y la cuantificación de la concentración de metionina a través del crecimiento bacteriano de un biosensor de *Escherichia coli* (*E. coli*) auxotrófico de metionina. Por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), se validó la concentración de metionina obtenida con el mutante de *E. coli* en solo dos genotipos de maíz con contenido contrastante de metionina. El contenido de proteína presentó diferencias altamente significativas en los tres grupos analizados ($p \leq 0.05$). Se encontraron valores de proteína en el rango de 6.92 a 17.04 mg g⁻¹ de peso seco en los granos de los grupos de maíz analizados. El biosensor de *E. coli* auxotrófico de metionina mostró una gran sensibilidad a la detección de la metionina en pequeñas concentraciones de este aminoácido ($r^2 > 0.97$). Los valores de concentración de metionina obtenidos de los tres grupos fueron de 0.11 a 10.10 µg mL⁻¹. El método de HPLC validó los resultados obtenidos por el biosensor en los genotipos de maíz CML-449-1 (alta metionina) y 486-S2-23 (baja metionina) mostrando valores relativos de 5.38 y 2.16, respectivamente. El 5% de las accesiones demostraron ser prometedoras para mejoramiento genético en metionina.

Palabras clave: Genotipo, auxotrófico, *Escherichia coli*, maíz, metionina.

LEVEL OF METHIONINE IN MAIZE PROTEIN (*Zea mays* L.) DETERMINED BY MEANS OF AN AMINO ACID BIOSENSOR

Emir Mancilla Juan
Colegio de Postgraduados, 2016
ABSTRACT

Maize (*Zea mays* L.) is the most important crop in Mexico due to cultural, economic and dietary factors. There is growing interest in improving the quality and quantity of amino acids in different crops, particularly maize, which is one of the staple crops and nutrient source for millions of people worldwide. The aim of this work was the identification of elite maize genotypes with high methionine content, and the development of biochemical and biotechnological techniques to enable their characterization. The experiment had a completely randomized design with four replications per genotype. A number of 277 maize genotypes distributed in three groups, namely pure lines, synthetic and improved creole varieties, with unknown protein and methionine content, were evaluated. The protein and methionine contents were assessed by colorimetric methods. The protein content was determined by the Bradford method (Bradford, 1976) and the quantification of methionine by bacterial growth of a biosensor of *Escherichia coli* (*E. coli*) auxotrophic for methionine. The results obtained with the mutant *E. coli* were validated by high performance liquid chromatography (HPLC) in two maize genotypes with contrasting methionine content. The protein content showed highly significant differences in the three groups analyzed ($p \leq 0.05$). Protein content values were in the range of 6.92 to 17.04 mg g⁻¹ grain dry weight. The biosensor *E. coli* auxotrophic for methionine showed high sensitivity to the detection of methionine in small concentrations ($r^2 > 0.97$). The concentration values of methionine in the three maize groups ranged from 0.11 to 10.10 µg mL⁻¹. The HPLC method validated the methionine content indicated by the biosensor in two contrasting maize genotypes, namely CML-449-1 (high methionine) and 486-S2-23 (low methionine). These genotypes displayed a difference in the curve area corresponding to the values of methionine 5.38 and 2.16, respectively. Five percent the maize genotypes proved by probability to be possibly useful for genetic improvement for methionine.

Key words: genotype, auxotrophic, *Escherichia coli*, maize, methionine.

AGRADECIMIENTOS

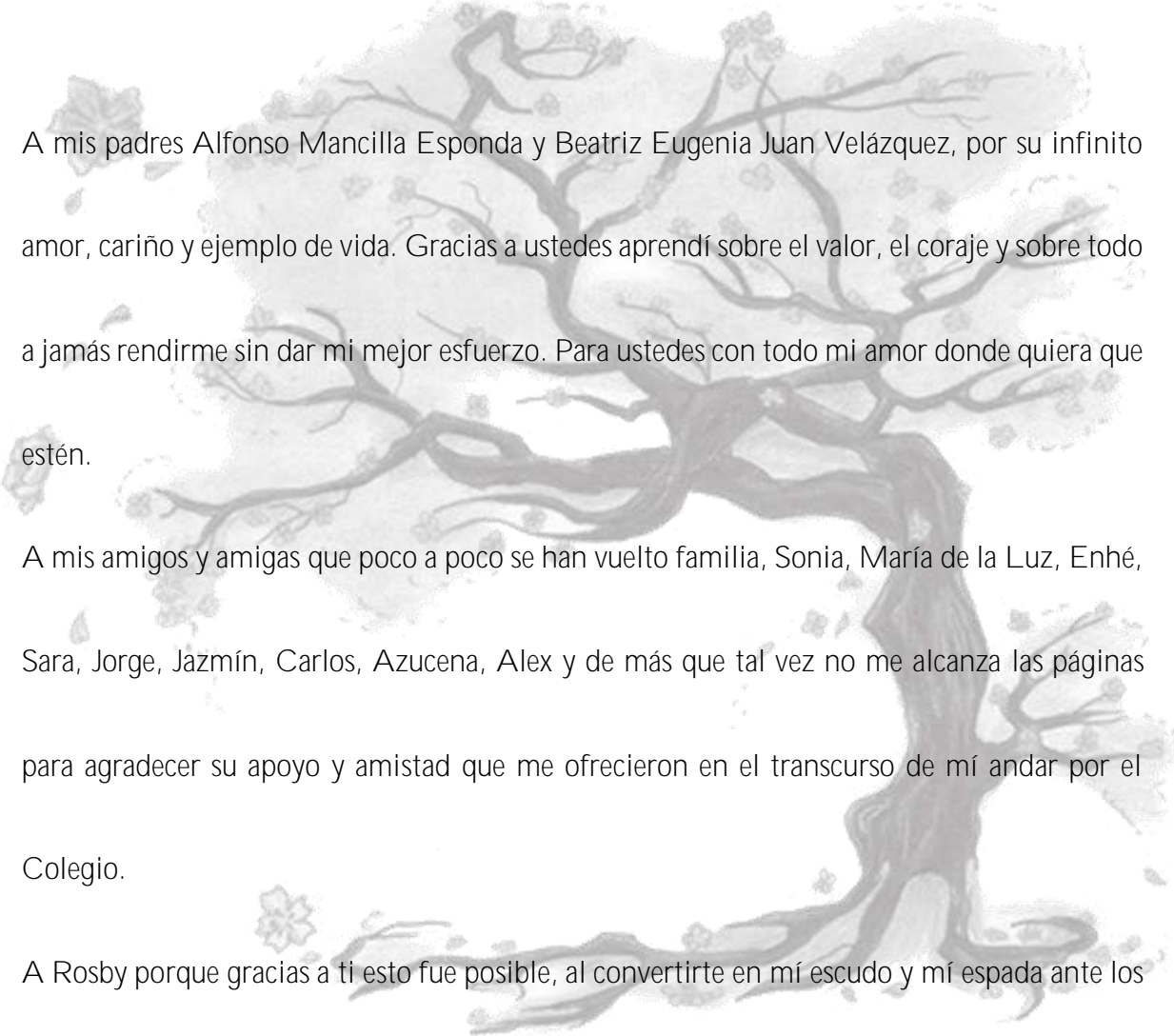
A los mexicanos que con sus impuestos, a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y el Colegio de Postgraduados, han financiado parte de mi formación.

Las personas integrantes de mi Consejo Particular, el Dr. F. Víctor Conde Martínez, Dr. Moisés A. Cortés Cruz, Dra. Alejandrina Robledo Paz y la Dra. Hilda Victoria Silva Rojas por el esfuerzo, la dedicación, el tiempo y el apoyo que me han brindado, pero sobre todo por la infinita paciencia para conmigo y mis problemas.

Al Dr. Adelfo Escalante Lozada por el apoyo y los consejos que me brindo al manejo de la bacteria, como toda la ayuda que otorgo para realizar mi proyecto de tesis sin interés alguno.

Todos los individuos, llámense profesor (a), compañero (a), amigo (a) o familia, quienes de alguna manera me han acompañado hasta hoy, aun en la distancia.

DEDICATORIAS



A mis padres Alfonso Mancilla Esponda y Beatriz Eugenia Juan Velázquez, por su infinito amor, cariño y ejemplo de vida. Gracias a ustedes aprendí sobre el valor, el coraje y sobre todo a jamás rendirme sin dar mi mejor esfuerzo. Para ustedes con todo mi amor donde quiera que estén.

A mis amigos y amigas que poco a poco se han vuelto familia, Sonia, María de la Luz, Enhé, Sara, Jorge, Jazmín, Carlos, Azucena, Alex y de más que tal vez no me alcanza las páginas para agradecer su apoyo y amistad que me ofrecieron en el transcurso de mi andar por el Colegio.

A Rosby porque gracias a ti esto fue posible, al convertirme en mi escudo y mi espada ante los momentos difíciles, en los brazos donde encontré consuelo y fuerza para seguir mi objetivo.

No hay obstáculo tan grande, ni camino tan largo que con esfuerzo y una gran voluntad no se logre superar. Si puedes soñarlo puedes hacerlo.

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Antecedentes históricos.....	3
2.2. Taxonomía del maíz.....	3
2.3. Descripción agronómica de la planta de maíz.....	4
2.4. Morfología del grano de maíz.....	5
2.5. Importancia del maíz en la alimentación de los mexicanos.....	7
2.6. Esquemas de mejoramiento genético en maíz.....	8
2.6.1. Maíces de Calidad Proteica (QPM).....	10
2.6.2. Perspectiva de maíces QPM.....	12
2.7. Composición química del grano de maíz.....	14
2.8. Características de la proteína del maíz.....	15
2.9. Valor nutritivo de los aminoácidos del grano de maíz.....	17
2.9.1. La importancia de la metionina en la nutrición.....	18
III. JUSTIFICACIÓN, OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	21
3.1. Justificación.....	21
3.2. Objetivos.....	23
3.3. Hipótesis:.....	23
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
4.1. Material vegetal.....	24
4.2. Localización del sitio experimental.....	30
4.3. Diseño experimental.....	30
4.4. Obtención de harina de maíz.....	30
4.5. Obtención del extracto proteico.....	31
4.6. Cuantificación de proteína soluble.....	31
4.7. Crecimiento de cepas bacterianas (biosensor).....	32
4.8. Preparación del inóculo líquido.....	32
4.9. Ensayo de proteína para determinar la limitación de los niveles de metionina en muestras de extracto proteico de harinas de maíz.....	33
4.10. Determinación de monómeros de metionina por HPLC.....	33
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35

5.1. Métodos de solubilidad de proteína con diferentes buffers de fuerza iónica variable y condición física de la harina.	35
5.1.1. Métodos de cuantificación de proteína.	37
5.1.2. Determinación de proteína presente en la colección de maíz.	38
5.2. Crecimiento bacteriano en medio mínimo M9.	40
5.2.1. Límite de detección de metionina microbiano.	42
5.2.2. Modelo de crecimiento bacteriano auxotrófico de metionina.	44
5.3. Cuantificación de la biodisponibilidad de la metionina en extractos proteicos hidrolizados de maíz, utilizando una cepa de <i>E. coli</i> auxotrófica de metionina (biosensor).	45
5.4. Validación cuantitativa de la biodisponibilidad de metionina por método bacteriano y por HPLC.	52
VI. CONCLUSIONES.	56
VII. LITERATURA CITADA.	58
VIII. ANEXOS.	67

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Morfología del grano de maíz.	7
Figura 2. Ruta metabólica general de la metionina. Figura modificada de Coruzzi y Last (2000).	20
Figura 3. Distribución de frecuencias en la concentración de proteína de 277 genotipos de maíz.	39
Figura 4. Contenido de proteína en tres grupos de maíz, líneas puras, sintéticos y criollos mejorados. □= valor promedio del grupo; x= genotipo con bajo contenido de proteína.	40
Figura 5. Crecimiento de las cepas de <i>E. coli</i> auxotrófica (MetB-) y silvestre (K12) en medio mínimo M9 con o sin metionina. CS= con metionina, SS= sin metionina.	42
Figura 6. Incremento de biomasa en medio de cultivo mínimo M9 con diferentes concentraciones de metionina.	43
Figura 7. Curva estándar de metionina para determinar el límite mínimo de detección de la cepa mutante MetB- auxotrófica de metionina.	44
Figura 8. Curva estándar de metionina en el crecimiento bacteriano de la cepa auxotrófica de metionina en medio de cultivo M9 (MetB-).	46
Figura 9. Distribución de frecuencias en la concentración de metionina de 277 genotipos de maíz.	47
Figura 10. Contenido de metionina en tres grupos de maíz, líneas puras, sintéticos y criollos mejorados. □= Valor promedio del grupo; x= genotipo con contenido prometedor de metionina.	48
Figura 11. Función de distribución de probabilidad de la distribución empírica de los datos de metionina en la colección de 277 genotipos de maíz y prueba de modelos teóricos de distribución de probabilidad Lognormal, Pareto y Weibull.	49
Figura 12. Gráfica de distribución de probabilidad acumulada Pareto y distribución empírica, en la concentración de metionina en la colección de 277 genotipos de maíz analizados. EDF= función de distribución empírica.	51
Figura 13. Cromatograma por HPLC del estándar de metionina disuelto en buffer de fosfatos 0.2 M pH: 7.6.	54
Figura 14. Cromatograma por HPLC del extracto proteico del genotipo CML-449-1.	55
Figura 15. Cromatograma por HPLC del extracto proteico del genotipo 486-S2-23.	55

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Clasificación taxonómica del maíz.	44
Cuadro 2. Fracciones de proteínas de reserva en granos de maíz y su solubilidad.	16
Cuadro 3. Composición y concentración de aminoácidos en dos genotipos de maíz.	18
Cuadro 4. Nombre, genealogía y características de los genotipos de maíz analizados.	25
Cuadro 5. Valores obtenidos de la evaluación de dos factores condición física de la harina de maíz y buffers de extracción con diferente fuerza iónica y los tratamientos producto de la combinación.	38
Cuadro 7. Valores de AIC obtenidos por la prueba de bondad de ajuste de los modelos de distribución probabilística.	50
Cuadro 8. Genotipos prometedores de cada grupo de maíz analizado en la concentración de metionina y su probabilidad acumulada dentro de la colección.	53

I. INTRODUCCIÓN.

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los principales cultivos del mundo y se espera que contribuya cada vez más a la nutrición humana y animal, así como para la producción de energía (Gu *et al.*, 2013). Junto con el arroz y el trigo, el maíz proporciona al menos 30 % de las calorías de los alimentos en más de 4,500 millones de personas en 94 países en vías de desarrollo. Para los mexicanos, el maíz es importante debido a que está íntimamente ligado a su alimentación, y su variabilidad está asociada con una gama de ambientes y grupos socioculturales, que en conjunto contribuyen al proceso evolutivo de la especie y a la integración de razas o poblaciones con características específicas de adaptación agroecológica, usos y composición del grano (López *et al.*, 2005).

La superficie sembrada de maíz en México es de aproximadamente 7, 426,412.19 hectáreas, de las cuales la producción total es de aproximadamente de 23, 273,256.54 toneladas y un rendimiento promedio de 3.30 ton ha⁻¹ (SIAP, 2014). En la actualidad, hay un creciente interés en la mejora la cantidad y calidad de las proteínas y aminoácidos en los alimentos para consumo humano (Ufaz y Galili, 2008). La demanda de cultivos con mayor valor nutricional está presente en países que se encuentran en desarrollo, debido a que la dieta está basada en el consumo de plantas, por lo que este aspecto tiene importancia desde el punto de vista social así como económico. A través de métodos de ingeniería genética, se puede obtener una mejora en el valor nutricional de cereales, debido a que este enfoque con el uso de promotores específicos permite la expresión de rasgos de interés en la semilla (Ufaz y Galili, 2008).

Actualmente, se han obtenido líneas de maíz mejorado con alto contenido de aminoácidos, ejemplo de ello es la línea LY038, que posee alto contenido de lisina, este maíz fue desarrollado por ingeniería genética y cuenta con la aprobación para ser cultivado en varios países del mundo (Mertz *et al.*, 1964). El Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) ha desarrollado maíces de alta calidad proteica (QPM), las cuales contienen altas cantidades de lisina y triptófano, sin embargo, son todavía relativamente deficientes en metionina (CIMMYT, 2001).

En plantas, es a través de la ruta metabólica del aspartato que se conduce a la biosíntesis de los aminoácidos lisina, metionina, treonina e isoleucina (Jander, 2009). La metionina es uno de los dos aminoácidos que contienen azufre y que está presente en muchas proteínas; actúa como aminoácido señal para el inicio de la síntesis de proteínas en los ribosomas en las células eucariotas.

Se sabe que la deficiencia de aminoácidos esenciales como la metionina y la lisina causa desnutrición en más del 40% de la población mundial, así como también trae como consecuencia la baja cantidad de proteínas en la sangre, baja resistencia a enfermedades, retraso en el desarrollo mental y físico en niños pequeños (Waterlow y Payne, 1975).

El objetivo general de esta investigación fue identificar genotipos de maíz con alto contenido de metionina a través de la caracterización bioquímica y el empleo de un biosensor auxotrófico de metionina para evaluar los niveles de biodisponibilidad de este aminoácido.

II. REVISIÓN DE LITERATURA.

2.1. Antecedentes históricos.

México es el lugar más probable de origen del maíz, ya que se han encontrado evidencias arqueológicas de pequeñas mazorcas de maíz con una antigüedad estimada de más de 5000 años (Wellhausen *et al.*, 1951; Katz *et al.*, 1974; Wilkes, 1979, 1985; Bressani, 1990). El maíz tuvo su origen en una antigua forma de maíz nativo, ahora extinta, en las alturas de México o Guatemala (Weatherwax, 1954, 1955; Mangelsdorf 1974). La domesticación de este cultivo fue muy importante ya que hizo que los grupos nómadas tomaran la decisión de volverse sedentarios, y este sirvió de alimento a los pueblos mesoamericanos. El maíz que conocemos hoy en día surgió del teosinte a través de mutaciones, selección natural o fue producto de los primeros fitomejoradores (Longley, 1941; Beadley, 1939, 1978, 1980).

Los antiguos pobladores de Mesoamérica le atribuían al maíz un sentido espiritual y religioso, debido a que la agricultura estaba íntimamente relacionada con el conocimiento del cosmos, estableciendo una estrecha relación entre el maíz, los dioses y el hombre (Díaz y Rochín, 1993). Ejemplo de lo anterior se puede encontrar en la cultura mexicana, donde se rendía culto a la diosa del maíz Centéotl, mientras que para la cultura maya según el Popol Vuh el hombre fue creado a partir del maíz.

2.2. Taxonomía del maíz.

Es una planta monocotiledónea que pertenece a la familia de las *Poaceas*, de la tribu *Maydeas*, las especies del género *Tripsacum* son parientes silvestres del maíz, también con origen americano, pero sin valor económico directo.

Los taxónomos clasificaron los géneros *Zea* y *Euchlaena*, como dos géneros separados, sin embargo, debido al estudio realizado por Reeves y Mangelsdorf en 1942 se les considera como un único género, basándose en la compatibilidad entre esos grupos de plantas y los estudios citogenéticos. Entre las *Maydeas* orientales existen diversos géneros como *Schleracne*, *Polytoca*, *Chionachne*, *Trilobachne* y *Coix*, siendo este último el único que tiene cierta importancia económica en el sureste de Asia. En general, solo *Zea mays* se considera como la especie de importancia económica dentro de las *Maydeas* (Paliwal, 2001a). En el cuadro 1 se observa la clasificación taxonómica del maíz.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del maíz.

Nombre científico	<i>Zea mays</i> L.
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Subclase	Commelinidae
Orden	Poales
Familia	Poaceae (Gramíneae)
Subfamilia	Panicoideae
Tribu	Andropogoneae
Genero	<i>Zea</i>
Especie	<i>mays</i>

2.3. Descripción agronómica de la planta de maíz.

El maíz es una planta monocotiledónea anual de porte robusto, de fácil desarrollo, sistema radical de tipo fibroso y un sistema caulinar con pocos macollos, sin ramificaciones. Las hojas son largas de gran tamaño, lanceoladas, alternadas y paralelinervias, por el haz presentan vellosidades, y los borde son afilados y cortantes. El maíz es de inflorescencia de tipo monoica con inflorescencias femeninas y masculinas dentro de la misma planta. Las yemas laterales que se

encuentran en la axila de la hoja superior de la planta forman la inflorescencia femenina, que posteriormente se convierte en mazorca.

Las mazorcas son espigas con forma cilíndrica, presenta un raquis central donde están insertadas las espiguillas por pares, estando cada espiguilla con dos flores pistiladas en hileras paralelas. Los entrenudos y las yemas florales están cubiertos por una vaina. La parte superior de la planta está compuesta de una espiga central con ramificaciones laterales donde se producirán los granos de polen (inflorescencia masculina en panícula dominante) (Paliwal, 2001 b; Ecocrop, 2007; Kato *et al.*, 2009; Clayton *et al.*, 2006; Tapia y Fries, 2007). Las mazorcas son las estructuras donde se desarrollan los granos de maíz en un número variable de hileras que van de 12 a 16 en función de la raza, produciendo alrededor de 300 a 1000 granos.

2.4. Morfología del grano de maíz.

El fruto (grano) de maíz es del tipo cariósipide (fruto seco e indehiscente). Conformado por tres partes principales: la pared del ovario o pericarpio que se encuentra fusionado con la cubierta de la semilla o testa, el embrión diploide o germen y el endospermo triploide (Figura 1). Diversos autores han reportado descripciones claras del grano de maíz: Wolf *et al.*, (1952 a), Miranda (1976), Esau (1977), Watson (1987) y Hernández (2005).

1. Pericarpio: es la capa exterior dura y fibrosa que contiene al grano, este mismo está conformado por pericarpio, testa y cofia, su función es la de proteger al embrión. En el grano maduro este cumple con la función de impedir el ingreso de hongos y bacterias. Todos los componentes del

pericarpio constituyen aproximadamente el 5.3 % del peso total del grano, también se caracteriza por un elevado contenido de fibra cruda aproximadamente el 87 %, la que a su vez está conformada fundamentalmente por hemicelulosa (67 %), celulosa (23 %) y lignina (0.1 %) (Miranda, 1976; Watson, 1987; Burga y Duensing, 1989; Wolf *et al.*, 1952 b).

2. Endospermo: constituye la mayor porción del grano con aproximadamente un 80 a 84 % del peso total del grano. Su función principal es el de servir como reserva de energía a la planta en su desarrollo, pues es en esta zona donde se almacenan principalmente los carbohidratos y proteínas. Está conformado por dos regiones: una harinosa y una córnea teniendo así una relación harinosa/ córnea de 2:1. La región harinosa se caracteriza por tener células con gránulos de almidón grandes (10 a 30 μm), esféricos y una capa delgada de matriz proteica; en la región periférica o córnea se encuentra células con gránulos de almidón más pequeños (1 a 10 μm) (Watson, 1987; Wolf *et al.*, 1952 c, Paliwal, 2001 c).
3. Embrión o germen: se caracteriza por un elevado contenido de grasas crudas aproximadamente 33 % y un contenido relativamente elevado de proteína de aproximadamente el 20 % y minerales. Este aporta un 9.5 a 12 % del peso del grano. Está constituido por dos partes destacables el eje embrionario y el escutelo. El escutelo constituye cerca del 90 % del embrión y en este se almacena los nutrientes que necesita el embrión durante la germinación (FAO, 1993; Hernández, 2005; Watson, 1987; Wolf *et al.*, 1952 d).

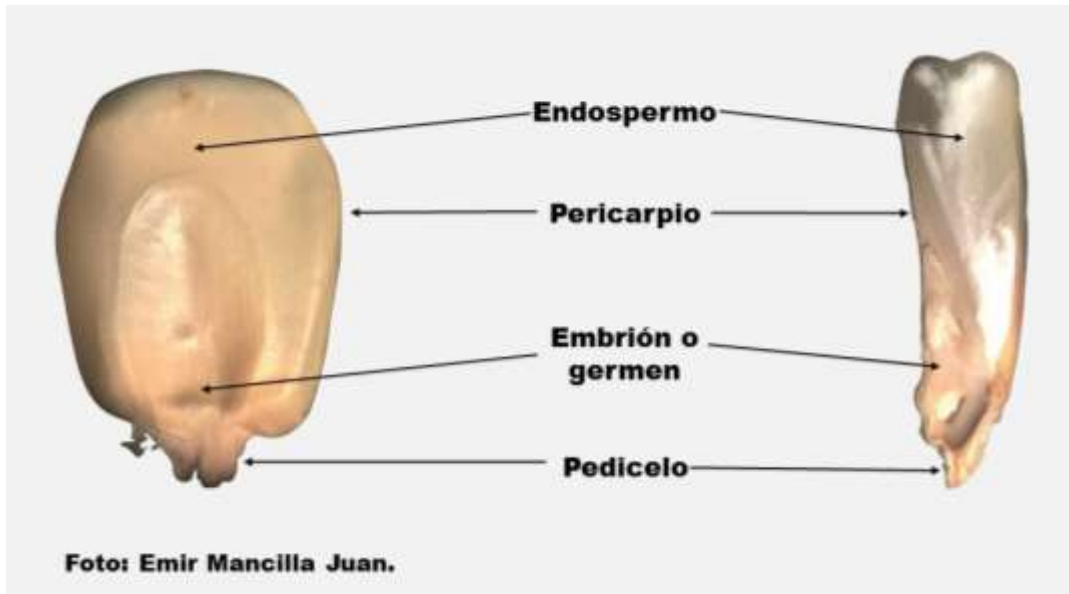


Figura 1. Morfología del grano de maíz.

2.5 Importancia del maíz en la alimentación de los mexicanos.

El maíz es el cultivo más importante en México, teniendo el maíz blanco una superficie sembrada de 7, 426,412.30 ha con una producción anual 23, 273,256.54 ton (3.30 ton ha^{-1}) un valor de producción de 72, 518,448.81 millones de pesos (SIAP, 2014). El maíz blanco por lo general es el que más se usa para el consumo humano, ya que de este se elaboran tortillas y tamales, así como también, pueden obtenerse aceites e insumos para la fabricación de productos industriales como barnices, pinturas, cauchos artificiales y jabones. Mientras que el maíz amarillo aunque también puede usarse para consumo humano su uso está más relacionado con la alimentación del ganado y la producción de almidones.

El alimento principal en la dieta de los mexicanos es el maíz, existiendo una gran diversidad de este alimento en sus formas de consumo. Tan solo en la forma de maíz nixtamalizado pueden contarse más de 100 platillos diferentes. En

promedio, cada mexicano consume al día 342 gramos, casi siete veces el promedio mundial (50 gramos por día), lo que muestra la fuerte especialización de la dieta mexicana en este cereal (FAO, 2009).

2.6. Esquemas de mejoramiento genético en maíz.

El maíz fue domesticado hace 7 000 a 10 000 años a partir del teocintle (Matsuoka *et al.*, 2002); el maíz es una planta diploide que cuenta con más de 32 000 genes cualitativos, cuantitativos y reguladores en 10 cromosomas, mientras que 85% del genoma consiste de centenares de familias de elementos transposables (Schnable *et al.*, 2009). La acción de estos ha sido factor clave de la evolución del genoma del maíz, como lo han sido también las mutaciones, recombinaciones, la selección natural y el flujo genético (Gaut *et al.*, 2000).

La hibridación varietal por medio de la polinización controlada o abierta fue el origen para el desarrollo de numerosas variedades de maíz. En los últimos 30 o 40 años, han existido programas de mejoramiento genético del maíz tropical, los centros de mejoramiento regionales e internacionales han desarrollado germoplasma que ha servido de base para la generación de nuevas variedades, variedades sintéticas, híbridos y líneas puras que representan las fuentes de material genético más usados en casi todos los programas de mejoramiento del maíz, y aun así tales programas son una minúscula parte de la diversidad genética (Paliwal, 2001e). La tecnología de dobles haploides (DH) en el mejoramiento de maíz, basada en la inducción de haploidía *in vivo*, es reconocida a nivel mundial como un importante medio para aumentar la eficacia del mejoramiento. Un DH es un genotipo que se forma cuando las células (n) de un haploide experimentan un

proceso, espontaneo o inducido artificialmente, de duplicación cromosómica (Prasanna *et al.*, 2013).

Esta tecnología de DH acorta el ciclo del mejoramiento de manera considerable porque hace posible un rápido desarrollo de líneas totalmente homocigotas (en dos o tres generaciones), en comparación con el proceso convencional de desarrollo de líneas endogámicas que tarda por lo menos seis u ocho generaciones para obtener líneas con ~ 99 % de homocigosis (Foster y Thomas, 2005; Geiger y Gordillo, 2009; Chang y Coe, 2009). Otro método de fitomejoramiento utilizado es la selección recurrente, en el cual se lleva acabo ciclos alternantes de selección y cruzamiento. Selección para elevar la frecuencia de genes favorables o de interés en la población de plantas a mejorar y cruzamiento de las mejores plantas entre sí, manteniendo así la variabilidad genética que permitirá obtener mejores combinaciones génicas.

La selección recurrente basada en la evaluación y recombinación de progenies autofecundadas, es necesaria cuando existe una cantidad limitada de semilla F_1 de cada cruce fraternal entre las diferentes unidades de selección (Benítez, 2002).

Las variedades sintéticas, son poblaciones de maíz que se obtienen mediante un método de mejora genética. Debido a que el costo de la semilla híbrida representa en ocasiones hasta el 15 % del total del costo de producción, no siempre los agricultores de bajos recursos pueden comprar ese tipo de semilla, por lo que optan por sembrar poblaciones de las cuales puedan obtener su propia semilla (Márquez, 2013). La obtención clásica de sintéticos es a través de un grupo de

líneas de amplia aptitud combinatoria (generación 0), las cuales se cruzan entre sí en todas las formas posibles, y se siembran en un compuesto balanceado formado con la semilla de las cruces (generación 1) en las plantas resultantes (generación 2) se cosecha la semilla del sintético en la cual se puede calcular su endogamia (Allard, 1960). Como la posterior producción masiva del sintético se lleva a cabo en poblaciones grandes, en estas ya no se produce endogamia adicional.

Para la producción de germoplasma híbrido es necesario el uso de técnicas especiales. De forma general consiste en lo siguiente: se siembra tres partes que funcionan como hembras y otra que funciona como progenitor masculino, pero solamente se cosecha la parte del progenitor femenino, es decir que solamente puede utilizarse el 75 % de la superficie sembrada. Para la formación de un híbrido simple es necesario la siembra de dos líneas puras que se cruzan entre sí, mientras que un híbrido triple es el resultado del cruzamiento de un híbrido simple y una línea pura. Un híbrido doble es el resultado del cruzamiento de dos híbridos simples.

2.6.1. Maíces de Calidad Proteica (QPM).

Durante las últimas décadas, se han realizado diversas investigaciones con el propósito de aislar y analizar las proteínas que se encuentran en la semilla de maíz, de las cuales muchas de estas proteínas son deficientes en uno o más aminoácidos esenciales. En los 70's, Mertz, Bates y Nelson demostraron que el maíz con el gen *opaque-2* (*o2*), el contenido de lisina se incrementó en aproximadamente 2 a 3.5 % (Cloutier y Larkins, 1998), es por esto que en los maíces mejorados se busca bloquear uno de los cuatro tipos de zeínas para ser ocupado por proteínas útiles (Espinosa y Turrent, 2000).

En los QPM se afecta la calidad de sus proteínas y no su cantidad. El grano típico del maíz que posee el gen *o2* suele tener un endospermo blando con apariencia yesosa y opaca, otra de las características indeseables de los maíces que poseen el gen *o2* es el bajo peso, poca resistencia a plagas y enfermedades en el almacén (Paliwal, 2001 d). Desde 1996, el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), en colaboración con Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) han evaluado y generado híbridos y variedades de maíz QPM, que contienen hasta 100 % más lisina y triptófano que los maíces comunes (Sierra *et al.*, 1999).

Vasal y Villegas (2001) mediante el uso de técnicas de mejoramiento tradicional lograron incorporar genes especiales al maíz opaco *o2o2*, llamados genes modificadores de la textura del endospermo, estos genes confieren al endospermo de variedades, líneas e híbridos una textura de grano más dura, dando así la apariencia del maíz normal. Larkins *et al.*, (1994) indicaron que los maíces con el gene *o2o2* contienen 40 a 50% más lisina y de 35 a 40% más triptófano. El INIFAP en colaboración con el CIMMYT, han generado el híbrido trilineal de maíz H-564C, con alta calidad de proteína, el cual se adapta a la región tropical en el sureste mexicano, con ventajas agronómicas como la tolerancia a la enfermedad “achaparramiento”, calidad de proteína en virtud que posee mayor cantidad de lisina y triptófano en comparación de un maíz normal y mejor rendimiento con respecto a los testigos, factores que representan una alternativa favorable para incrementar los rendimientos de maíz y mejorar la nutrición de los consumidores (Sierra *et al.*, 2008).

El consumo de maíces de tipo QPM puede ayudar a mejorar la nutrición humana y así también, reducir los costos de la alimentación animal (Pixley y Bjarnason, 2002), primordialmente en las poblaciones de escasos recursos económicos y países en vías de desarrollo como en América Latina y África, que dependen del maíz para cubrir su demanda de alimentos (CIMMYT, 2000; Sierra *et al.*, 2001). Asimismo, ayudaría a reducir la frecuencia de enfermedades y muertes a causa de a la desnutrición (Preciado, 1998). Estudios realizados en Colombia y Perú por el CIMMYT, muestran que los niños que se encontraban con problemas de nutrición recuperaron su salud con una alimentación controlada con QPM (CIMMYT, 2000).

2.6.2. Perspectiva de maíces QPM.

La creación y liberación de una nueva variedad de maíz implica al menos 12 años de investigación tradicional y trabajo constante de personal capacitado, es así que durante este proceso se tiene que cumplir las diferentes etapas para la obtención del producto final, que será la línea de maíz mejorada y esto implica desde la selección y evaluación de los materiales progenitores, validación de terrenos de siembra, el incremento de los progenitores del mejor híbrido, la producción de semilla, promoción y la distribución comercial, frecuentemente se tienen resultados después de 20 años o más (Espinosa *et al.*, 2003).

En el sureste de México se siembran anualmente 2.5 millones de hectáreas con maíz, de estas un millón están conformadas por provincias agronómicas de buena y muy buena productividad, y 100 mil hectáreas son sembradas bajo condiciones de riego (Sierra *et al.*, 2004). En esta superficie se recomienda la

siembra de híbridos, ya que estos expresan al máximo su potencial genético bajo condiciones de clima, suelo y manejo por parte de los agricultores (Gómez, 1986; Sierra *et al.*, 1992, 2001, 2004a, 2004b; Vasal *et al.*, 1992a, 1992b). En la selección de mejores híbridos se debe tener en cuenta la adaptabilidad de los genotipos, porque permite conocer la respuesta a los diferentes ambientes, definidos por el clima, suelo y manejo agronómico.

Pixley y Bjarnason (2002) determinaron la estabilidad de la producción de granos de varios genotipos QPM, y llegaron a la conclusión que los híbridos producen 13 % más que las variedades de polinización abierta.

En Venezuela se realizó un ensayo de 23 híbridos QPM y dos testigos comerciales, los resultados con respecto al grano fue que los genotipos QPM superaron en 40 % al mejor testigo comercial con un intervalo de 6.07 a 6.57 ton ha⁻¹ (Chassaigne *et al.*, 2000).

En México, durante el ciclo primavera-verano, 1999-2000 los QPM; H-519C, H-553C y V-537C mostraron rendimientos de 8.62, 7.29 y 5.94 ton ha⁻¹ respectivamente, y aunque estos híbridos superaron fácilmente al testigo se considera factible lograr mejores rendimientos (Sierra *et al.*, 2001).

En Veracruz, Sierra *et al.*, (2011) evaluaron, validaron y caracterizaron cuatro híbridos (HQ4, H-520, HQ3 y HQ1) durante el periodo de 2005 a 2008, que fueron seleccionados por su rendimiento, características agronómicas y su tolerancia a la enfermedad de “achaparramiento”, y obtuvieron rendimientos de 5.06 a 5.42 ton ha⁻¹. Con el HQ1 se produjeron las mejores tortillas siguiendo el método tradicional de la masa y la tortilla. El híbrido HQ4, puede ser procesado exitosamente por la industria de la harina nixtamalizada. Este híbrido registró 72% más lisina y 56% más

triptófano en el grano entero que el maíz normal. Durante 2007 y 2008 se hizo la caracterización del HQ4, para su registro oficial como H-564C, con el número: 2257-MAZ-1133-300609/C (Sierra *et al.*, 2011).

El impacto de los maíces de alta calidad proteica en el caso de las áreas del subtrópico y trópico mexicano, en términos de superficie potencial de siembra sería de un total de 2 374 000 hectáreas, con una producción de grano de 7.23 millones de toneladas (Preciado, 1998).

2.7. Composición química del grano de maíz.

La composición química del grano de maíz depende de varios factores como son el tipo de maíz, las condiciones del cultivo, temperatura, variedad y contenido de nutrientes, entre otros (Cowieson, 2005; Herrera *et al.*, 1990). El almidón constituye hasta el 73 % del peso de grano de maíz, otros hidratos de carbono presentes son azúcares sencillos como glucosa, sacarosa y fructosa, en cantidades del 1 al 3 %. El aceite del grano se encuentra en el embrión y éste representa del 3 al 18 % del peso. El aceite de maíz contiene un bajo contenido de ácidos grasos saturados: ácido palmítico y ácido esteárico con 11 y 2 %, respectivamente, y un alto nivel de ácidos grasos poliinsaturados, principalmente el ácido linoleico 24 %.

La fibra dietética es el cuarto componente principal del grano, este se encuentra principalmente en el pericarpio y la piloriza, y en menor medida en las paredes celulares del endospermo y el embrión. Dentro los minerales más abundantes del grano se encuentran el fósforo y el potasio y una concentración baja en calcio y otros oligoelementos. Contiene además dos vitaminas liposolubles, la vitamina E y la provitamina A (carotenoide).

La mayor parte de los carotenoides se localizan en el endospermo duro del grano y en pequeñas cantidades en el embrión, conteniendo β -caroteno en una proporción al 20% del total de los carotenoides presentes en el grano, mientras que la criptoxantina equivale al 51 % del total de los carotenoides. La vitamina E se localiza principalmente en el embrión. Las vitaminas hidrosolubles tienen una mayor abundancia en la capa de aleurona del grano, perdiéndose una buena parte a la hora de elaborar el cereal. En general se debe tener en cuenta que durante la maduración, la composición química se modifica disminuyendo la cantidad de nitrógeno, fibra o ceniza (respecto al peso seco), aumentando por otro lado la cantidad de almidón y de extracto etéreo (FAO, 1993, Sánchez y Pérez, 2014).

2.8. Características de la proteína del maíz.

El grano de maíz presenta un contenido de proteína que varía de 7 a 12 %, dependiendo del maíz de que se trate. En general, los de endospermo suave tienen menor contenido que los de endospermo duro (Salinas *et al.*, 1992). Aproximadamente, el 10 % del peso seco del grano de maíz lo constituye la proteína en variedades comunes (Rubenstein y Geraghty, 1986).

Las proteínas no se encuentran distribuidas uniformemente dentro del grano de maíz, la mayor parte de ellas son de reserva.

Estas fracciones proteicas fueron clasificadas en base a la solubilidad con diferentes agentes de acuerdo con reportado por Osborne en 1924, las albuminas y las globulinas que se disuelven fácilmente en agua y soluciones salinas, respectivamente; las prolaminas que se encuentra en el endospermo son solubles en alcohol y las glutelinas que son proteínas estructurales del endospermo, es la

fracción más difícil de extraer debido a su alto peso molecular, y su elevado contenido de enlaces disulfuro, para extraer esta fracción es necesario el uso de soluciones ácidas o alcalinas (Landry y Moureaux, 1994; Bermiller *et al.*, 1984; Serna, 2001) (Cuadro 2).

Del total de la proteína del grano entero, alrededor de 52% son prolaminas (zeínas), y se localizan principalmente en el endospermo del grano, el resto lo constituyen las albúminas y globulinas (22%), las cuales se concentran en el embrión, y las glutelinas (25%) que se encuentran tanto en el embrión como en el endospermo (Wilson, 1987). Las prolaminas (zeínas) constituyen el 60 % de la proteína total del endospermo en variedades de maíz normal, pero en maíces que poseen el gen mutante *o2*, esta cantidad se reduce considerablemente ya que el gen limita la síntesis de zeínas (Yau *et al.*, 1999), y favorece la de albúminas y glutelinas. Estas últimas forman la matriz proteínica en la que se encuentran inmersos los gránulos de almidón, en tanto que las zeínas conforman cuerpos proteínicos que los rodean. Algunos tipos específicos de zeínas están relacionados con la dureza del endospermo del grano (Paiva, *et al.*, 1991).

Cuadro 2. Fracciones de proteínas de reserva en granos de maíz y su solubilidad.

Fracción proteica	Solubilidad
Albúmina	Solución acuosa; coagulables al calor
Globulina	Soluciones salinas; insolubles en altas concentraciones salinas
Prolamina (Zeína)	Alcohol al 70 %
Glutelinas	Soluciones diluidas de ácidos y bases

(Tomado de Bermiller *et al.*, 1984).

2.9. Valor nutritivo de los aminoácidos del grano de maíz.

La importancia de los cereales en la nutrición humana es ampliamente reconocida, debido al consumo que estos representan en millones de personas en el mundo, y aún más en los países en vías de desarrollo. La composición de aminoácidos que conforman cada fracción proteica es diferente entre dichas fracciones. Las albuminas y globulinas son ricas en aminoácidos esenciales como: lisina, arginina, triptófano y cisteína. Las prolaminas que en el caso del maíz se les denomina zeínas, presenta un alto contenido de aminoácidos no polares como la leucina, alanina y prolina y también aminoácidos neutros como glutamina. Las zeínas son deficientes en lisina y triptófano y, por lo tanto, contrasta su baja calidad nutricional con las albuminas y globulinas que poseen un alto valor biológico.

La composición de aminoácidos de las glutelinas es intermedia entre zeína y globulinas, con la diferencia de que tienen mayor contenido de metionina (Reiners *et al.*, 1973). En los maíces de tipo QPM se ha logrado mejorar la calidad de proteína respecto a los aminoácidos esenciales, como lo es la lisina y triptófano, pero más que el contenido de proteína, estos aminoácidos son esenciales para la síntesis endógena de la vitamina B niacina (Watson, 1987; Méndez *et al.*, 2005; Hernández, 2013). En el cuadro 3 se presenta el perfil de aminoácidos para dos genotipos de maíz (amarillo y blanco), resaltando el contenido metionina se encuentra en 0.197 % en ambos genotipos.

Cuadro 3. Composición y concentración de aminoácidos en dos genotipos de maíz.

Aminoácidos %	Maíz blanco	Maíz amarillo
Triptófano	0.067	0.067
Treonina	0.354	0.354
Isoleucina	0.337	0.337
Leucina	1.155	1.155
Lisina	0.265	0.265
Metionina	0.197	0.197
Cisteína	0.170	0.170
Fenilalanina	0.463	0.463
Tirosina	0.383	0.383
Valina	0.477	0.477
Arginina	0.470	0.470
Histidina	0.287	0.287
Alanina	0.705	0.705
Ácido aspártico	0.655	0.655
Ácido glutámico	1.768	1.768
Glicina	0.386	0.386
Prolina	0.822	0.822
Serina	0.447	0.447

Fuente: USDA, 2013; citado por Sánchez y Pérez, 2014.

2.9.1. La importancia de la metionina en la nutrición.

La energía que se utiliza para la reducción del azufre en las plantas proviene del acoplamiento del transporte de electrones fotosintético, por lo que la biosíntesis de reducción de azufre y de aminoácidos se produce en gran medida en las hojas (Hell, 1997; Saito, 2000). Las semillas tienen una elevada exigencia en la demanda de aminoácidos, incluyendo cisteína y metionina, para apoyar la síntesis de proteínas de reserva durante la maduración del grano (Tabe y Droux, 2001). Las proteínas vegetales suelen ser deficientes en uno o más aminoácidos esenciales a los cuales se les denomina “limitantes”.

La metionina es un aminoácido esencial rico en azufre, este se encuentra limitado en las dietas que están basadas en maíz, las estrategias de selección recurrente, han sido propuestas como un método eficiente para la alteración del

contenido de metionina en granos de maíz (Scott *et al.*, 2008). La deficiencia en el consumo de macronutrientes, tales como la metionina y la lisina son causantes de la desnutrición, y más del 40 % de la población mundial se ve afectado debido a esto. La metionina es un aminoácido esencial que tiene importancia para el desarrollo y crecimiento humano, ya que el azufre es obtenido a partir de este aminoácido (Baker, 1986).

El azufre es una fuente de macronutrientes encontrado en plantas, y tiene una función catalizadora en diferentes partes de la célula. Los cereales como el maíz, se caracterizan por lo general por una deficiencia en lisina y triptófano, mientras tanto las leguminosas son deficientes en aminoácidos azufrados, metionina y cisteína. La metionina participa en la degradación de las grasas y por lo consiguiente previene la acumulación de estas grasas en las arterias; ya que la metionina puede ser convertida en cisteína (Figura 2), es materia prima para la desintoxicación del hígado (Rizki *et al.*, 2006). La metionina es sintetizada por la misma ruta metabólica que la lisina (Galili *et al.*, 2005), controla los niveles de otros metabolitos como el etileno, poliaminas y biotinas (Amir *et al.*, 2002). Además, la metionina también participa en la síntesis de DNA y proteínas (Anderson, 1998) y la regulación de la expresión génica, (Lertratanangkoon *et al.*, 1996).

Un estudio reciente (Yang *et al.*, 2013) indica que existe cierta relación entre la ingesta de metionina y un menor riesgo de cáncer de mama. La metionina es la encargada de transportar la grasa hasta las células para convertirla en energía, y así lograr un óptimo rendimiento muscular, es en esto que este aminoácido evita la acumulación de las grasas en las arterias y el hígado. La deficiencia de metionina, por otro lado, está altamente asociada a desordenes relacionados con la metilación,

incluyendo hígado graso, arterioesclerosis, desórdenes neurológicos (Fukawa, 2006).

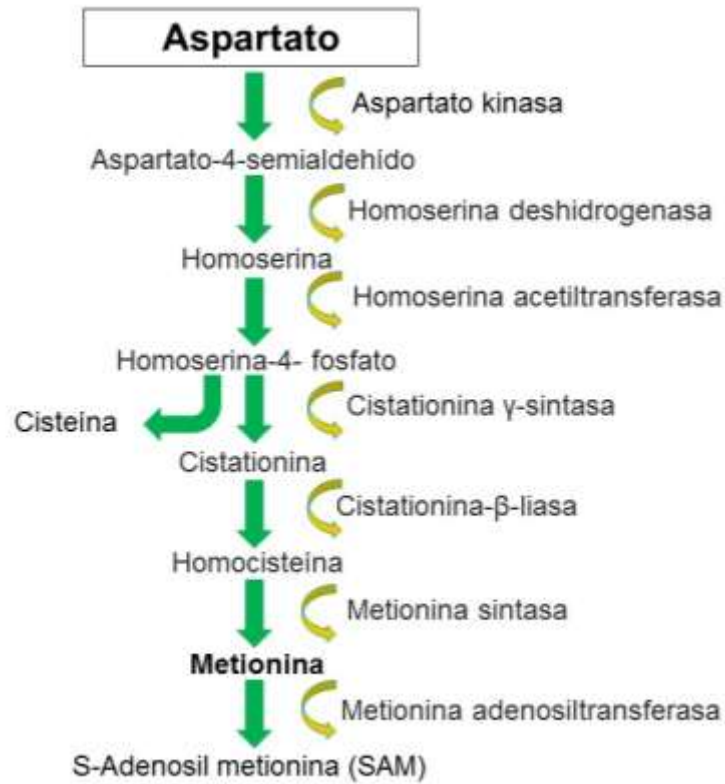


Figura 2. Ruta metabólica general de la metionina. Figura modificada de Coruzzi y Last (2000).

III. JUSTIFICACIÓN, OBJETIVOS E HIPÓTESIS.

3.1. Justificación.

El CIMMYT ha desarrollado maíces QPM, las cuales contienen mayores cantidades de lisina y triptófano, principalmente. Sin embargo, son todavía relativamente deficientes en otros aminoácidos, tales como metionina (Geevers y Lake, 1992; Glover, 1992). Una reducción de entre el 28 al 61% en el contenido de metionina se observó en algunos materiales QPM en relación a variedades normales de maíz (Scott *et al.*, 2004; Mbuya *et al.*, 2011).

Aunque se han llevado a cabo numerosos estudios para incrementar los niveles de metionina en plantas, se han encontrado limitantes asociadas a fenotipos desfavorables o baja acumulación final de este aminoácido (Amir *et al.*, 2002). Lo anterior puede deberse a que es parte de un sistema metabólico complejo el cual incluye, por ejemplo, el catabolismo de S-Adenosil-Metionina (SAM), reduciendo la cantidad de metionina, y la biosíntesis de metionina, regulada indirectamente por el nivel de SAM (Amir *et al.*, 2002). Otras fuentes para el incremento de metionina en plantas han sido la expresión de proteínas ricas en sulfuro por métodos de ingeniería genética, que expresan proteínas de almacenamiento ricas en metionina en la nuez de Brasil (*Bertholletia excelsa*), girasol (*Helianthus annuus*) (Galili *et al.*, 2005) o *Amaranthus hypochondriacus* (Chakraborty *et al.*, 2000).

En la actualidad, una combinación de mejoramiento tradicional y biotecnología está ganando lugar para alcanzar las características deseables en los cultivos. Métodos de selección recurrente también se encuentran como efectivos para alterar la concentración de metionina en granos de maíz (Scott *et al.*, 2008). Se han documentado algunos genes que codifican a proteínas de almacenamiento del

endospermo (proteínas de almacenamiento ricas en metionina) en líneas de maíz con alto contenido de metionina obtenidas por selección recurrente, cuya expresión es esencial para la acumulación de metionina (Ali *et al.*, 2011).

3.2. Objetivos.

- Establecer un método eficiente para la extracción de proteína de grano en maíz.
- Determinar los niveles de proteína en 277 genotipos de grano de maíz mediante el método eficiente determinado.
- Evaluar los niveles de metionina proteica en 277 genotipos de maíz mediante el biosensor específico para este aminoácido.

3.3. Hipótesis:

- Existe al menos un método eficiente para la cuantificación de proteína de grano de maíz.
- Se encontraran diferentes niveles de proteína en la colección de 277 genotipos de grano de maíz.
- Los niveles de metionina proteica en 277 genotipos evaluados mediante el biosensor específico para este aminoácido, permitirá categorizar dichos genotipos.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1. Material vegetal.

Se utilizaron semillas (granos) secas de maíz provenientes del Programa de Mejoramiento Genético del INIFAP. El estudio se realizó en 277 genotipos de maíz divididos en tres grupos independientes (sintéticos, criollos mejorados y líneas puras) con diferentes niveles de endogamia. El grupo de Sintéticos son materiales provenientes del INIFAP con tolerancia al frío, y provenientes de una selección de germoplasma templado y subtropical del programa de resistencia a sequía y calor, así también se incluyeron s del programa de aprovechamiento de germoplasma de Oaxaca (Cuadro 4). El material oaxaqueño fue sometido a un mejoramiento genético participativo y son representantes de las razas más importantes de dicho Estado. También en el presente estudio se incluyeron líneas puras del banco de germoplasma del CIMMYT.

Cuadro 4. Nombre, genealogía y características de los genotipos de maíz analizados.

Nombre / Genealogía	Programa de mejoramiento	Condición
CLQ-RCWQ10-1	CIMMYT	Línea Pura
CML-449-1	CIMMYT	Línea Pura
CML-264-1	CIMMYT	Línea Pura
CML-161-1	CIMMYT	Línea Pura
CML-491-1	CIMMYT	Línea Pura
ASIC2S1-25-B-1-B-1-42-2-1-BB-1-1	Tolerancia a Sequía Bajío INIFAP	Línea Pura
486-S2-01	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 486
486-S2-02	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 486
486-S2-03	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 486
486-S2-05	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 486
486-S2-06	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 486
486-S2-09	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 486
486-S2-10	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 486
486-S2-11	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 486
486-S2-14	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 486
486-S2-15	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 486
486-S2-16	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 486
486-S2-17	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 486
486-S2-18	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 486
486-S2-19	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 486
486-S2-20	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 486
486-S2-21	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 486
486-S2-22	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 486
486-S2-23	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 486
486-S2-27	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 486
486-S2-28	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 486
486-S2-29	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 486
486-S2-30	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 486
486-S2-31	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 486
486-S2-33	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 486
486-S2-35	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 486
486-S2-37	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 486
486-S2-38	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 486
486-S2-39	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 486
486-S2-41	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 486
486-S2-42	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 486
486-S2-45	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 486
486-S2-47	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 486
485+488S2-2	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488
485+488S2-3	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488
485+488S2-4	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488
485+488S2-10	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488
485+488S2-12	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488
485+488S2-14	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488
485+488S2-15	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488
485+488S2-20	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488
485+488S2-21	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488
485+488S2-22	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488
485+488S2-23	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488
485+488S2-24	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488
485+488S2-25	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488
485+488S2-26	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488
485+488S2-27	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488
485+488S2-29	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488
485+488S2-31	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488
485+488S2-32	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488
485+488S2-34	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488
485+488S2-36	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488

Nombre / Genealogía	Programa de mejoramiento	Condición
513-517-S2-62	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 513-517
513-517-S2-64	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 513-517
513-517-S2-65	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 513-517
513-517-S2-66	Tolerancia a Frío INIFAP	Línea Segregante S3 del Sintético 513-517
Y05LP1534-1	Tolerancia a Sequía y Calor INIFAP	Línea Pura
T-39-1	Tolerancia a Sequía y Calor INIFAP	Línea Pura
CML-340-1	CIMMYT	Línea Pura
CML-495-1	CIMMYT	Línea Pura
Y10CST1-1	Tolerancia a Sequía y Calor INIFAP	Línea Pura
ST30M58-1	Tolerancia a Sequía y Calor INIFAP	Línea Pura
ST-35-1-9-B4-3B-1-M12-1	Tolerancia a Sequía y Calor INIFAP	Línea Pura
Y10T12M66-1	Tolerancia a Sequía y Calor INIFAP	Línea Pura
Y05P211-1	Tolerancia a Sequía y Calor INIFAP	Línea Pura
Y90B80707-1	Tolerancia a Sequía y Calor INIFAP	Línea Pura
Y902908-1	Tolerancia a Sequía y Calor INIFAP	Línea Pura
Y9002221-2-M14-1	Tolerancia a Sequía y Calor INIFAP	Línea Pura
T-43-1	Tolerancia a Sequía y Calor INIFAP	Línea Pura
Oax-823-1	INIFAP aprovechamiento de Germoplasma Oax.	Población Criolla Mejorada
Oax-827-1	INIFAP aprovechamiento de Germoplasma Oax.	Población Criolla Mejorada
Oax-832-1	INIFAP aprovechamiento de Germoplasma Oax.	Población Criolla Mejorada
Oax-834-1	INIFAP aprovechamiento de Germoplasma Oax.	Población Criolla Mejorada
Oax-838-1	INIFAP aprovechamiento de Germoplasma Oax.	Población Criolla Mejorada
Col-36-1	INIFAP aprovechamiento de Germoplasma Oax.	Población Criolla Mejorada
Col-45-1	INIFAP aprovechamiento de Germoplasma Oax.	Población Criolla Mejorada
Col-58-1	INIFAP aprovechamiento de Germoplasma Oax.	Población Criolla Mejorada
Col-62-1	INIFAP aprovechamiento de Germoplasma Oax.	Población Criolla Mejorada
VC-39-1	INIFAP aprovechamiento de Germoplasma Oax.	Población Criolla Mejorada
VC-118-1	INIFAP aprovechamiento de Germoplasma Oax.	Población Criolla Mejorada
VC-134-1	INIFAP aprovechamiento de Germoplasma Oax.	Población Criolla Mejorada
VC-145-1	INIFAP aprovechamiento de Germoplasma Oax.	Población Criolla Mejorada
VC-151-1	INIFAP aprovechamiento de Germoplasma Oax.	Población Criolla Mejorada
VC-152-1	INIFAP aprovechamiento de Germoplasma Oax.	Población Criolla Mejorada
VC-164-1	INIFAP aprovechamiento de Germoplasma Oax.	Población Criolla Mejorada
Conejito Mejorado-1	INIFAP aprovechamiento de Germoplasma Oax.	Población Criolla con Introgresión de germoplasma mejorado
((C-60 x Pool-17) x (C-60 x Pool-18))-1	INIFAP aprovechamiento de Germoplasma Oax.	Población Criolla con Introgresión de germoplasma mejorado
((C-67 x Pool-25 x (C-67 x Pool-21) x Pantera Y)-1	INIFAP aprovechamiento de Germoplasma Oax.	Población Criolla con Introgresión de germoplasma mejorado
((C-67 x Pool-25 x (C-67 x Pool-21))-1	INIFAP aprovechamiento de Germoplasma Oax.	Población Criolla con Introgresión de germoplasma mejorado

4.2. Localización del sitio experimental.

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Bioquímica del Posgrado en Botánica del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, ubicado en Texcoco, Estado de México (19°29´N, 98°54´W) y 2250 msnm.

4.3. Diseño experimental.

Se utilizó un diseño completamente al azar, la unidad experimental fue un lote de 20 granos por genotipos de maíz estudiado, con cuatro repeticiones por genotipo de maíz (cada repetición consistió de 100 mg de harina desgrasada), formando un universo de 277 genotipos. La comparación de medias fue analizada por una prueba de rangos de Kruskal-Wallis se utilizó el paquete estadístico SAS Statistical Analysis Software v. 9.4. (SAS Institute, Cary, NC) con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$. Para los datos obtenidos del análisis de proteína y metionina de los genotipos analizados divididos en los tres grupos de maíz, sintéticos, criollos mejorados y líneas puras, se realizó pruebas de ajuste de bondad de la distribución de probabilidad de los datos.

4.4. Obtención de harina de maíz.

Se molieron 20 semillas secas por cada una de los genotipos de maíz estudiados, se realizó una primera molienda con un molino eléctrico para Nixtamal de 1 HP y, posteriormente una molienda con un molino analítico A 11 Basic IKA®, esto con la finalidad de obtener partículas más pequeñas. Posteriormente se pesaron 3 gramos de harina y se desgrasó con 15 mL de bencina de petróleo en agitación a temperatura ambiente ($24 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$) durante 3 horas, después se realizó

un filtrado con bomba de vacío para separar el solvente de la harina y se dejó secar a temperatura ambiente ($24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$) por 24 horas (Anexo 2).

Posteriormente la harina seca se maceró en un mortero de porcelana y se, pasó por un tamiz No. 60 para obtener un tamaño de partícula de $250\text{ }\mu\text{m}$.

4.5. Obtención del extracto proteico.

Las harinas de los distintos tipos de maíz obtenidas se secaron en una estufa (Precision Scientific) a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Posteriormente se colocaron en un desecador de vidrio para asegurar que estas no absorbieran humedad. Se colocaron 100 mg de harina en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se les adicionó 0.9 mL de buffer de fosfatos 0.2 M a pH 7.6 (previamente seleccionado como el buffer más eficiente en la extracción de este tipo de proteínas, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Anexo 3 C); se agitaron en vortex durante 30 segundos con el fin de que el buffer tuviera mayor contacto con la muestra y se dejó reposar durante 5 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Después los tubos se centrifugaron a 13,000 rpm durante 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El sobrenadante obtenido se colocó en un nuevo tubo eppendorf estéril y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.6. Cuantificación de proteína soluble.

El método seleccionado por su eficiencia y rapidez fue el descrito por Bradford (1976), las muestras se hicieron por cuadruplicado en celdas de semi-micro de la marca Brand con un volumen nominal de 1 mL, para el cálculo de la concentración de proteína soluble en mg mL^{-1} se consideró una curva estándar de albumina (2 mg mL^{-1}) (Anexo 4).

4.7. Crecimiento de cepas bacterianas (biosensor).

Se usaron dos cepas de *Escherichia coli*, para el ensayo de la delimitación de la presencia de metionina en las muestras de maíz. Estas cepas fueron proporcionadas por el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, del Instituto de Biotecnología, de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las cepas fueron K-12 subcepa MG1655 ECK3931 auxotrófica para metionina en adelante MetB⁻, resistente a la kanamicina (30 µg mL⁻¹), y la cepa silvestre K-12 subcepa MG1655 (K12) sin resistencia a kanamicina. Las cepas se reactivaron en medio sólido Luria Bertani (LB) (Anexo 5). Los cultivos se incubaron a 37°C durante 24 horas, después las cajas de cultivo se almacenaron a 4 °C.

4.8. Preparación del inóculo líquido.

El inóculo líquido se preparó un día antes del sembrado en cajas Petri. El medio de cultivo mínimo M9 (Anexo 6) fue preparado cada vez que se hizo el sembrado en cajas Petri. Se elaboró una solución madre del aminoácido metionina (marca Sigma- Aldrich) al disolver 1 mg mL⁻¹ en agua destilada estéril con el propósito de alimentar a la bacteria, por cada 10 mL de medio de cultivo mínimo líquido M9, se añadieron 240 µL de metionina de la solución madre de aminoácido (Ali *et al.*, 2011). Luego, se agregó 200 µL del inóculo líquido al medio de cultivo M9 que contenía la metionina y se dejó incubar a 37 °C y en agitación a 225 rpm durante la noche.

4.9. Ensayo de proteína para determinar la limitación de los niveles de metionina en muestras de extracto proteico de harinas de maíz.

Se pesaron 100 mg de harina de cada genotipo y se colocaron en tubos eppendorf de manera individual. Las harinas se esterilizaron a 121 °C por 20 minutos, posteriormente a cada muestra se le agregaron 0.9 mL de buffer de fosfatos pH 7.6 frío y estéril; cada tubo se agitó en vortex durante 30 segundos y se dejó incubar por espacio de 5 minutos a 4 °C, posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El extracto proteico (sobrenadante) obtenido se colocó en un nuevo tubo eppendorf estéril y se guardó a -20 °C.

Del extracto proteico obtenido se tomó una alícuota de 200 µL de proteína más 40 µL de pepsina a una concentración de 0.8 mg mL⁻¹ para realizar una hidrólisis enzimática y romper los enlaces de la proteína y hacerla más accesible a la bacteria (1:5 V/V) (Anexo 7). La reacción, se dejó en agitación a 225 rpm y 37 °C a durante 14 horas tiempo necesario para que la enzima realizara la hidrólisis. Posteriormente la muestra se centrifugó a 5320 rpm a 4 °C por 20 minutos, el sobrenadante obtenido se colocó en un eppendorf estéril, se agregó un volumen equivalente a 25 µg de proteína hidrolizada a cada tubo eppendorf con 0.9 mL de medio de cultivo liquido M9, más 20 µL de inóculo bacteriano fresco, se incubó a 37 °C a 225 rpm durante 18 horas que es tiempo en que la bacteria alcanza la fase estacionaria, y se midió la absorbancia a 595 nm para conocer el crecimiento bacteriano (Anexo 8).

4.10. Determinación de monómeros de metionina por HPLC.

Se tomaron 500 µL de proteína hidrolizada con pepsina y se centrifugó a 14 000 rpm durante 2 minutos, el sobrenadante se tomó con una jeringa estéril y se filtró con un disco Millipore de Nylon de 0.45 µm, para eliminar impurezas.

Para la separación del monómero metionina se utilizó un cromatógrafo de líquido de alta eficiencia (Waters Modelo 1525), detector UV/ visible (Waters Modelo 2489), columna marca Grace (Vydac 218TP C18 5 μm , 250 x 4.6 mm, tipo femenino) Software Waters 2.0. Se empleó un flujo de eluyente 0.8 mL min^{-1} , con la siguiente composición: buffer A: agua tetradesilada 1 L + 0.12 % ácido trifluoroacético (TFA) y buffer B: acetonitrilo 1 L + 0.10 % ácido trifluoroacético (TFA) (Anexo 9), y un tiempo de elución 60 minutos, con una longitud de onda de absorción de 230 nm, longitud de onda máxima de absorción del enlace peptídico. Se utilizó el estándar de metionina (Sigma- Aldrich), para identificar el tiempo de retención de la metionina, para de esta manera poder diferenciar e identificar el pico dentro del cromatograma.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1. Métodos de solubilidad de proteína con diferentes buffers de fuerza iónica variable y condición física de la harina.

Los resultados presentados refieren al contenido de proteína del grano completo, sin separar endospermo ni embrión. Previo al estudio con los 277 genotipos de maíz, se realizó un ensayo preliminar con el genotipo H-599C (maíz tipo QPM), que tuvo como objetivo la selección de la condición física de la harina con mayor pureza y la elección del método y buffer de extracción óptimos para proteína, para ello se realizó un experimento factorial (2^5) en un diseño experimental completamente al azar. La condición física fue harina desgrasada y harina sin desgrasar (DS y SD, respectivamente), y el uso de cinco diferentes buffers de extracción de proteínas (B1: Tris-HCl 40 mM pH 8.5 sin β -mercaptoetanol; B2: Tris-HCl 40 mM pH 8.5 + β -mercaptoetanol 15 mM; B3: buffer de Fosfatos 0.2 M pH 7.6; B4: buffer de cloruro de potasio 50 mM pH 2.0; B5: hidrólisis enzimática con pepsina (0.8 mg mL^{-1}) (Anexo 3).

Los resultados obtenidos con la harina del genotipo H-599C indicaron diferencias altamente significativas ($p \leq 0.05$) entre la condición física de la harina y los buffers de extracción de proteína. La combinación de SD*B2 obtuvo el valor más alto de extracción con 14.46 mg g^{-1} de peso seco (PS), seguido de las combinación SD*B1 y SD*B3 con valores de extracción de proteína de 13.37 y 12.95 mg g^{-1} PS, respectivamente. Mientras que la combinación DS*B4 obtuvo el valor más bajo en la extracción con 2.76 mg g^{-1} PS (Cuadro 5).

Cuadro 5. Valores obtenidos de la evaluación de los factores condición física de la harina de maíz y buffers de extracción con diferente fuerza iónica y los tratamientos producto de la combinación

Factor		Combinación		Concentración de proteína (mg g ⁻¹ PS)	
CF (mg g ⁻¹ PS)	Buffer (mg g ⁻¹ PS)				
DS	8.73 b	B1	12.26 a	DS*B1 SD*B1	11.16 d 11.58 cd
		B2	13.02 a	DS*B2 SD*B2	13.37 ab 14.46 a
		B3	12.84 a	DS*B3 SD*B3	12.73 bc 13.95 bc
SD	10.10 a	B4	3.37 c	DS*B4 SD*B4	2.76 f 3.97 f
		B5	5.62 b	DS*B5 SD*B5	5.45 e 5.75 e

CF: condición física; DS: harina de maíz desgrasada; SD: harina de maíz sin desgrasar; B1: Tris-HCl 40 mM pH 8.5 sin β -mercaptoetanol; B2: Tris-HCl 40 mM pH 8.5 + β -mercaptoetanol 15 mM; B3: buffer de fosfatos 0.2 M pH 7.6; B4: buffer de cloruro de potasio 50 mM pH 2.0; B5: hidrólisis enzimática con pepsina 0.8 mg mL⁻¹. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $p \leq 0.05$).

La de harina de maíz SD presentó un valor de extracción de 10.10 mg g⁻¹ PS, el cual fue significativamente más alto que la harina DS (8.73 mg g⁻¹ de PS). Sin embargo, se recomienda realizar el desgrasado para evitar interferencia lipídica en el análisis de proteína (Conde y Ortega, 1990). Los buffers B1, B2 y B3 mostraron ser estadísticamente similares para la extracción de proteína, con valores de 12.26 a 13.02 mg g⁻¹ de PS. Se sabe que la solubilidad de las proteínas depende del tipo de aminoácidos que contengan y de la polaridad de los mismos, ya que el proceso de la solubilización implica que las moléculas de proteínas estén separadas y dispersadas en el disolvente y además que ejerzan una máxima interacción con el líquido que las rodea (García, 1997).

Al respecto algunas proteínas pueden ser desnaturalizadas por el β -mercaptoetanol debido a su capacidad para separar los puentes de disulfuro, lo que explicaría porque los valores obtenidos son diferentes respecto al mismo buffer sin este compuesto. Por lo anterior, se optó por la elección del buffer de fosfatos 0.2 M pH 7.6 (B3) debido a que este no interfiere con el reactivo de Bradford, además de ser de fácil preparación y también no interfiere en la composición del medio de cultivo M9 que se utilizó para el análisis de delimitación de los niveles de metionina en los extractos proteicos.

5.1.1. Métodos de cuantificación de proteína.

Los métodos empleados para la cuantificación de proteína (Kjeldahl y Bradford), fueron similares. Estos resultados son similares a los reportado por Mendoza *et al.* (2012) para el genotipo H-599C. El método de Bradford en comparación de Kjeldahl representa una forma sencilla, versátil y rápida para obtener datos que son reproducibles en la cuantificación de proteína, además de que pocas sustancias interfieren en su determinación.

Al respecto, Stoscheck (1990) mencionó que el criterio para la selección de un método de cuantificación de proteínas está basado usualmente en la conveniencia, el rango de sensibilidad, la cantidad de muestra necesaria para hacer las pruebas, y los detalles del procedimiento. En el método de Kjeldahl no se presenta una diferencia en el valor obtenido, a pesar de que se evaluaron dos condiciones físicas de harina (SD y DS) obteniéndose valores de 9.3 y 9.2 % respectivamente, para el genotipo H-599C. En el caso del método de Bradford este mostró ser sensible a la condición en la que se encuentre la harina, es decir, si está o no desgrasada, en

este caso los valores más altos en la cuantificación de proteína la presenta la harina sin desgrasar (Cuadro 6).

Los valores obtenidos para el contenido de proteína determinado por ambos métodos se encuentran dentro del intervalo reportado para maíces que han sido mejorados (9.24 a 13.80 % de proteína en base seca) (Vera *et al.*, 2012).

Cuadro 6. Cuantificación de proteína por los métodos de Kjeldahl y Bradford en dos condiciones físicas de harina de maíz.

Método	Genotipo	Condición	Valor Obtenido (%)
Kjeldahl	H599C	DS	9.3
		SD	9.2
Bradford		DS	12.74
		SD	13.04

DS= harina de maíz desgrasada; SD= harina de maíz sin desgrasar.

5.1.2. Determinación de proteína presente en la colección de maíz.

La concentración de proteína de los 277 genotipos de maíz analizados se dividió en nueve clases clasificadas según el contenido de proteína en grano, presentado valores medios entre 7.48 a 16.48 mg g⁻¹ de PS, agrupándose el 61 % de la colección en los valores de 10.85 a 13.10 mg g⁻¹ de PS (Figura 3).

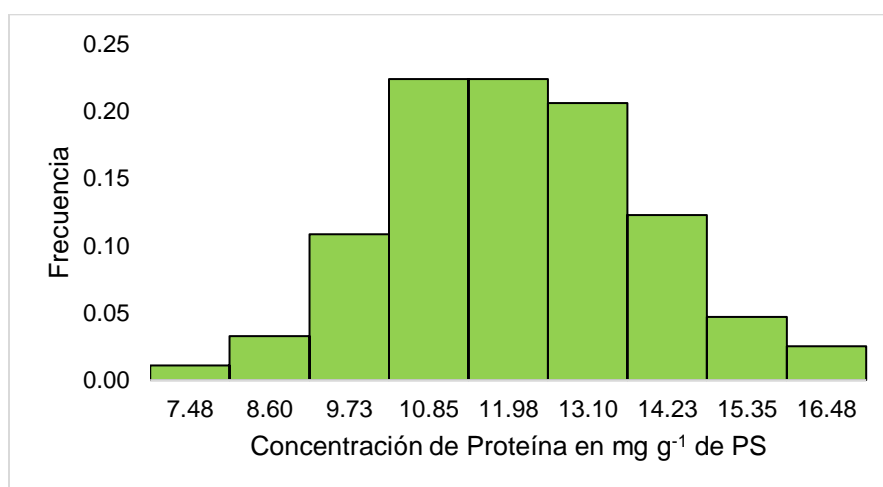


Figura 3. Distribución de frecuencias en la concentración de proteína de 277 genotipos de maíz.

El grupo conformado por maíces sintéticos mostró los valores más altos en el contenido de proteína con un valor máximo de 17.04 mg g⁻¹ de PS siendo este valor obtenido por el genotipo 490-S2-S24 (sintético), y un valor medio para este grupo de 12.19 mg g⁻¹ de PS. Este grupo presenta una gran variación en la concentración de proteína al ser el más grande analizado y conformado por 238 genotipos. El grupo conformado por las líneas puras y los criollos mejorados obtuvieron valores medios de proteína muy similares (11.82 y 11.76 mg g⁻¹ de PS, respectivamente) (Figura 4). El genotipo con mayor contenido de proteína para el grupo de las líneas puras fue el CML-161-1 con un valor de 14.73 mg g⁻¹ de PS y para el grupo de los criollos mejorados fue el genotipo Col-62-1 con un valor de 13.26 mg g⁻¹ de PS. Las medias de los grupos mostraron ser estadísticamente diferentes entre grupos.

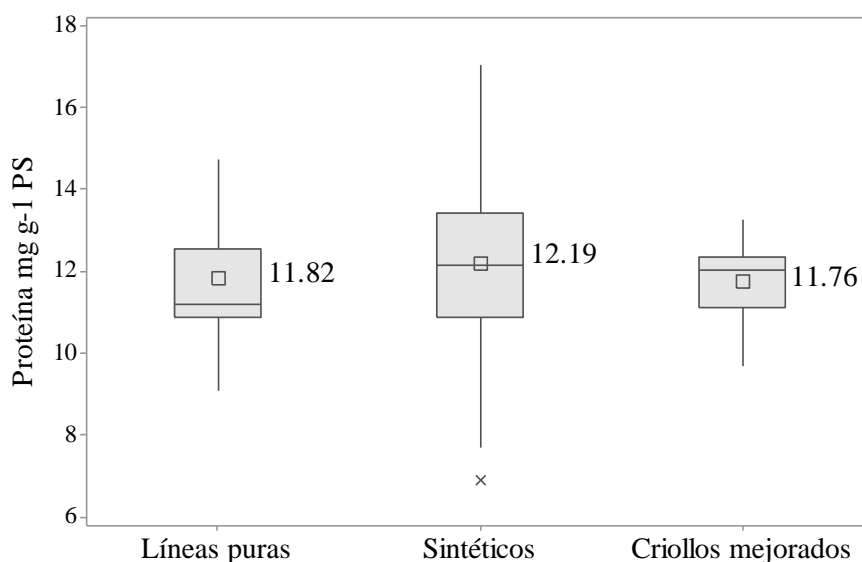


Figura 4. Contenido de proteína en tres grupos de maíz, líneas puras, sintéticos y criollos mejorados. □= valor promedio del grupo; x= genotipo con bajo contenido de proteína.

Los valores de proteína soluble obtenidos para el total de los genotipos analizados se muestran en el anexo 1. Los valores observados de concentración de proteína se encuentran dentro de la variación descrita por otros autores que han trabajado con diferentes razas y variedades de maíces, tanto en criollos como QPM (Salinas *et al.*, 2013; Vázquez *et al.*, 2010). No obstante, cabe destacar que el 8 % de los genotipos de la colección de este estudio sobrepasó los valores reportados por Salinas *et al.* (2013) y Vázquez *et al.* (2010), encontrando desde 15.35 hasta 16.48 mg g⁻¹ PS. El contenido de proteína en grano puede variar según las condiciones de humedad durante el desarrollo del cultivo, especialmente en la etapa de floración (Salinas y Pérez, 1997; Pérez *et al.*, 2012).

Solo 1 % de los genotipos analizados de la colección tuvieron valores “bajos” en el contenido de proteína en comparación con maíces mejorados tipo QPM, con un valor medio de 7.48 mg g⁻¹ de PS. Esto puede deberse a factores como el método de lectura de las muestras, los valores de absorbancia deben de ser transformados en contenido de proteína en función a la curva estándar del método empleado, es decir que se puede cometer el error que a mayor absorbancia, mayor será el contenido de proteína (Cerna *et al.*, 2010).

5.2. Crecimiento bacteriano en medio mínimo M9.

La Figura 5 muestra las curvas de crecimiento de dos cepas bacterianas de *E. coli*, la auxotrófica de metionina (MetB⁻); es decir deficiente únicamente para el aminoácido metionina, y la cepa silvestre K12, ambas crecidas en medio mínimo M9, y ambas con dos condiciones de crecimiento: con suplemento de metionina al medio (CS) y sin suplemento de este aminoácido (SS).

El crecimiento de los cultivos se determinó por medio de la medición de la densidad óptica (DO) para cada tratamiento, realizándose en intervalos de dos horas hasta completar 24 horas a 590 nm, este tiempo fue suficiente para que *E. coli* alcance su máxima etapa exponencial y alta densidad poblacional o biomasa. De estos resultados se puede destacar que las cepas que presentan crecimiento óptimo son la MetB⁻ y la K12 suplementadas con metionina, alcanzando valores de densidad máxima de 0.231 y 0.212 DO, respectivamente. Mientras que la cepa MetB⁻ sin el suplemento de metionina (SS) presentó un crecimiento pobre (0.092 DO), este comportamiento no fue de la misma manera para la cepa silvestre K12 SS, la cual es independiente de la presencia o ausencia de metionina. Estos resultados confirman por una parte que la cepa de *E. coli* auxotrófica de metionina no tiene capacidad de sobrevivir sin este aminoácido y por otro lado se demuestra que la cepa es capaz de responder eficientemente a concentraciones exógenas de metionina, lo que concuerda con lo reportado con Froelich *et al.* (2002).

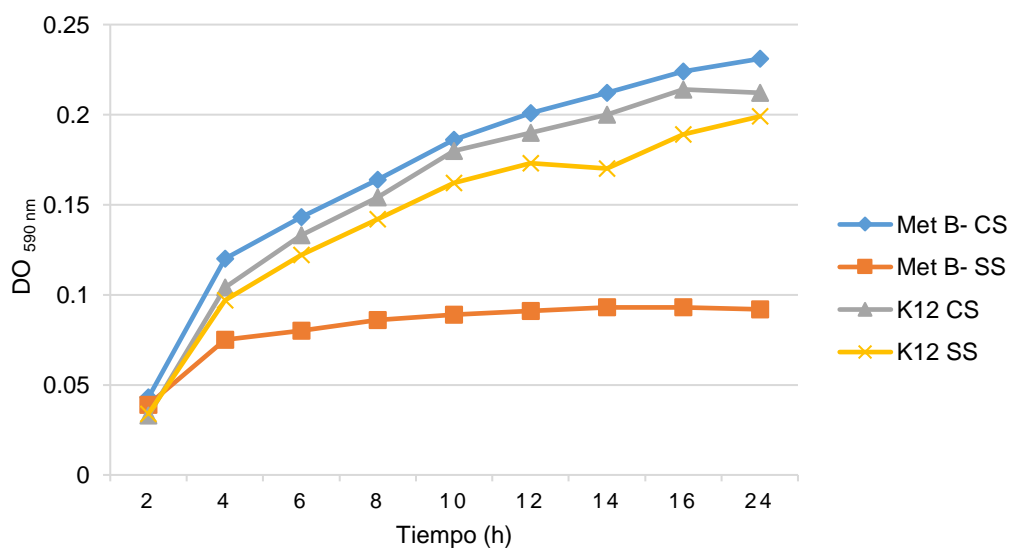


Figura 5. Crecimiento de las cepas de *E. coli* auxotrófica (MetB⁻) y silvestre (K12) en medio minino M9 con o sin metionina. CS= con metionina, SS= sin metionina.

5.2.1. Límite de detección de metionina microbiano.

Se determinó el límite de la detección o el grado de afinidad de la cepa mutante (MetB-) auxotrófica de metionina a través de una curva de crecimiento con diferentes concentraciones de metionina (5, 10, 15, 25, 50 y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Las absorbancias obtenidas fueron normalizadas, es decir que se restó la DO de la concentración de 0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de metionina debido la biomasa inicial del inóculo (Figura 6).



Figura 6. Incremento de biomasa en medio de cultivo mínimo M9 con diferentes concentraciones de metionina.

En la Figura 7 se observa el crecimiento del mutante MetB- a las diferentes concentraciones de metionina exógena, mostrando así un valor de $r^2 > 0.82$. Se observó que las concentraciones de 50 y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de metionina reflejaron valores de 0.891 y de 1.127, respectivamente, estas DO fueron altas, y pueden indicar concentraciones poco confiables debido al limitado paso de energía radiante del espectrofotómetro. Por lo que se decidió de utilizar la concentración de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ que mostró un valor de 0.778 DO, además de ser un volumen de alícuota de

fácil manejo comparada con los volúmenes de las concentraciones más pequeñas (5, 10 y 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$). La concentración de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de metionina fue usada como referencia para determinar los niveles de biodisponibilidad de metionina en los extractos proteicos a través del uso del biosensor auxotrófico de metionina.

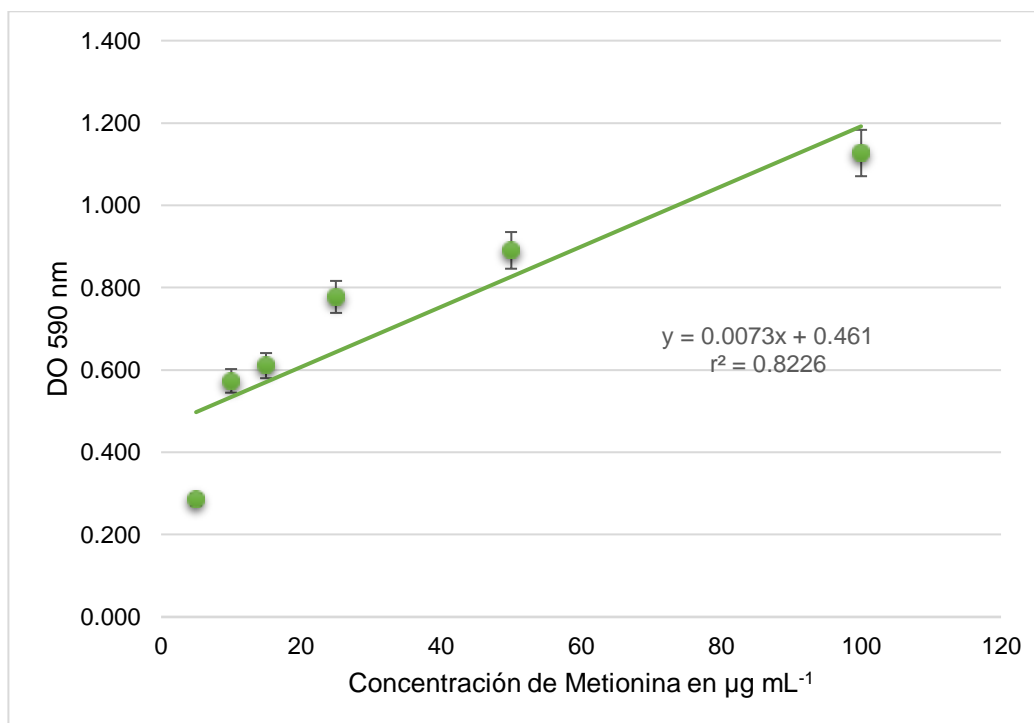


Figura 7. Curva estándar de metionina para determinar el límite mínimo de detección de la cepa mutante MetB- auxotrófica de metionina.

Aunque se han realizado estudios previos empleando diferentes mutantes auxotróficos de lisina o metionina Chalova *et al.*, 2006; Zabala *et al.*, 2004; Froelich *et al.*, 2002, y no hay un estudio que indique o especifique una concentración conocida de proteína para la evaluación de los niveles de biodisponibilidad de aminoácido. De los cuidados que se deben de tomar en consideración al usar este método es que una alta densidad (turbidez) en el medio de cultivo interfiere con las lecturas de DO del crecimiento bacteriano, lo que conduce a una subestimación de

la DO y por consiguiente, a las concentraciones que se determinan (Chalova *et al.*, 2004).

5.2.2. Modelo de crecimiento bacteriano auxotrófico de metionina.

La respuesta de la cepa de *E. coli* MetB⁻ (biosensor) a diferentes concentraciones de metionina adicionadas al medio mínimo M9 se muestra en la figura 8. Se obtuvo un coeficiente de determinación de $r^2 > 0.97$ en respuesta a la DO después de 18 horas de incubación. Las tasas de crecimiento de la cepa de *E. coli* auxotrófica de metionina fueron significativas ($p \leq 0.05$) y diferentes cuando las concentraciones de metionina se incrementaron de manera gradual (0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) en medio mínimo M9. La cepa mutante presentó un comportamiento de crecimiento lineal y aumento su biomasa en respuesta al incremento en la concentración del aminoácido en el medio de cultivo, por lo que la densidad óptica se ve también afectada en este comportamiento.

Esto mismo ha sido observado en otros estudios donde se han empleado mutantes de *E. coli* auxotrófico de algún aminoácido en particular (Díaz *et al.*, 1999; Chalova *et al.*, 2006, Chalova *et al.*, 2010). Esta tendencia en el crecimiento indica que la cepa auxotrófica ha agotado sus reservas internas de metionina, y tiene que optar por el consumo de nutrientes presentes en el medio de cultivo, y es en este punto que la cepa bacteriana está lista para poder usarse para la cuantificación de este aminoácido (Díaz *et al.*, 2002).

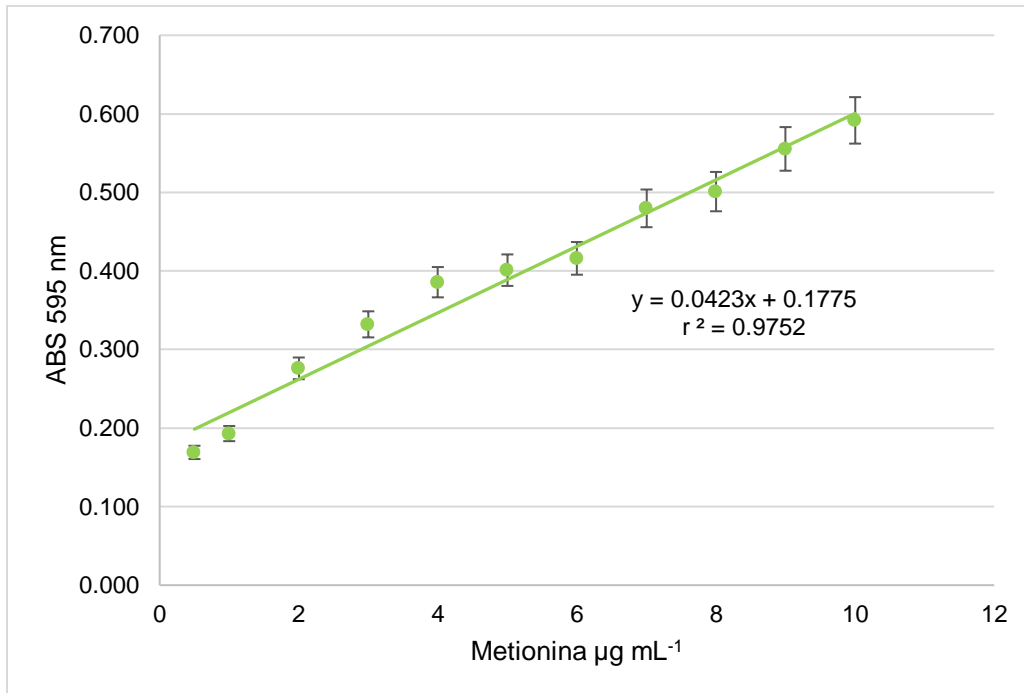


Figura 8. Curva estándar de metionina en el crecimiento bacteriano de la cepa auxotrófica de metionina en medio de cultivo M9 (MetB⁻).

5.3. Cuantificación de la biodisponibilidad de la metionina en extractos proteicos hidrolizados de maíz, utilizando una cepa de *E. coli* auxotrófica de metionina (biosensor).

Los valores obtenidos de la concentración de metionina en la colección de 277 genotipos de maíz analizados fueron diversos y estuvieron en función del genotipo, de tal manera que la colección se distribuyó en nueve clases con base en la concentración de metionina. Los datos obtenidos presentaron una distribución con una tendencia hacia valores bajos. Más del 70 % de la población de la colección estudiada presentó valores “bajos” en el intervalo de 0.66 a 2.88 µg mL⁻¹ de metionina y mientras que 18 % de los genotipos se agrupó en valores central “medio” en el rango de 3.99 a 6.21 µg mL⁻¹ mientras que sólo 5 % de población mostró valores “altos” (7.32 a 9.55 µg mL⁻¹) (Figura 9).

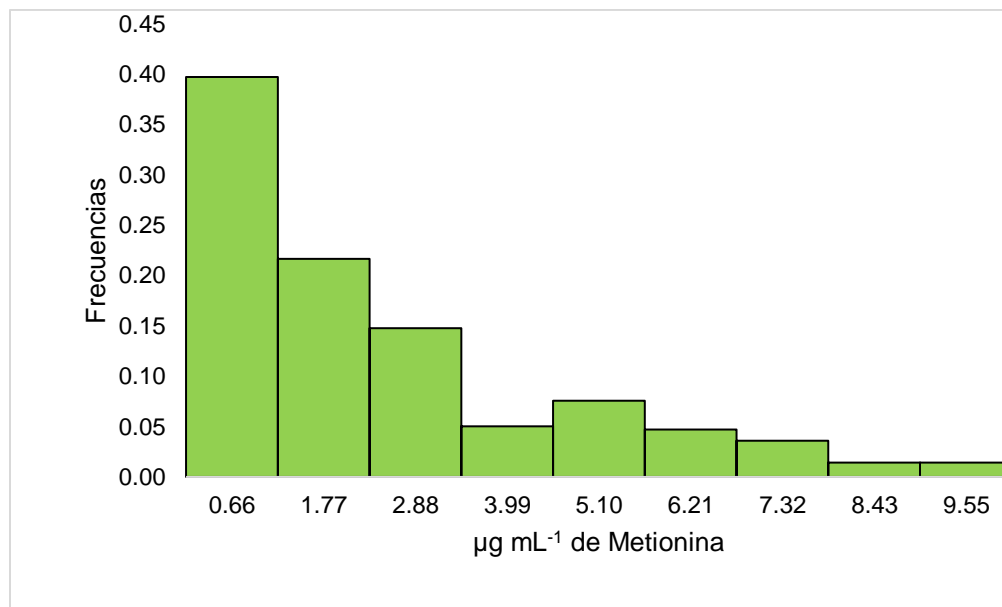


Figura 9. Distribución de frecuencias en la concentración de metionina de 277 genotipos de maíz.

Los grupos de maíces conformados por las líneas puras y los maíces sintéticos presentaron valores promedio de metionina de 2.10 y 2.59 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Mientras para el grupo conformado por el grupo de criollos mejorados se obtuvo un valor medio de 0.72 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de metionina (Figura 10). Las medias de los grupos fueron analizadas de manera independiente por una prueba de rangos de Kruskal-Wallis con un valor de $p \leq 0.05$, siendo estadísticamente diferentes entre grupos.

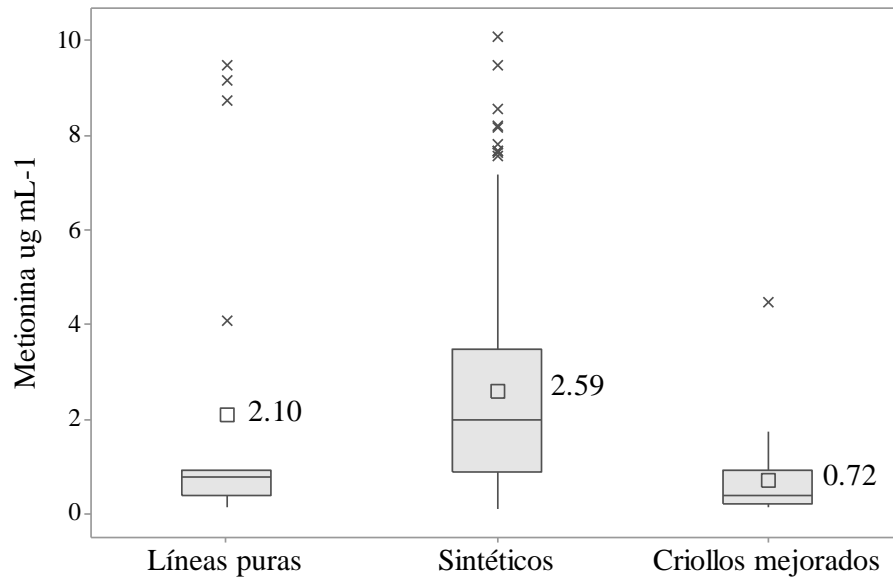


Figura 10. Contenido de metionina en tres grupos de maíz, líneas puras, sintéticos y criollos mejorados. □= Valor promedio del grupo; x= genotipo con contenido prometedor de metionina.

Debido a que los datos agrupados del contenido de metionina no siguen una distribución normal, se realizó un análisis exploratorio de la distribución empírica de los datos, buscando el mejor modelo de distribución teórica que se ajustara a la distribución de los datos obtenidos, para ello se evaluaron tres modelos de distribución de probabilidad que fueron: Lognormal, Pareto y Weibull. En la figura 11 se observa que el mejor modelo de distribución teórica que se ajusta a la distribución de los datos observados es el modelo que corresponde a Pareto.

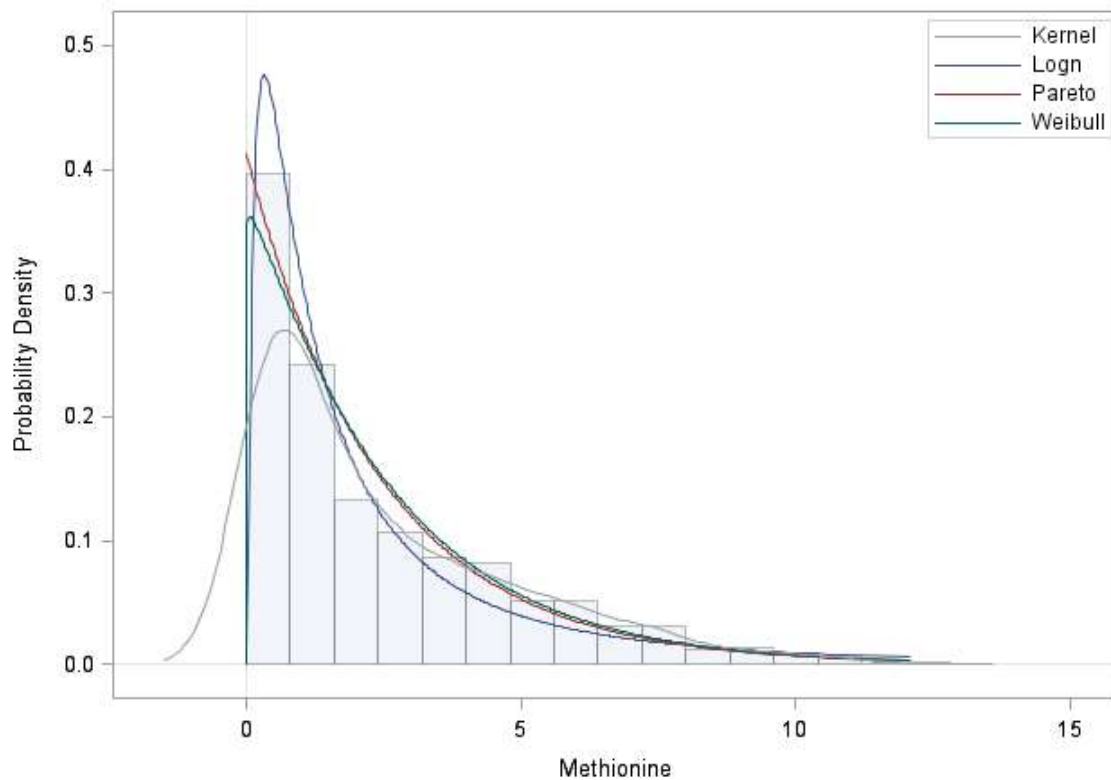


Figura 11. Función de distribución de probabilidad de la distribución empírica de los datos de metionina en la colección de 277 genotipos de maíz y prueba de modelos teóricos de distribución de probabilidad Lognormal, Pareto y Weibull.

Para corroborar la elección del mejor modelo probabilístico se empleó el criterio de información Akaike (AIC), el cual está basado en el principio de mínima longitud, que está determinado por el menor valor AIC, el cual confirma que el mejor modelo de ajuste es el Pareto (Cuadro 7). El criterio AIC para la elección de modelos probabilísticos ha crecido significativamente en la actualidad debido a la sensibilidad del criterio a la elección del mejor modelo con el menor número de supuestos. Dentro de las aplicaciones para este criterio se han empleado en diferentes áreas de la ciencia, como en ecología (Ponciano *et al.*, 2009), bioinformática (Edwards *et al.*, 2009) y biomédicas (Xiaobo *et al.*, 2005).

Cuadro 7. Valores de AIC obtenidos por la prueba de bondad de ajuste de los modelos de distribución probabilística.

Modelo Probabilístico	AIC
Lognormal	20095
Pareto	4184
Weibull	19963

El modelo de distribución Pareto presenta los siguientes argumentos para el cálculo de probabilidad acumulada:

X: es una variable aleatoria numérica (Concentración de Metionina).

α : parámetro numérico de forma.

k: parámetro numérico de escala.

Si X pertenece al dominio de la variable de la distribución Pareto, entonces la probabilidad de que X sea mayor que un valor de x está determinada por la siguiente ecuación:

$$F(X) = (\text{'Pareto', } x, \alpha, k) = \begin{cases} 0 & x < k \\ 1 - \left(\frac{k}{x}\right)^\alpha & x \geq k \end{cases}$$

Los genotipos con el mayor contenido de metionina para el grupo de las líneas puras fueron ASIC2S1-25-B1-B-42-2-1-BB-1-1 y CML-449-1, con 9.18 y 9.48 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, con una probabilidad acumulada de ser mayor o igual a la variable aleatoria de 0.85 para ambos genotipos. Para el grupo de maíces sintéticos los genotipos que obtuvieron los valores más altos fueron 486-S2-02 y 489-S2-3, con 9.50 y 10.10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente con una probabilidad acumulada de ser mayor o igual a la variable aleatoria de 0.86 para ambos genotipos.

Mientras que para el grupo de criollos mejorados el genotipo que presentó el valor más alto fue VC-152-1, con un contenido de metionina de $4.47 \mu\text{g mL}^{-1}$, con una probabilidad acumulada de ser mayor o igual a la variable aleatoria de 0.45. En la Figura 12 se observa la distribución de probabilidad teórica Pareto y la distribución empírica de los datos obtenidos en la concentración de metionina de 277 genotipos analizados, siendo X cualquier valor de la concentración de metionina que se encuentre en la distribución de probabilidad y x el valor de concentración al que se desea calcular la probabilidad de obtenerlo dentro de la distribución de los datos.

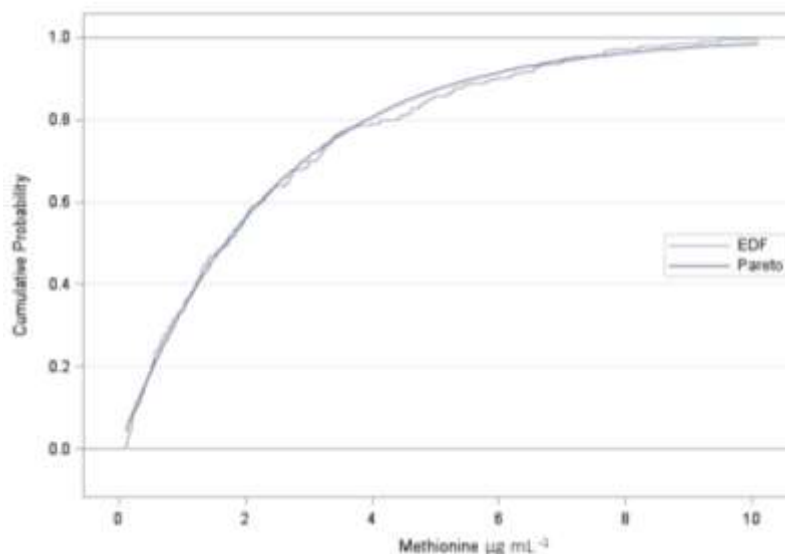


Figura 12. Gráfica de distribución de probabilidad acumulada Pareto y distribución empírica, en la concentración de metionina en la colección de 277 genotipos de maíz analizados. EDF= función de distribución empírica.

Los maíces desarrollados a través del fitomejoramiento para síntesis de aminoácidos esenciales como los QPM que son ricos en lisina y triptófano conferido por la mutación del gen *o2*, están inversamente correlacionados con la dureza del endospermo, es decir a mayor dureza de este menor contenido de triptófano. De la misma manera, el germoplasma que contiene la mutación del gen *o2/o2*

(homocigoto recesivo) presenta niveles más bajos de metionina en comparación con el germoplasma que contiene el gen *O2/O2* (homocigoto dominante) independientemente de la dureza del endospermo (Scott *et al.*, 2004). El producto del gen *o2* es responsable de la acumulación de zeínas, particularmente de la fracción proteica de δ (delta) zeínas las cuales son ricas en metionina, la presencia de gen recesivo puede estar favoreciendo que las variedades sintéticas aumenten su contenido de metionina (Motto *et al.*, 1989; Kirihaara *et al.*, 1988; Pedersen *et al.*, 1986).

En el Cuadro 8 se muestra la selección del 5 % de los genotipos de maíz analizados que se considera prometedora en cuanto al contenido de metionina, siendo posibles prospectos para su mejoramiento genético en la síntesis de metionina (Carballo, comunicación personal). En el grupo que conforman los maíces sintéticos se encontró mayor cantidad de genotipos con buenas características en cuanto a la síntesis y acumulación en grano de metionina que en las líneas puras o criollos mejorados.

Cuadro 8. Genotipos prometedores de cada grupo de maíz analizado en la concentración de metionina y su probabilidad acumulada dentro de la colección.

Líneas puras		
Genotipo	Metionina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Probabilidad
CML-449-1	9.48	0.86
ASIC2S1-25-B-1-B-1-42-2-1-BB-1-1	9.17	0.85
CML-264-1	8.74	0.85
Sintético		
Genotipo	Metionina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Probabilidad
489-S2-3	10.10	0.87
486-S2-02	9.50	0.86
486-S2-03	8.57	0.84
485+488S2-44	8.23	0.84
489-S2-43	8.19	0.84
490-S2-8	7.83	0.83
489-S2-15	7.69	0.83
485+488S2-42	7.67	0.83
489-S2-6	7.64	0.83
485+488S2-25	7.56	0.82
Criollo mejorado		
Genotipo	Metionina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Probabilidad
VC-152-1	4.46	0.70

5.4. Validación cuantitativa de la biodisponibilidad de metionina por método bacteriano y por HPLC.

De los resultados de la cuantificación de metionina por el método del biosensor de metionina se seleccionaron solamente los genotipos CML-449-1 (línea pura) y 486-S2-23 (sintético) para validarlos con el método de HPLC. El genotipo CML-449-1 mostró un nivel alto de metionina de $9.48 \mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando la técnica del biosensor, y en el 486-S2-23 sólo se registraron $0.30 \mu\text{g mL}^{-1}$, indicando concentraciones contrastantes en este aminoácido. El tiempo de retención (tr) para el estándar de metionina fue de 4.483 (Figura 13). El estándar fue disuelto en el mismo buffer que los extractos proteicos de los genotipos analizados, y tuvo como propósito la identificación tr y de la curva en cromatograma.

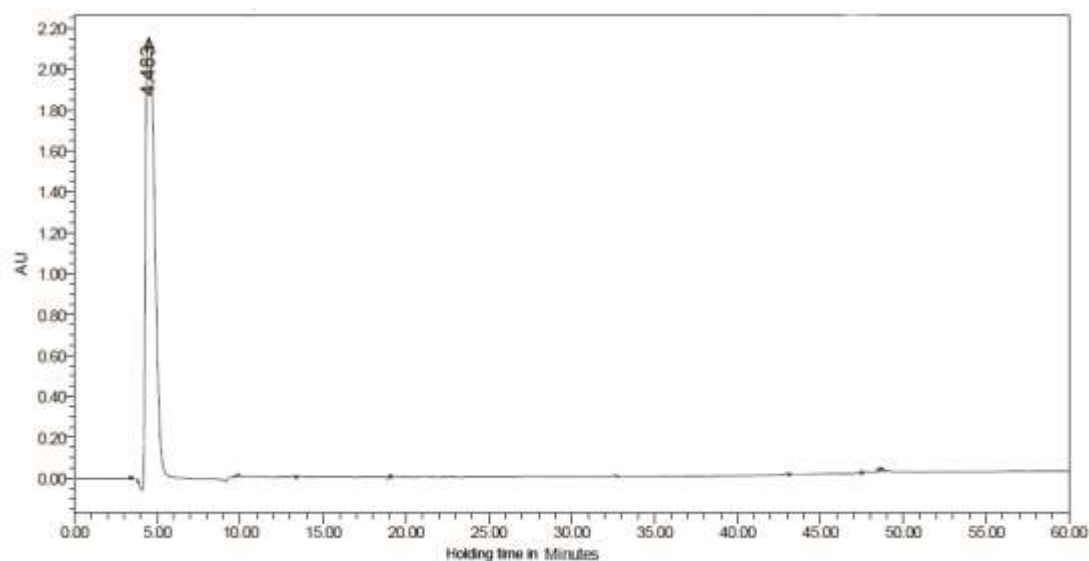


Figura 13. Cromatograma por HPLC del estándar de metionina disuelto en buffer de fosfatos 0.2 M pH: 7.6.

En la Figura 14 y 15 se muestran los cromatogramas obtenidos de los genotipos CML-449-1 y 486-S2-23, respectivamente, en donde se evidencia la presencia y detección de la curva por genotipo/cromatograma, los tiempos de retención fueron 4.439 (CML-449-1) y 4.542 (486-S2-23), y que corresponde a la metionina por su comparación de los tiempos de retención y densidad (área) del pico de la metionina estándar. La variación en los niveles de metionina para ambos genotipos analizados radica en el área de la curva, el genotipo CML-449-1 obtuvo un valor de 5.38 unidades relativas, mientras que para el genotipo 486-S2-23 fue de 2.75 unidades relativas.

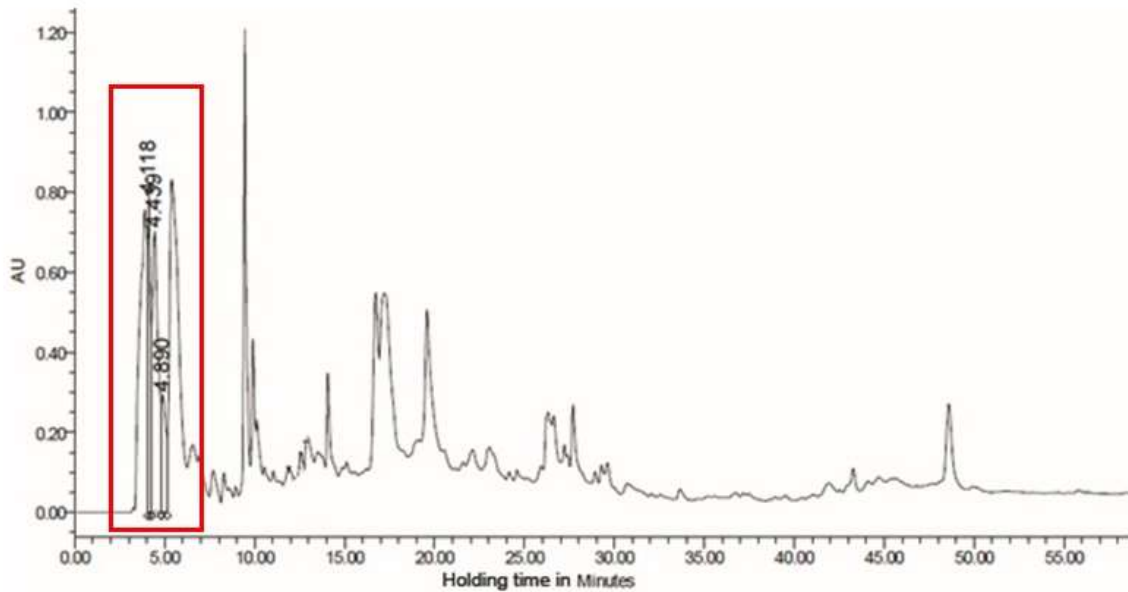


Figura 14. Cromatograma por HPLC del extracto proteico del genotipo CML-449-1.

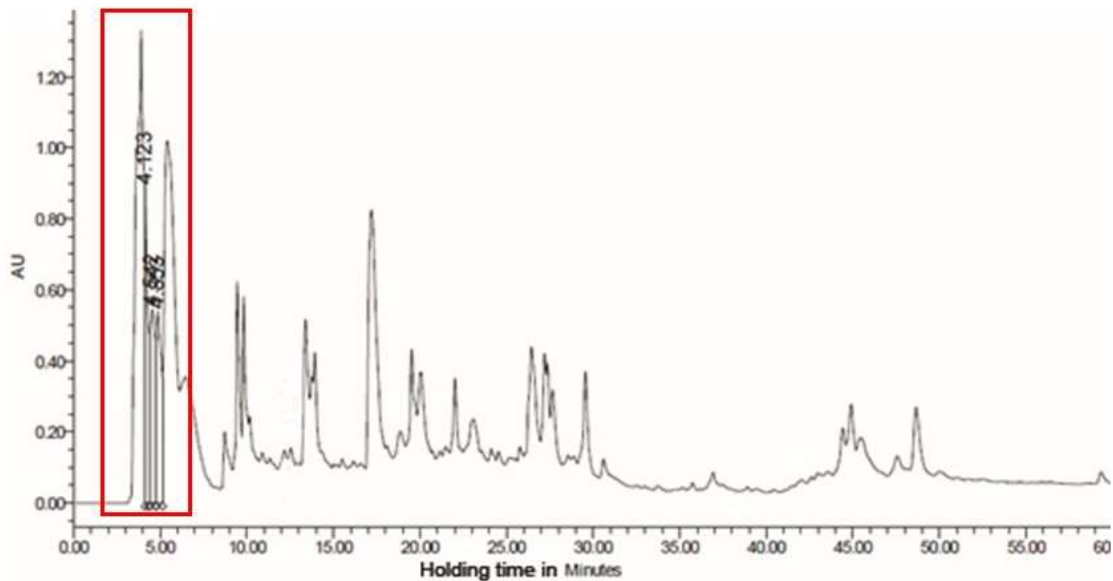


Figura 15. Cromatograma por HPLC del extracto proteico del genotipo 486-S2-23.

Los cromatogramas muestran que la hidrólisis con pepsina no es del todo eficiente al momento de romper los enlaces peptídicos, esto puede observarse en la cantidad de curvas presentes en el cromatograma, por lo que se puede necesitar del empleo de otros factores que ayuden optimizar el proceso de hidrólisis proteica

y procesos de purificación. Al respecto Vivas *et al.* (1990) evaluaron el efecto de hidrólisis con pepsina en la preparación de las tortillas y las fracciones proteicas en maíz común combinado con sorgo, y en maíz QPM, y demostraron que el proceso de nixtamalización afecta la digestibilidad de proteína, así también la digestión enzimática de proteína oscila en un 75 % sin alcanzar el 100 %.

El procesamiento causa modificaciones químicas o físicas que modifican las proteínas presentes en el cereal por ejemplo, los tratamientos térmicos aumentan las intercalaciones hidrofóbicas, desnaturalizan proteínas y provocan interacciones entre las mismas (Ortega *et al.*, 1986). La pepsina no es realmente específica, rompe enlaces donde estén presentes aminoácidos aromáticos y aumenta la susceptibilidad a la hidrólisis aumenta cuando la pepsina está cerca del enlace peptídico que contienen azufre, el producto de esta hidrólisis son péptidos de tamaño variable y algunos aminoácidos libres, otro producto que puede inhibir la actividad de la enzima son péptidos que contengan fenilalanina (Knowles *et al.*, 1969). El método de HPLC resulta conveniente siempre y cuando la pureza de la muestra sea alta y el método para obtener el analito sea estandarizado. El análisis por HPLC proporciona datos crudos sobre el nivel del compuesto a determinar más no su biodisponibilidad en un sistema biológico.

VI. CONCLUSIONES.

- El buffer de fosfatos 0.2 M pH 7.6 y el buffer de TRIS-HCl 40 mM pH 8.5 sin β -mercaptoetanol son adecuados para la extracción de proteínas de reserva en maíz, y no presentan interferencias con el método de Bradford.
- La cuantificación por el método de Bradford es sencilla, rápida, reproducible y permitió cuantificar proteína en grano de maíz con gran sensibilidad.
- La concentración de proteína fue dependiente del genotipo, los valores más altos se encontraron en los genotipos que han pasado una mayor presión de selección en su mejoramiento genético como las variedades sintéticas.
- El uso de biosensores como la cepa mutante de *E. coli* auxotrófica de metionina mostró alta sensibilidad y afinidad por la metionina. La técnica del biosensor resulta ser un método bastante confiable para evaluar parámetros de calidad nutricional como lo es la biodisponibilidad de nutrientes, económico en comparación de métodos químicos como lo es el HPLC.
- El grupo conformado por maíces sintéticos presentaron niveles más altos en la concentración de metionina, el nivel de metionina no está relacionado con el contenido de proteína.
- La hidrólisis de proteína de grano de maíz por pepsina mostró ser poco eficaz al momento de romper enlaces peptídicos, dando lugar a perfiles cromatográficos por HPLC, con diversos compuestos que pueden tratarse de dímeros, trímeros, etc.
- El análisis microbiológico de metionina puede ser comparado de manera cualitativa con métodos estándares como lo es el HPLC, es decir que a través

del uso de un biosensor de aminoácido se puede determinar la presencia o ausencia del aminoácido de interés.

- El 5 % de la colección de grano de maíz son genotipos potenciales para mejoramiento en este aminoácido esencial y de alto nivel nutricional, tipo QPM.

VII. LITERATURA CITADA.

- Ali, M., Scott, M.P. and Bakht, J. (2011). Molecular mechanism of methionine differentiation in high and low methionine maize lines. *African Journal of Biotechnology* 10(19): 3747-3752.
- Allard, R. W. (1960). *Principles of Plant Breeding*. Wiley, New York. N. Y. 485.
- Amir, R., Hacham, Y. and Galili, G. (2002). Cystathionine gamma-synthase and threonine synthase operate in concert to regulate carbon flow towards methionine in plants. *Trends in Plant Science* 7: 153–156.
- Anderson, M. E. (1998). Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chemico- Biological Interactions*. 111–112: 1–14.
- Baker, D. H. (1986). Utilization of isomers and analogs of amino acids and other sulfur-containing compounds. *Progress in Food Nutrition Science* 10: 133-178.
- Beadle, G. W. (1939). Teosinte and the origin of maize. *Journal Heredity*. 30: 245-247.
- Beadle, G. W. (1978). Teosinte and the origin of maize. In D.B. Walden, ed. *Maize breeding and genetics*, p. 113-128. New York, NY, USA, J. Wiley & Sons.
- Beadle, G. W. (1980). The ancestry of corn. *Scientific American*. 242: 112-119.
- Bemiller, J. N., Paschall, E.F., Whistler, R.L. (1984) *STARCH: Chemistry and Technology*. 2 nd ed. San Diego: Academic Press. 432-456 pp.
- Benítez, R. I. (2002). Selección recurrente con progenies endogámicas de especies autóгамas: eficiencia de campo. *Agrociencia* 36:55-65.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Bressani, R. 1990. Chemistry, technology and nutritive value of maize tortillas. *Foods Reviews International*. 62: 225.
- Burga, R. M y Duensing, W. J. (1989). Procesamiento y aplicaciones de fibra de ingredientes alimenticios de maíz salvado. *Los alimentos mundiales de cereales*. 34: 535-538.
- Cerna, E., Ochoa, Y., Mendoza, R., Badii, M. H., Gallegos, G., y Landeros, J. (2010). Evaluación de métodos de cuantificación de proteínas en *Tetranychus urticae* para su uso potencial en la detección de resistencia a plaguicidas. *Phyton*, 79(940), 147–152.
- Chakraborty, S., Chakraborty, N. and Datta, A. (2000). Increased nutritive value of transgenic potato by expressing a nonallergenic seed albumin gene from *Amaranthus hypochondriacus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 97, 3724-3729.
- Chalova, V. I., Froelich, C. A., and Ricke, S. C. (2010). Potential for development of an *Escherichia coli*-based biosensor for assessing bioavailable methionine: a review. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 10(4), 3562–84.
- Chalova, V., Woodward, C. L. and Ricke, S. C. (2006). Application of an *Escherichia coli* green fluorescent protein – based lysine biosensor under nonsterile conditions and autofluorescence background. *Letters in Applied Microbiology*, 42: 265–270.
- Chalova, V. I., Woodward, C. L. and Ricke, S. C. (2004). Fluorescent DNA binding dye-based approach for measuring the growth of an *Escherichia coli* lysine

- auxotroph and quantifying lysine. *Journal of Rapid Methods Automation Microbiology*. 11, 313–324.
- Chang, M. T. and Coe, E. H. (2009). Doubled haploids. In: AL Kriz, BA Larkins (eds) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 63. *Molecular Genetic Approaches to Maize Improvement*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 127-142.
- Chassaigne, A., Barrientos, V., Hernández, A., Segovia, M., Salazar, J., Escobar, D., y Chirino, G. (2000). Híbridos QPM (Quality Protein Maize): una alternativa agroalimentaria para Venezuela. Fundación para la investigación agrícola DANAC. San Javier, Estado Yaracuy, Venezuela. 2 p.
- CIMMYT. (2000). 35 years in the making, high-protein, high-yielding corn to prevent malnutrition among millions. [En línea]. Disponible en <http://www.futureharvest.org/news/maizepressrelease.shtml> (Consultado el 04 de febrero de 2016).
- CIMMYT. (2001). The quality protein maize revolution. Improved nutrition and livelihoods for the poor. Mexico, D.F. 7p.
- Clayton, W. D.; Harman, K. T. and Williamson, H. (2006). Grass Base-the online world grass flora. <http://www.kew.org/data/grasses-db.html>. Consultado el 15 de enero de 2016.
- Clore, M. A. and Larkins, B. A. (1998). Protein quality and its potential relationship to the cytoskeleton in maize endosperm. *Journal Plant Physiology*. 152: 630-635.
- Conde, M. V. y Ortega, D. M. L. (1990). Obtención de aislados proteicos y determinación de almidón en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) endurecido por el almacenamiento. *Agrociencia* 1: 175-187.
- Coruzzi, G. M. and Last, R. L. (2000). Amino acids. In RG Buchanan, W Grissem, R Jones, eds, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp 358-410.
- Cowieson, A. J. (2005). Factors that affect the nutritional value of maize for broilers. *Animal Feed Science and Technology*. 119:293-305.
- Díaz, H. C y Rochin, R. I. (1993). Contribuciones de México a la Alimentación y la Agricultura Mundial. Pag. 101-140. En: *Agricultura y Agronomía en México. 500 Años*. J. de la Fuente; R. Ortega y M. Sámano (coordinadores). UACH. Chapingo, México.
- Díaz, I. B. Z., Froelich, C. A and Ricke, S. C. (2002). Adaptation of a methionine auxotroph *Escherichia coli* growth assay to microtiter plates for quantitating methionine. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, 10(4), 217–229.
- Díaz, I. B. Z., Erickson, A. M and Ricke, S. C. (1999). Growth response and recovery in selective media of a lysine auxotroph *Escherichia coli* for a rapid microbiological assay. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, 7: 263–278.
- Ecocrop. (2007). *Zea mays*. <http://ecocrop.fao.org/ecocrop/srv/en/cropView?id=2175> consultado el 15 de enero de 2016.

- Edwards D., Abreu G. C. G and Labouriau, R. (2010). Selecting High-dimensional Mixed Graphical Models Using Minimal AIC or BIC Forests. *BMC Bioinformatics*, 11(1), 18.
- Esau, K. (1977). *Anatomy of Seed Plants*. 2nd. Ed. John Wiley and Sons. New York.
- Espinosa, A., Sierra, M., Betanzos, E., Caballero, F., Palafox, A and Cano, O. (2003). Tecnología y Producción de Semillas de Híbridos. 14(2), 223–228.
- Espinosa, C. A, A. Turrent F. (2000). México cultiva maíz de alto contenido proteico. En: *Ciencia y Desarrollo. La Jornada. Periodismo de Ciencia y Tecnología*. Septiembre, 2000.
- FAO. (2009). *La FAO en México: Más de 60 años de colaboración*. Roma, Italia. FAO. ISBN 978-92-5-306418-2. 59 pp.
- FAO.1993. *El maíz en la nutrición humana*. Colección FAO: Alimentación y Nutrición 25.
- Foster, B. P and Thomas, W.T.B. (2005). Doubled haploids in genetics and plant breeding. *Plant Breeding Reviews*. 25:57-88.
- Froelich, C. A., Díaz, I. B. Z., and Ricke, S. C. (2002). Construction and growth kinetics of a bioluminescent methionine auxotroph *Escherichia coli* strain for potential use in a methionine bioassay. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, 10(2), 69–82.
- Fukawa, N. K. (2006). Sparing of methionine requirements: Evaluation of human data takes sulfur amino acids beyond protein. *Journal of Nutrition*. 136,1676S-1681S.
- Galili G., Amir, R., Hoefgen, R. and Hesse, H. (2005). Improving the levels of essential amino acids and sulfur metabolites in plants. *Biological Chemistry* 386:817–831.
- García, O. C. (1997). Efecto térmico sobre globulinas aisladas de semilla de *Phaseolus vulgaris* L. cultivado y silvestre. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados.
- Gaut, S. de'Ennequin, M. L. T., Peek, A. S. and Sawkins, M. C. (2000). Maize as model for the evolution of plant nuclear genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97(13):7008-7015.
- Geevers, H.O., and Lake, J.K. (1992) Development of modified opaque2 maize in South Africa. In: ET Mertz, ed, *Quality Protein Maize*. American Association of Cereal Chemists 49–78.
- Geiger, H. H. and Gordillo, G.A. (2009). Doubled haploids in hybrid maize breeding. *Maydica* 54:485-499.
- Glover, D. V. (1992). Corn protein-genetics, breeding, and value in foods and feeds. In: ET Mertz, ed, *Quality Protein Maize*. American Association of Cereal Chemists 49–78.
- Gómez, M. N. (1986). Aptitud combinatoria de maíces tropicales y subtropicales en la región de transición baja de Guerrero. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 8(1):3-19.
- Gu, R., Duan, F., An, X., Zhang, F., Von Wirén, N., and Yuan, L. (2013). Characterization of AMT-Mediated High-Affinity Ammonium Uptake in Roots of Maize (*Zea mays* L.). *Plant and Cell Physiology*. 54 (9), 1515–1524.
- Hell, R. (1997). Molecular physiology of plant sulfur metabolism. *Plant*. 202: 138–148.

- Hernández, H. E. (2005). Influencia de la L-alfa lisofosfatidilcolina sobre las propiedades térmicas y estructurales del almidón del maíz nativo. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 02-43 pp.
- Hernández, R. M. (2013). Desarrollo y validación de marcadores moleculares para identificar genotipos de maíz de calidad proteínica. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México.
- Herrera, S. R. E., Huber, J. T. and Poore, M. H. (1990). Dry matter, crude protein, and starch degradability of five cereal grains. *Journal of Dairy Science*. 73: 2386-2393.
- Jander. (2009). Aspartate-Derived Amino Acid Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis Book*, 1–15. <http://doi.org/10.1199/tab.0121>
- Kartz, S. H., Hediger M. L. and Valleroy L. A. (1974). Traditional maize processing techniques in the New World. *Science*. 184: 765.
- Kato, T. A., Mapes, C., Mera, L. M., Serratos, J. A. y Bye, R. A. (2009). Origen y diversificación del maíz: una revisión analítica. Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Kirihara J. A., Petri, J. B., and Messing, J. (1988). Isolation and sequence of a gene encoding a methionine-rich 10-kDa zein protein from maize. *Gene* 71:359-370.
- Knowles, J. R., Sharp, H., and Greenwell, P. (1969). The pH-dependence of the binding of competitive inhibitors to pepsin. *Biochemical Journal*, 113(2), 343–351.
- Landry, J. and Moureaux, T. (1970). Hétérogénéité des glutelines du grain de maïs: extraction sélective et composition en acides aminés des trois fractions isolées. *Bull Society Chemical Biology*. 52: 1021–103.
- Landry, J., and Moureaux, T. (1994). Albumins and Globulins in Maize Grains. In Y. P. S. Bajaj (Ed.), *Maize SE - 35* (Vol. 25, pp. 536–554). Springer Berlin Heidelberg. http://doi.org/10.1007/978-3-642-57968-4_35.
- Larkins, B. A., Danneffer, D. F., Bostwick, E. O., Moro, G. A. and López, M. A. (1994). Opaque 2 modifiers, what they are and how they work, In: quality protein maize. 1964-1994. Proceedings of the international symposium on quality protein maize. EMBRAPA/CNPMS, Sete Lagoas MG Brasil. 133-148 p.
- Lertratanakoon, K., Orkiszewski, R., Scimeca, J. M. (1996). Methyl-donor deficiency due to chemically induced glutathione depletion. *Cancer Research*. 56: 995-1005.
- Longley, A. E. (1941). Chromosome morphology in maize and its relatives. *Botanical Review*. 7: 263-289.
- López, R. G., Santacruz, V. A., Muñoz, O. A., Castillo, G. F., Córdova, T. L. y Vaquera, H. H. (2005). Caracterización morfológica de poblaciones nativas de Maíz del Istmo de Tehuantepec, México. *Interciencia*, 30(5), 284-290.
- Mangelsdorf, P. C. (1974). *Corn, its origin, evolution and improvement*. Cambridge, M.A., USA, Belknap Press, Harvard University Press.
- Márquez, S. F. (2013). Endogamia en un sintético de maíz formado con familias de autohermanos (Líneas S1). *Fitotecnia Mexicana*. Vol. 36 (3):259-261.
- Matsuoka, Y., Vigoroux, Y., Goodman, M. M., Sanchez, J., Buckler, E. and Doebley, J. A. (2002). Single domestication for maize shown by multilocus microsatellite

- genotyping. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 99:6080-6084.
- Mbuya, K., Nkongolo, K. K. and Kalonji-Mbuyi, A. (2011). Nutritional analysis of quality protein maize varieties selected for agronomic characteristics in a breeding program. *International Journal of Plant Breeding and Genetics* 5(4): 317-327 doi: 10.3923/ijpbg.2011.317.327.
- Méndez, M., M. G., Solorza, F. J., Velázquez, D. V. M., Gómez, M. N. O., Paredes, L. O. y Bello, P. L. A. (2005). Composición química y caracterización calorimétrica de híbridos y variedades de maíz cultivadas en México. *Agrociencia*. 39(3), 267–374.
- Mendoza, L. A, Aguirre, M. J. F., Cruz, C. F. J., Iracheta, D. L., Vázquez C. M. G. y Avendaño, A. C. H. (2012). Efecto de la suspensión del riego en prefloración y llenado de grano en el contenido de lisina, triptófano y rendimiento en dos maíces de alta calidad proteínica. *Interciencia*, Vol. 37 nº 5. 363-369.
- Mertz, E. T. (1997) Thirty years of opaque2 maize. In BA Larkins, ET Mertz, eds, *Quality Protein Maize: 1964-1994*. Purdue University Press, West Lafayette, IN, pp 25–37.
- Mertz, E. T., Bates, L. S. and Nelson, O.F. (1964). Mutant gene that changes protein composition and increase lysine content of maize endosperm. *Science* 145:279.
- Miranda, J. O. (1976). Incidencia de genes modificadores del endospermo *Opaco-2* en 25 razas de maíz mexicano y su efecto en la textura y la calidad del grano. ENA. Tesis de doctorado en ciencias. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México.
- Motto, M. N., DI Fonzo, H., Hartings, M., Maddaloni, F., Salamini, C., Soave, R. D. Thompson. (1989). Regulatory genes affecting maize storage protein synthesis. *Oxf Surv. Plant Molecular Cell Biology*. 6:87-114.
- Ortega, E. I., Villegas, E. and Vasal, S. K. (1986). A comparative study of protein changes in normal and quality protein maize during tortilla making. *Cereal Chemistry*. 63 446-452.
- Paiva, E., Kriz, A. L., Peixoto, M. J. V., Wallace, J. C., Larkins, A. B. (1991). Quantitation and distribution of α – zein in the endosperm of maize kernels. *Cereal Chemistry*. 68(3):276-279.
- Paliwal, R. L. (2001 a). Introducción al Maíz y su importancia. En: Paliwal, R. L.; Granados, G.; Lafitte, H. R.; Violic, A.D. y Marathée, J. P. (Eds.). *El maíz en los trópicos. Mejoramiento y producción*. Colección FAO: Producción y Protección Vegetal 28. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. pp. 1-3.
- Paliwal, R. L. (2001 b). Morfología del maíz tropical. En: Paliwal, R. L.; Granados, G.; Lafitte, H. R.; Violic, A. D. y Marathée J. P. (Eds.). *El maíz en los trópicos. Mejoramiento y producción*. Colección FAO: Producción y Protección Vegetal 28. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. pp. 13-19.
- Paliwal, R. L. (2001 c). Usos del maíz. En: Paliwal, R. L.; Granados, G.; Lafitte, H. R.; Violic, A. D. y Marathée, J. P. (Eds.). *El maíz en los trópicos. Mejoramiento y producción*. Colección FAO: Producción y Protección Vegetal 28.

- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. pp. 45-55.
- Paliwal, R. L. (2001 d). Tipos de maíz. En: Paliwal, R. L.; Granados, G.; Lafitte, H. R.; Violic, A. D. y Marathée, J. P. (Eds.). El maíz en los trópicos. Mejoramiento y producción. Colección FAO: Producción y Protección Vegetal 28. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. pp. 40-45.
- Paliwal, R. L. (2001 e). Recursos genéticos. En: Paliwal, R. L.; Granados, G.; Lafitte, H. R.; Violic, A. D. y Marathée, J. P. (Eds.). El maíz en los trópicos. Mejoramiento y producción. Colección FAO: Producción y Protección Vegetal 28. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. pp. 151-170.
- Pedersen, K., Argos, P., Naravana, S., Larkins, B. (1986). Sequence analysis and characterization of maize gene encoding a high-sulfur zein protein of Mr 15,000. *Journal of Biological Chemistry*. 261:6279-6284.
- Pérez, H. P., Acosta, D. E., Padilla, R. S., y Acosta, G. J. (2012). Efecto de la sequía en la calidad de la semilla de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 25(2) 107-114.
- Pixley, K. V., and M. S. Bjarnason. (2002). Stability of grain yield, endosperm modification, and proteins quality of hybrid and open-pollinated quality protein maize (QPM) Cultivars. *Crop Science*. 42:1882-1890.
- Ponciano, J. M., Mark, L., Taper, B. C. Dennis and Subhash R. L. (2009). Hierarchical models in Ecology: Confidence intervals, hypothesis testing and model selection using data cloning. *Ecology*, 90(2), 356-362.
- Prasanna, B. M., Chaikam, V y Mahuku, G. (2013). Tecnología de dobles haploides en mejoramiento de maíz: Teoría y práctica. México, D.F. CIMMYT. pp. 1-8.
- Preciado, R. E. (1998). Maíz de alta calidad de proteína. In: INIFAP (ed.) *Tecnologías llave en mano*. Serie 1998. División agrícola. México, D.F. pp 49-50.
- Reeves, R. G. y Mangelsdorf, P. C. (1942). A proposed taxonomic change in the tribe Maydeae. *American Journal of Botany*. 29: 815-817.
- Reiners, R. A.; Wall, J. S. and Inglett, G. E. (1973). Industrial Uses of cereals, *Symposium Proceedings*, ed. Y. Pomeranz (St.Paul: AACC), p: 85.
- Rizki, G. L., Arnaboldi, B., Gabrielli, J., Yan, G. S., Lee, R. K., Turner, S. M., Badger, T.M., Pitas, R. E. and Maher, J. J. (2006). Mice fed a lipogenic methionine-choline deficient diet develop hypermetabolism coincident with hepatic suppression of SCD-1. *Journal of Lipid Research*. 47, p. 2280–2290.
- Rubenstein, I. and Geraghty, D. E. (1986). The Genetic Organization of Zein. Pages 297-315. In: *Advances in Cereal Science and Technology*. Vol. 8. Y. Pomeranz, (ed). American Association of Cereal Chemists. St. Paul, Mn.
- Saito, K. (2000). Regulation of sulfate transport and synthesis of sulfur-containing amino acids. *Current Opinion in Plant Biology*. 3: 188–195.
- Salinas M. Y., Arellano V. J. L., Martínez, B. F. (1992b). Propiedades físicas, químicas y correlaciones de maíces híbridos precoces para Valles Altos: Comparación de métodos para medir dureza del maíz (*Zea mays* L.). *Archivos latinoamericanos de nutrición*. 42 (1):161-167.

- Salinas, M. Y. y Pérez, H. P. (1997). Calidad nixtamalera-tortillera en maíces comerciales de México. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 20:121-136.
- Salinas, M. Y., Aragón, C. F., Ybarra, M. C., Aguilar, V. J., Altunar, L. B., y Sosa, M. E. (2013). Caracterización física y composición química de razas de maíz de grano azul/morado de las regiones tropicales y subtropicales de Oaxaca. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36(1), 23-31.
- Sánchez, O. I. y Pérez, U. C. E. (2014). Maíz I (*Zea mays*). *REDUCA Biología*, 7 (2). pp. 151-171. ISSN 1989-3620.
- Schnable, P. K. *et al.* (2009). The B73 genome: complexity, diversity and dynamics. *Science*. Vol. 326.
- Scott, M. P., Bhatnagar, S. and Betrán, J. (2004). Tryptophan and methionine levels in quality protein maize breeding germplasm. *Maydica*.49:303-311.
- Scott, M. P., A. Darrigues, T., Stahly, S., and Lamkey, K. (2008). Recurrent selection to alter grain methionine concentration and improve nutritional value of maize. *Crop Science* 48: 1705–1713.
- Serna, S. S. R. (2001). Química, almacenamiento e industrialización de los cereales AGT ed. México, D.F.
- SIAP. (2014). Producción Agrícola. [En línea] Disponible en: SAGARPA Sitio web: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/> (Consultado el Febrero 02, 2016).
- Sierra, M. M., Gómez M. N., Cano, O., Turrent, F. A., Córdoba, O. H. S., Rodríguez, M., Sandoval, F. A., R., Espinosa, C. A., González C. M. y Aveldaño S. R. (1999). Híbridos y variedades de maíz con alta calidad de proteína para el Trópico Mexicano. *Memorias de la XVIII Reunión Latinoamericana de Maíz, EMBRAPA--CIMMYT. Brasil*. p. 517-523.
- Sierra, M. M., Márquez, S. F., Valdivia, B. R., Córdoba, O. H. S., Lezama, G. R. y Pescador, R. A. (2004). Uso de probadores en la selección de líneas para formar híbridos de maíz (*Zea mays* L.). *Agricultura Técnica en México*. 30(2):169-181.
- Sierra, M. M., Palafox, C. A., Cano, R. O., Rodríguez, M. F. A., Espinosa, C. A. y Turrent, F. A. (2001). Descripción varietal de H-519C, H-553C y V-537C, maíces con alta calidad de proteína para el trópico húmedo de México. *Campo Experimental Cotaxtla. SAGARPA-INIFAP. Veracruz, México. Folleto Técnico. Núm. 30. 21 p.*
- Sierra, M. M., Palafox, C. A., Rodríguez, M. F. A., Espinosa, C. A., Gómez, M. N., Caballero, H. F., Barrón, F. S. y Zambada, M. A. (2004a). H-518 y H-520, híbridos trilineales de maíz para el trópico húmedo de México. *Campo Experimental Cotaxtla. CIRGOC-INIFAP. Veracruz, México. Folleto Técnico. Núm. 38. 17 p.*
- Sierra, M. M., Palafox, C. A., Rodríguez, M. F. A., Espinosa, C. A., Vásquez, C. G., Zambada, M. A., Rodríguez, R. R. y Barrón, F. S. (2008). H-564C, híbrido de maíz con alta calidad de proteína para el trópico húmedo de México. *Campo Experimental Cotaxtla. CIRGOC-INIFAP. Desplegable Técnica. Núm. 6.*
- Sierra, M. M., Rodríguez, M. F. A., Castillo, G. R. A. y Márquez, S. F. (1992). La aplicación de los parámetros de estabilidad en el mejoramiento de maíz de la región sur de México. In: *memorias del simposium de interacción genotipo ambiente en genotecnia vegetal. Guadalajara, Jalisco. 239-260 p.*

- Sierra, M. M., Palafox, C.A., Rodríguez, M. F., Espinosa, C. A., Vázquez, C. G., Gómez, M. N. y Barrón, F. S. (2011). H-564C, híbrido de maíz con alta calidad de proteína para el trópico húmedo de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 2(1), 71-84.
- Stoscheck, C. M. (1990). Quantitation of protein. *Methods in Enzymology*. 182:50-69.
- Tabbe, L. M., and Droux, M. (2001). Sulfur assimilation in developing lupin cotyledons could contribute significantly to the accumulation of organic sulfur reserves in the seed. *Plant Physiology*, 126(May), 176–187. <http://doi.org/10.1104/pp.126.1.176>
- Tapia, M. E. y Fries, A. M. (2007). *Guía de campo de los cultivos andinos*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación; Asociación Nacional de Productores Ecológicos del Perú. Lima.
- United States. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. (2013). Corn, white, 20314. USDA National Nutrient Database for Standard Reference <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>
- Ufaz, S., and Galili, G. (2008). Improving the content of essential amino acids in crop plants: goals and opportunities. *Plant Physiology*, 147(3), 954–961. <http://doi.org/10.1104/pp.108.118091>
- Vasal, S. K. and Villegas, E. (2001). The quality protein maize revolution. Improved nutrition and livelihoods for the poor. CIMMYT. El Batán, Texcoco, México. 7 p.
- Vasal, S. K., Srinivasan, G., Crossa, J. and Beck, D. L. (1992a). Heterosis and combining ability of CIMMYT's subtropical and temperate early maturity maize germplasm. *Crop Science*. 32(4):884-890.
- Vasal, S. K., Srinivasan, G., Han, C. and González, C. F. (1992b). Heterotic patterns of eighty-eight white subtropical CIMMYT maize lines. *Maydica*. 37:319-327.
- Vasal, S. K., Vergara, A. N. y Mc Lean, S. (1994). Estrategias en el desarrollo de híbridos tropicales de maíz. *Agronomía Mesoamericana*. 5(2):184-189.
- Vázquez, C. M. G., Pérez, C. J. P., Hernández, C. J. M., Marrufo, D. M. L., y Martínez, R. E. (2010). Calidad de grano y de tortillas de maíces criollos del altiplano y Valle del Mezquital, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 33(spe4), 49-56.
- Vera, G. A. M., Chávez, S. J. L., Carrillo, R. J. C. (2012). Proteína, lisina y triptófano en poblaciones nativas de maíz mixteco. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 35: 7-13
- Vivas, R. N. E., Serna, S. S. O., Waniska, R. D., and Rooney, L. W. (1990). Effect of tortilla chip preparation on the protein fractions of quality protein maize, regular maize and sorghum. *Journal of Cereal Science*, 12(3), 289–296.
- Waterlow, J. C and Payne, P. R. (1975). The protein gap. *Nature*, 258(5531), 113–117.
- Watson, S. A. 1987. Structure and composition corn, chemistry and technology AACC. 53-82.
- Weatherwax, P. (1954). *Indian corn in old America*. New York, NY, USA, MacMillian Publishing.
- Weatherwax, P. (1955). History and origin of corn. I. Early history of corn and theories as to its origin. In G.F. Sprague, ed. *Corn and corn improvement*, 1st ed., p. 1-16. New York, NY, USA, Academic Press.

- Wellhausen, E. J., Roberts, L. M., Hernandez, E. P y Mangelsdorf, C. (1951). Razas de maíz en México. Su origen, características y distribución. In: Xolocatzia. Obras de Efraín Hernández Xolocotzi. Revista de Geografía Agrícola. II:609-732.
- Wilkes, H. G. (1979). Mexico and Central America as a centre for the origin of agriculture and the evolution of maize. *Journal of Crop Improvement*. 6(1): 1-18.
- Wilkes, H. G. (1985). Teosinte: the closest relative of maize revisited. *Maydica*, XXX: 209-223.
- Wilson, M. C. (1987). Proteins of the kernel. In: *Corn: Chemistry and Technology* (eds Watson, S. A. and Ramstad, P. T.). American Association of Cereal Chemists. St. Paul, MN, pp. p. 273-277.
- Wolf, M. J., Buzan, C. L., MacMasters, M. M., and Rist, C. E. (1952 a). Structure of the mature corn kernel. I. Gross Anatomy and structural relationships. *Cereal Chemistry*. 29: 321-333.
- Wolf, M. J., Buzan, C. L., MacMasters, M. M., and Rist, C. E. (1952 b). Structure of the mature corn kernel. II Gross anatomy and structural relationships. *Cereal Chemistry*. 29: 334-348.
- Wolf, M. J., Buzan, C. L., MacMasters, M. M., and Rist, C. E. (1952 c). Structure of the mature corn kernel. III Gross anatomy and structural relationships. *Cereal Chemistry*. 29: 349-361.
- Wolf, M. J., Buzan, C. L., MacMasters, M. M., and Rist, C. E. (1952 d). Structure of the mature corn kernel. IV Gross anatomy and structural relationships. *Cereal Chemistry*. 29: 362-382.
- Yang, D., Baumgartner, R. N., Slattery, M., Wang, C., Giuliano, A., Murtaugh, M., Risendal, B., Byers, T., and Baumgartner, K. (2013). Dietary intake of Folate, B-Vitamins and Methionine and breast cancer risk among Hispanic and non-hispanic white women. *PLoS ONE* 8(2): e54495. doi:10.1371/journal.pone.0054495.
- Yau, C. Y., Bockholt, A. J., Smith, D. J., Rooney, L. W., and Waniska, R. D. (1999). Maize endosperm proteins that contribute to endosperm lysine content. *Cereal Chemistry*. 76(5):668-672.
- Zabala, D. I. B., Carreon, F. O. C., Ellis, W. C., and Ricke, S. C. (2004). Assessment of an Escherichia coli Methionine Auxotroph Growth Assay for Quantifying Crystalline Methionine Supplemented in Poultry Feeds. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 12(979), 155–167.
- Zhou, X., Wang, X., and Dougherty, E. R. (2005). Gene selection using logistic regressions based on AIC, BIC and mdl criteria. *New Mathematics and Natural Computation*, 01(01), 129–145.
- Zhou, X., Wang, X. and Dougherty, E. R. (2005). Gene selection using logistic regressions based on aic, bic and mdl criteria. *New Mathematics and Natural Computation*, 01(01), 129–145.

VIII. ANEXOS.

Anexo 1. Concentración de proteína soluble y de metionina en los genotipos de maíz analizados.

Nombre / Genealogía	Condición	Proteína mg g ⁻¹	Metionina µg mL ⁻¹
CLQ-RCWQ10-1	Línea Pura	13.07	0.17
CML-449-1	Línea Pura	11.06	9.48
CML-264-1	Línea Pura	12.18	8.75
CML-161-1	Línea Pura	14.73	0.89
CML-491-1	Línea Pura	12.55	0.92
ASIC2S1-25-B-1-B-1-42-2-1-BB-1-1	Línea Pura	12.24	9.18
486-S2-01	Línea Segregante S3 del Sintético 486	11.21	1.31
486-S2-02	Línea Segregante S3 del Sintético 486	10.43	9.50
486-S2-03	Línea Segregante S3 del Sintético 486	10.40	8.57
486-S2-05	Línea Segregante S3 del Sintético 486	12.44	5.77
486-S2-06	Línea Segregante S3 del Sintético 486	13.67	5.46
486-S2-09	Línea Segregante S3 del Sintético 486	12.29	1.53
486-S2-10	Línea Segregante S3 del Sintético 486	12.33	0.20
486-S2-11	Línea Segregante S3 del Sintético 486	11.24	0.18
486-S2-14	Línea Segregante S3 del Sintético 486	12.16	3.37
486-S2-15	Línea Segregante S3 del Sintético 486	14.24	2.72
486-S2-16	Línea Segregante S3 del Sintético 486	11.24	4.62
486-S2-17	Línea Segregante S3 del Sintético 486	11.09	3.41
486-S2-18	Línea Segregante S3 del Sintético 486	9.85	2.62
486-S2-19	Línea Segregante S3 del Sintético 486	11.28	4.88
486-S2-20	Línea Segregante S3 del Sintético 486	9.45	2.44
486-S2-21	Línea Segregante S3 del Sintético 486	11.37	1.74
486-S2-22	Línea Segregante S3 del Sintético 486	11.90	0.22
486-S2-23	Línea Segregante S3 del Sintético 486	12.50	0.30
486-S2-27	Línea Segregante S3 del Sintético 486	11.59	0.71
486-S2-28	Línea Segregante S3 del Sintético 486	11.85	1.41
486-S2-29	Línea Segregante S3 del Sintético 486	13.34	3.51
486-S2-30	Línea Segregante S3 del Sintético 486	11.80	1.20
486-S2-31	Línea Segregante S3 del Sintético 486	15.00	1.30
486-S2-33	Línea Segregante S3 del Sintético 486	10.96	1.84
486-S2-35	Línea Segregante S3 del Sintético 486	8.04	3.16
486-S2-37	Línea Segregante S3 del Sintético 486	10.66	0.12
486-S2-38	Línea Segregante S3 del Sintético 486	13.61	5.98
486-S2-39	Línea Segregante S3 del Sintético 486	13.51	0.46
486-S2-41	Línea Segregante S3 del Sintético 486	11.01	0.48
486-S2-42	Línea Segregante S3 del Sintético 486	10.77	1.74
486-S2-45	Línea Segregante S3 del Sintético 486	9.84	0.57
486-S2-47	Línea Segregante S3 del Sintético 486	11.76	1.54
485+488S2-2	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488	10.28	1.08
485+488S2-3	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488	12.71	1.55
485+488S2-4	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488	11.16	1.31
485+488S2-10	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488	11.14	2.00
485+488S2-12	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488	9.87	4.81
485+488S2-14	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488	11.06	2.84
485+488S2-15	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488	12.82	0.65
485+488S2-20	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488	11.82	1.90
485+488S2-21	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488	15.67	0.11
485+488S2-22	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488	10.62	3.34
485+488S2-23	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488	13.36	3.10
485+488S2-24	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488	11.78	0.69
485+488S2-25	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488	11.06	7.56
485+488S2-26	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488	10.71	4.44
485+488S2-27	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488	10.63	6.95
485+488S2-29	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488	12.13	6.71
485+488S2-31	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488	12.94	6.97
485+488S2-32	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488	12.97	3.99

Nombre / Genealogía	Condición	Proteína mg g ⁻¹	Metionina µg mL ⁻¹
485+488S2-34	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488	13.15	5.27
485+488S2-36	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488	11.07	6.24
485+488S2-37	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488	12.77	6.38
485+488S2-39	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488	14.10	5.87
485+488S2-41	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488	10.36	7.06
485+488S2-42	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488	10.28	7.67
485+488S2-44	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488	8.94	8.23
485+488S2-46	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488	9.76	0.20
485+488S2-47	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488	6.92	3.23
485+488S2-48	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488	8.58	6.57
485+488S2-50	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488	11.73	4.74
485+488S2-52	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488	11.36	6.26
485+488S2-54	Línea Segregante S3 del Sintético 485+488	7.79	1.99
489-S2-1	Línea Segregante S3 del Sintético 489	8.76	0.35
489-S2-3	Línea Segregante S3 del Sintético 489	8.07	10.10
489-S2-6	Línea Segregante S3 del Sintético 489	13.22	7.64
489-S2-7	Línea Segregante S3 del Sintético 489	12.79	5.39
489-S2-8	Línea Segregante S3 del Sintético 489	11.67	1.84
489-S2-9	Línea Segregante S3 del Sintético 489	10.90	4.62
489-S2-10	Línea Segregante S3 del Sintético 489	10.00	6.18
489-S2-11	Línea Segregante S3 del Sintético 489	10.62	0.66
489-S2-12	Línea Segregante S3 del Sintético 489	14.22	0.30
489-S2-13	Línea Segregante S3 del Sintético 489	16.42	5.28
489-S2-15	Línea Segregante S3 del Sintético 489	9.98	7.69
489-S2-17	Línea Segregante S3 del Sintético 489	11.75	1.62
489-S2-19	Línea Segregante S3 del Sintético 489	11.32	0.34
489-S2-20	Línea Segregante S3 del Sintético 489	9.94	4.56
489-S2-21	Línea Segregante S3 del Sintético 489	10.22	0.20
489-S2-22	Línea Segregante S3 del Sintético 489	9.09	6.54
489-S2-24	Línea Segregante S3 del Sintético 489	9.64	2.08
489-S2-25	Línea Segregante S3 del Sintético 489	13.02	0.22
489-S2-26	Línea Segregante S3 del Sintético 489	12.01	0.65
489-S2-27	Línea Segregante S3 del Sintético 489	12.71	7.02
489-S2-28	Línea Segregante S3 del Sintético 489	13.77	1.06
489-S2-30	Línea Segregante S3 del Sintético 489	12.72	0.78
489-S2-31	Línea Segregante S3 del Sintético 489	13.54	1.04
489-S2-32	Línea Segregante S3 del Sintético 489	14.34	1.38
489-S2-33	Línea Segregante S3 del Sintético 489	14.06	6.64
489-S2-34	Línea Segregante S3 del Sintético 489	10.09	0.74
489-S2-36	Línea Segregante S3 del Sintético 489	14.10	6.57
489-S2-37	Línea Segregante S3 del Sintético 489	13.98	4.46
489-S2-39	Línea Segregante S3 del Sintético 489	12.98	2.22
489-S2-40	Línea Segregante S3 del Sintético 489	13.20	5.24
489-S2-42	Línea Segregante S3 del Sintético 489	15.00	2.73
489-S2-43	Línea Segregante S3 del Sintético 489	10.54	8.19
489-S2-45	Línea Segregante S3 del Sintético 489	15.84	2.96
490-S2-2	Línea Segregante S3 del Sintético 490	11.87	1.95
490-S2-3	Línea Segregante S3 del Sintético 490	13.20	2.07
490-S2-4	Línea Segregante S3 del Sintético 490	10.71	3.36
490-S2-6	Línea Segregante S3 del Sintético 490	12.88	1.68
490-S2-7	Línea Segregante S3 del Sintético 490	12.08	3.46
490-S2-8	Línea Segregante S3 del Sintético 490	9.41	7.83
490-S2-9	Línea Segregante S3 del Sintético 490	14.24	1.30
490-S2-10	Línea Segregante S3 del Sintético 490	13.88	1.99
490-S2-11	Línea Segregante S3 del Sintético 490	16.49	1.34
490-S2-12	Línea Segregante S3 del Sintético 490	12.69	2.32
490-S2-16	Línea Segregante S3 del Sintético 490	12.31	2.26
490-S2-17	Línea Segregante S3 del Sintético 490	11.40	2.31
490-S2-18	Línea Segregante S3 del Sintético 490	12.10	2.49
490-S2-19	Línea Segregante S3 del Sintético 490	12.65	1.28
490-S2-20	Línea Segregante S3 del Sintético 490	14.72	1.70

Nombre / Genealogía	Condición	Proteína mg g ⁻¹	Metionina µg mL ⁻¹
490-S2-23	Línea Segregante S3 del Sintético 490	12.85	1.25
490-S2-24	Línea Segregante S3 del Sintético 490	17.04	0.84
490-S2-25	Línea Segregante S3 del Sintético 490	10.89	1.73
490-S2-26	Línea Segregante S3 del Sintético 490	15.81	0.64
490-S2-27	Línea Segregante S3 del Sintético 490	14.82	1.80
490-S2-28	Línea Segregante S3 del Sintético 490	14.57	1.33
490-S2-31	Línea Segregante S3 del Sintético 490	14.24	1.23
490-S2-32	Línea Segregante S3 del Sintético 490	11.80	1.22
490-S2-33	Línea Segregante S3 del Sintético 490	13.19	1.96
490-S2-35	Línea Segregante S3 del Sintético 490	14.69	0.95
490-S2-36	Línea Segregante S3 del Sintético 490	14.89	1.02
490-S2-37	Línea Segregante S3 del Sintético 490	12.95	1.21
490-S2-38	Línea Segregante S3 del Sintético 490	14.85	1.93
490-S2-39	Línea Segregante S3 del Sintético 490	16.87	0.82
490-S2-40	Línea Segregante S3 del Sintético 490	16.17	1.27
490-S2-41	Línea Segregante S3 del Sintético 490	14.25	1.45
490-S2-42	Línea Segregante S3 del Sintético 490	14.37	1.41
490-S2-43	Línea Segregante S3 del Sintético 490	9.91	2.39
494-499-S2-1	Línea Segregante S3 del Sintético 494	11.00	1.90
494-499-S2-2	Línea Segregante S3 del Sintético 494	11.96	1.02
494-499-S2-3	Línea Segregante S3 del Sintético 494	12.22	3.24
494-499-S2-4	Línea Segregante S3 del Sintético 494	15.47	2.22
494-499-S2-5	Línea Segregante S3 del Sintético 494	13.34	1.85
494-499-S2-9	Línea Segregante S3 del Sintético 494	13.17	2.35
494-499-S2-11	Línea Segregante S3 del Sintético 494	11.98	2.04
494-499-S2-15	Línea Segregante S3 del Sintético 494	12.37	3.17
494-499-S2-16	Línea Segregante S3 del Sintético 494	10.82	2.35
494-499-S2-18	Línea Segregante S3 del Sintético 494	10.56	2.98
494-499-S2-19	Línea Segregante S3 del Sintético 494	12.81	2.07
494-499-S2-20	Línea Segregante S3 del Sintético 494	12.78	2.42
494-499-S2-21	Línea Segregante S3 del Sintético 494	11.53	1.65
494-499-S2-22	Línea Segregante S3 del Sintético 494	14.08	2.17
494-499-S2-23	Línea Segregante S3 del Sintético 494	11.85	2.69
494-499-S2-24	Línea Segregante S3 del Sintético 494	12.95	1.19
494-499-S2-27	Línea Segregante S3 del Sintético 494	13.71	2.01
494-499-S2-28	Línea Segregante S3 del Sintético 494	7.71	4.40
494-499-S2-29	Línea Segregante S3 del Sintético 494	10.87	1.42
494-499-S2-30	Línea Segregante S3 del Sintético 494	11.92	3.79
494-499-S2-31	Línea Segregante S3 del Sintético 494	10.20	3.36
494-499-S2-32	Línea Segregante S3 del Sintético 494	12.81	5.80
494-499-S2-33	Línea Segregante S3 del Sintético 494	9.63	3.33
494-499-S2-34	Línea Segregante S3 del Sintético 494	12.17	2.00
494-499-S2-35	Línea Segregante S3 del Sintético 494	12.22	3.22
494-499-S2-36	Línea Segregante S3 del Sintético 494	10.05	5.53
494-499-S2-40	Línea Segregante S3 del Sintético 494	10.27	1.97
494-499-S2-41	Línea Segregante S3 del Sintético 494	8.84	4.14
494-499-S2-42	Línea Segregante S3 del Sintético 494	10.68	3.07
494-499-S2-43	Línea Segregante S3 del Sintético 494	13.44	5.19
494-499-S2-44	Línea Segregante S3 del Sintético 494	10.11	1.27
494-499-S2-45	Línea Segregante S3 del Sintético 494	14.22	2.27
494-499-S2-46	Línea Segregante S3 del Sintético 494	10.75	3.20
494-499-S2-47	Línea Segregante S3 del Sintético 494	10.98	0.95
494-499-S2-48	Línea Segregante S3 del Sintético 494	10.90	2.04
494-499-S2-49	Línea Segregante S3 del Sintético 494	11.54	2.70
494-499-S2-50	Línea Segregante S3 del Sintético 494	11.88	2.74
494-499-S2-51	Línea Segregante S3 del Sintético 494	8.14	5.31
494-499-S2-52	Línea Segregante S3 del Sintético 494	10.06	1.18
494-499-S2-53	Línea Segregante S3 del Sintético 494	11.46	1.53
494-499-S2-54	Línea Segregante S3 del Sintético 494	10.25	3.73
494-499-S2-55	Línea Segregante S3 del Sintético 494	10.02	3.49
494-499-S2-56	Línea Segregante S3 del Sintético 494	9.53	3.16

Nombre / Genealogía	Condición	Proteína mg g ⁻¹	Metionina µg mL ⁻¹
494-499-S2-59	Línea Segregante S3 del Sintético 494	13.63	1.03
494-499-S2-60	Línea Segregante S3 del Sintético 494	14.06	3.27
494-499-S2-62	Línea Segregante S3 del Sintético 494	14.32	4.99
501-505-S2-1	Línea Segregante S3 del Sintético 501-505	13.19	3.65
501-505-S2-2	Línea Segregante S3 del Sintético 501-505	11.27	2.61
501-505-S2-3	Línea Segregante S3 del Sintético 501-505	11.74	3.39
501-505-S2-4	Línea Segregante S3 del Sintético 501-505	13.81	2.69
501-505-S2-5	Línea Segregante S3 del Sintético 501-505	11.75	3.00
501-505-S2-6	Línea Segregante S3 del Sintético 501-505	11.67	4.92
501-505-S2-7	Línea Segregante S3 del Sintético 501-505	13.65	2.70
501-505-S2-8	Línea Segregante S3 del Sintético 501-505	12.75	7.19
501-505-S2-11	Línea Segregante S3 del Sintético 501-505	12.34	3.22
501-505-S2-13	Línea Segregante S3 del Sintético 501-505	11.22	0.82
501-505-S2-14	Línea Segregante S3 del Sintético 501-505	11.47	0.56
501-505-S2-15	Línea Segregante S3 del Sintético 501-505	11.70	4.61
501-505-S2-16	Línea Segregante S3 del Sintético 501-505	10.81	0.73
501-505-S2-17	Línea Segregante S3 del Sintético 501-505	13.79	0.59
501-505-S2-18	Línea Segregante S3 del Sintético 501-505	9.73	1.04
501-505-S2-19	Línea Segregante S3 del Sintético 501-505	10.59	0.93
501-505-S2-20	Línea Segregante S3 del Sintético 501-505	13.38	0.47
501-505-S2-22	Línea Segregante S3 del Sintético 501-505	12.93	0.57
501-505-S2-23	Línea Segregante S3 del Sintético 501-505	12.28	1.83
501-505-S2-24	Línea Segregante S3 del Sintético 501-505	12.46	2.90
501-505-S2-25	Línea Segregante S3 del Sintético 501-505	10.55	2.40
501-505-S2-26	Línea Segregante S3 del Sintético 501-505	13.43	0.76
501-505-S2-27	Línea Segregante S3 del Sintético 501-505	12.88	0.38
501-505-S2-28	Línea Segregante S3 del Sintético 501-505	9.60	0.54
501-505-S2-30	Línea Segregante S3 del Sintético 501-505	9.52	0.71
501-505-S2-31	Línea Segregante S3 del Sintético 501-505	15.10	0.14
501-505-S2-32	Línea Segregante S3 del Sintético 501-505	13.07	0.54
501-505-S2-34	Línea Segregante S3 del Sintético 501-505	14.37	1.42
501-505-S2-35	Línea Segregante S3 del Sintético 501-505	12.52	1.13
501-505-S2-36	Línea Segregante S3 del Sintético 501-505	13.02	0.99
501-505-S2-38	Línea Segregante S3 del Sintético 501-505	13.63	1.32
501-505-S2-41	Línea Segregante S3 del Sintético 501-505	13.92	0.19
501-505-S2-42	Línea Segregante S3 del Sintético 501-505	12.51	0.35
501-505-S2-43	Línea Segregante S3 del Sintético 501-505	14.33	4.76
501-505-S2-46	Línea Segregante S3 del Sintético 501-505	14.27	0.45
501-505-S2-47	Línea Segregante S3 del Sintético 501-505	11.19	0.68
501-505-S2-48	Línea Segregante S3 del Sintético 501-505	11.24	0.51
501-505-S2-50	Línea Segregante S3 del Sintético 501-505	12.67	0.22
501-505-S2-51	Línea Segregante S3 del Sintético 501-505	14.27	0.11
501-505-S2-52	Línea Segregante S3 del Sintético 501-505	14.99	0.24
501-505-S2-53	Línea Segregante S3 del Sintético 501-505	15.55	0.11
501-505-S2-54	Línea Segregante S3 del Sintético 501-505	16.35	1.15
513-517-S2-2	Línea Segregante S3 del Sintético 513-517	12.27	0.16
513-517-S2-4	Línea Segregante S3 del Sintético 513-517	12.82	4.73
513-517-S2-7	Línea Segregante S3 del Sintético 513-517	12.06	4.96
513-517-S2-8	Línea Segregante S3 del Sintético 513-517	9.49	0.45
513-517-S2-14	Línea Segregante S3 del Sintético 513-517	12.44	1.12
513-517-S2-15	Línea Segregante S3 del Sintético 513-517	11.55	1.05
513-517-S2-17	Línea Segregante S3 del Sintético 513-517	12.97	2.74
513-517-S2-19	Línea Segregante S3 del Sintético 513-517	13.19	0.20
513-517-S2-20	Línea Segregante S3 del Sintético 513-517	14.57	0.13
513-517-S2-21	Línea Segregante S3 del Sintético 513-517	10.36	3.56
513-517-S2-23	Línea Segregante S3 del Sintético 513-517	11.18	2.99
513-517-S2-24	Línea Segregante S3 del Sintético 513-517	13.27	0.41
513-517-S2-32	Línea Segregante S3 del Sintético 513-517	12.87	0.44
513-517-S2-36	Línea Segregante S3 del Sintético 513-517	14.04	0.40
513-517-S2-47	Línea Segregante S3 del Sintético 513-517	13.65	4.84
513-517-S2-50	Línea Segregante S3 del Sintético 513-517	11.13	0.52

Nombre / Genealogía	Condición	Proteína mg g ⁻¹	Metionina µg mL ⁻¹
513-517-S2-57	Línea Segregante S3 del Sintético 513-517	12.52	0.33
513-517-S2-62	Línea Segregante S3 del Sintético 513-517	15.49	0.56
513-517-S2-64	Línea Segregante S3 del Sintético 513-517	10.94	0.54
513-517-S2-65	Línea Segregante S3 del Sintético 513-517	13.15	0.32
513-517-S2-66	Línea Segregante S3 del Sintético 513-517	16.96	0.53
Y05LP1534-1	Línea Pura	10.77	0.77
T-39-1	Línea Pura	10.84	4.10
CML-340-1	Línea Pura	12.49	0.38
CML-495-1	Línea Pura	14.21	0.14
Y10CST1-1	Línea Pura	11.22	0.53
ST30M58-1	Línea Pura	13.73	0.52
ST-35-1-9-B4-3B-1-M12-1	Línea Pura	11.11	0.82
Y10T12M66-1	Línea Pura	10.76	0.59
Y05P211-1	Línea Pura	11.65	0.41
Y90B80707-1	Línea Pura	9.10	0.77
Y902908-1	Línea Pura	11.03	0.34
Y9002221-2-M14-1	Línea Pura	11.00	0.40
T-43-1	Línea Pura	10.89	0.86
Oax-823-1	Población Criolla Mejorada	12.08	0.46
Oax-827-1	Población Criolla Mejorada	12.17	0.40
Oax-832-1	Población Criolla Mejorada	12.58	0.24
Oax-834-1	Población Criolla Mejorada	12.86	0.22
Oax-838-1	Población Criolla Mejorada	12.35	0.22
Col-36-1	Población Criolla Mejorada	11.52	0.50
Col-45-1	Población Criolla Mejorada	12.01	0.36
Col-58-1	Población Criolla Mejorada	10.93	0.16
Col-62-1	Población Criolla Mejorada	13.26	0.15
VC-39-1	Población Criolla Mejorada	11.10	0.21
VC-118-1	Población Criolla Mejorada	11.78	0.20
VC-134-1	Población Criolla Mejorada	12.31	1.25
VC-145-1	Población Criolla Mejorada	10.98	0.60
VC-151-1	Población Criolla Mejorada	12.34	0.62
VC-152-1	Población Criolla Mejorada	11.14	4.47
VC-164-1	Población Criolla Mejorada	10.11	1.76
Conejito Mejorado-1	Población Criolla con Introgresión de germoplasma mejorado	12.66	0.29
((C-60 x Pool-17) x (C-60 x Pool-18))-1	Población Criolla con Introgresión de germoplasma mejorado	9.70	1.05
((C-67 x Pool-25 x (C-67 x Pool-21) x Pantera Y)-1	Población Criolla con Introgresión de germoplasma mejorado	11.21	1.12
((C-67 x Pool-25 x (C-67 x Pool-21))-1	Población Criolla con Introgresión de germoplasma mejorado	12.19	0.28

Anexo 2. Protocolo de desgrasado de harinas de maíz.

- Pesar 3 g PS de harina de maíz y colocar la harina en un tubo falcón de 50 mL.
- Agregar 15 mL de Bencina de Petróleo (Éter de Petróleo), llevar una proporción de 1:5 (V/V).
- Tener en agitación a 225 rpm durante 3 horas a temperatura ambiente ($24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$), vigilar periódicamente el tubo falcón si este aun presenta solvente.
- Filtrar en bomba de vacío con papel filtro Whatman No. 1.
- Dejar secar a temperatura ambiente ($24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$).

Anexo 3. Preparación de Buffers de extracción de proteínas solubles.

- *TRIS-HCl 40 mM + β -mercaptoetanol 15 mM pH 8.5
Pesar 0.4844 g de Trizma base más 1.17 mL de β -mercaptoetanol en 100 mL de agua destilada.
- * TRIS-HCl 40 mM pH 8.5
Pesar 0.4844 g de Trizma base y disolver en 100 mL de agua destilada.
* Ajustar pH con HCl 0.5 N o NaOH al 40%.
- Preparación de Buffer de Fosfatos 0.2 M pH 7.6
Buffer de fosfatos 0.2 M, pH 7.6: Mezclar 43.75 ml de Na_2HPO_4 0.2 M con 6.5 mL de NaH_2PO_4 0.2 M. Aforrar a 100 mL con agua destilada.
- * Cloruro de Potasio 50 mM pH 2.0
Pesar 0.3728 g de KCl y disolver en 100 mL de agua destilada.
- * Hidrólisis enzimática con Pepsina, preparar en fresco siempre que se realice una digestión en condiciones estériles.
Pesar 20 mg de pepsina y disolver en 1 mL de KCl 50 mM pH 2.0 estéril, agitar suavemente para disolver usar en proporción (1:5 v/v) o en una concentración de la solución stock de 0.8 mg mL^{-1} .

Anexo 4. Método de Bradford.

Ensayo para 1 mL, leer a 595 nm.

	Volumen (μL)	H ₂ O (μL)	Bradford (μL)
Blanco	-	800	200
BSA	3.0	797	200
Muestra	5.0	795	200

BSA= Albumina Sérica Bovina. Hacer por cuadruplicado.
Ejemplo para calcular proteína soluble en mg mL^{-1} .

- De la curva estándar de albúmina calcular la concentración de proteína en las muestras a evaluar (mg mL^{-1}), considerar que en 3 μL de estándar de albúmina hay 6 μg de proteína.

6 μg _____ 0.490 (absorbancia albúmina)
 X _____ 0.569 (absorbancia muestra)

6.97 μg _____ 5 μL
 X _____ 1000 μL

1 394 μg / 1000 = **1.39 mg mL⁻¹**

b) Para calcular proteína en mg g⁻¹ de peso seco.

Ej. 1.39 mg mL⁻¹

1.39 _____ 1 ml

X _____ 0.9 ml (vol. amortiguador de extracción)

4.22 mg / 0.1 g de tejido seco = 12.54 mg g⁻¹ peso seco.

Anexo 5. Preparación de medio solido Luria Bertani (LB).

Para 100 mL de medio de cultivo.

2.5 g de medio LB.

1.5 g de agar

Esterilizar a 121 °C por 20 minutos.

*30 μL de Kanamicina de un stock a concentración 30 mg mL⁻¹.

* Agregar a una temperatura aproximada de 40 a 45 °C.

Anexo 6. Preparación de Medio Mínimo M9.

Sales M9 para 1 L. H₂O destilada y autoclave.

Na ₂ HPO ₄	64.0 g
KH ₂ PO ₄	15.0 g
NaCl	2.5 g
NH ₄ Cl	5.0 g

1 M MgSO₄ -Filtrado estéril.

1 M CaCl₂ - Filtrado estéril en frío.

20 % Glucosa- Filtrado estéril en frío.

Stock de sales/ Glucosa: agregar 2 mL 1 M MgSO₄ y 50 μL 1 M CaCl₂ para 10 mL de 20 % Glucosa.

Kanamizina (Km) 30 mg mL⁻¹.

Preparación de diferentes volúmenes de medio mínimo líquido.

	100 mL	500 mL	1000 mL
Sales M9	20 mL	100 mL	200 mL
Stock de sales/Glucosa	2.4 mL	12 mL	24 mL
H ₂ O estéril	75 mL	375 mL	750 mL
Kanamizina	30 μL	150 μL	300 μL

Anexo 7. Protocolo de Hidrólisis de extractos proteicos estériles.

1. Pesar 100 mg de harina de maíz a peso seco y desgrasado.
2. Esterilizar en autoclave a 121 °C por 20 minutos.
3. Agregar 900 µL de Buffer de Fosfatos 0.2 M pH 7.6 estéril*.
4. Centrifugar a 13 000 rpm por 10 minutos.
5. Tomar el sobrenadante y colocarlo en un tubo eppendorf nuevo y estéril*.
6. Preparar solución stock de Pepsina a una concentración de 20 mg mL⁻¹ y disolver en KCl 50 Mm pH 2.0 ajustar pH con HCl a 0.5 N filtrar en frío*.
7. Colocar 200 µL del extracto proteico en un tubo eppendorf nuevo y estéril agregar 40 µL de pepsina (1:5 V/V)*.
8. Dejar en agitación los tubos a 37 °C a 225 rpm por 14 horas.
9. Centrifugar a 5 320 rpm a 4 °C por 20 minutos, tomar el sobrenadante y colocarlo en un tubo eppendorf nuevo*.

* Condiciones estériles y asépticas.

Anexo 8. Protocolo de ensayo microbiano para la detección de los niveles de metionina en extractos proteicos.

1. Agregar 900 µL de medio mínimo M9 líquido en un tubo eppendorf nuevo.
2. Agregar 25 µg de proteína hidrolizada más 20 µL de inóculo fresco bacteriano auxotrófico de metionina.
3. Mantener en agitación a 225 rpm a 37 °C por 18 horas.
4. Leer a 595 nm, el espectrofotómetro se calibra a 0 con medio mínimo líquido M9.

Anexo 9. Preparación de Fase Móvil del HPLC.

Buffer A: Agua tetradestilada 1 L + 0.12 % Ácido Trifluoroacético (TFA).

Buffer B: Acetonitrilo 1 L + 0.10 % Ácido Trifluoroacético (TFA).