

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMIA

DETERMINACION DE TRIPTOFANO Y LISINA EN MAIZ (Zea mays L.) UTILIZANDO
UNA PRUEBA RAPIDA DE ANALISIS Y SU COMPROBACION CUANTITATIVA

~~TESTS~~

Presentada a la Honorable Junta Directiva
de la
Facultad de Agronomía
de la
Universidad de San Carlos de Guatemala

Por

MARCELO RUBEN VELASQUEZ LOPEZ

En el acto de su investidura como

INGENIERO AGRONOMO

En el Grado Académico de

LICENCIADO EN CIENCIAS AGRICOLAS

TESIS DE REFERENCIA

NO

**NO PUEDE SACAR DE LA BIBLIOTECA
BIBLIOTECA CENTRAL - USAC.**

Guatemala, Marzo de 1979

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central
Sección de Tesis

R
01
T(4-6)

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

RECTOR

Lic. Saúl Osorio Paz

JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE AGRONOMIA

Decano en Funciones:	Ing. Agr. Rodolfo Estrada G.
Vocal 1o.:	Ing. Agr. Rodolfo Estrada G.
Vocal 2o.:	Dr. Antonio A. Sandoval S.
Vocal 3o.:	Ing. Agr. Sergio A. Mollinedo B.
Vocal 4o.:	Br. Juan Miguel Brías
Vocal 5o.:	Br. Giovanni Reyes
Secretario:	Ing. Agr. Leonel Coronado Cabarrús

TRIBUNAL QUE PRACTICO EL EXAMEN
GENERAL PRIVADO

Decano Interino	Ing. Agr. Salvador Castillo
Examinador:	Ing. Agr. Víctor García Urbina
Examinador:	Ing. Agr. Julio Estrada Leal
Examinador:	Ing. Agr. Rolando Aguilera
Secretario:	Ing. Agr. Oswaldo Porres

Guatemala, 21 de febrero de 1979

Señor Decano de la
Facultad de Agronomía
Ingeniero Rodolfo Estrada G.
Presente

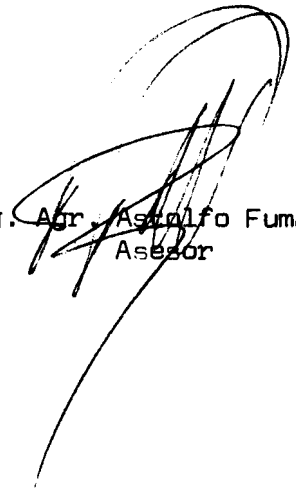
Estimado Señor Decano;

Por medio de la presente deseo notificarle que he asesorado el trabajo de Tesis de grado para obtener el título de INGENIERO AGRONOMO, del P.A. Marcelo Rubén Velásquez López. Dicho trabajo titulado "DETERMINACION DE TRIPTOFANO Y LISINA EN MAIZ (Zea mays L.) UTILIZANDO UNA PRUEBA RAPIDA DE ANALISIS Y SU COMPROBACION CUANTITATIVA", he encontrado enteramente satisfactorio, y en mi opinión, llena ampliamente los requisitos para su aceptación como tal.

Por lo anteriormente indicado, agradeceré mucho que usted se sirva revisar el trabajo, a fin de dar su visto bueno para que el Señor Velásquez López pueda llevar a cabo su examen de tesis respectivo

Agradeciendo su atención, lo saluda,

Atentamente.



Ing. Agr. Asdrúbal Fumagalli C.
Asesor

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central
Sección de Tesis

HONORABLE JUNTA DIRECTIVA
HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

De conformidad con lo establecido en la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala previo a optar el título de Ingeniero Agrónomo, tengo el honor de someter a vuestro criterio el trabajo de tesis titulado:

**DETERMINACION DE TRIPTOFANO Y LISINA EN MAIZ (Zea mays L) UTILIZANDO
UNA PRUEBA RAPIDA DE ANALISIS Y SU COMPROBACION CUANTITATIVA**

Espero que el presente trabajo sea una contribución a la información básica necesaria para quienes trabajan para programas de mejoramiento del valor nutritivo del maíz. Al mismo tiempo espero que sea merecedor de vuestra aceptación.

(f) Marcelo Rubén Velásquez López

DEDICO ESTE ACTO

A la Facultad de Agronomía

A la Universidad de San Carlos de Guatemala

DEDICATORIA

A mi esposa Luz Marina y a mi hijo Enrique

AGRADECIMIENTO

Dejo constancia de mi agradecimiento especial al Ingeniero Agrónomo Astolfo Fumagalli por su interés y acertadas sugerencias en la revisión y asesoramiento de este trabajo de tesis.

Mi reconocimiento al Ingeniero Agrónomo Infiere Arnoldo García Soto, investigador del ICTA asignado a la División de Ciencias Agrícolas y de Alimentos del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP) por su valiosa y entusiasta colaboración en el desarrollo de los análisis cuantitativos.

A los Doctores Ricardo Bressani y Roberto Gómez B. del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá, por la oportunidad que se le brindó al autor de trabajar con ellos en el montaje de una prueba de análisis rápida de triptofano y lisina para maíz.

Al Ingeniero Agrónomo Alejandro Fuentes, Coordinador del Programa de Maíz del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola ICTA por haber proporcionado los materiales genéticos de este estudio.

Al Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola (ICTA) por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo de investigación.

CONTENIDO

1. INTRODUCCION
2. REVISION DE LITERATURA
 - 2.1 Importancia del maíz
 - 2.2 Morfología del grano
 - 2.2.1 El endospermo
 - 2.2.2 El germen
 - 2.2.3 El pericarpio
 - 2.3 Proteínas y aminoácidos en el grano de maíz
 - 2.3.1 Carbohidratos
 - 2.4 El maíz Opaco-2
 - 2.5 Comparación de la calidad proteínica del maíz normal y Opaco-2
 - 2.6 El mejoramiento de la calidad de proteína del maíz
 - 2.7 Determinación de los aminoácidos lisina y triptofano
3. MATERIALES Y METODOS
 - 3.1 Hipótesis I y II
 - 3.2 Variedades utilizadas en el estudio
 - 3.3 Procedimiento de estudio
 - 3.4 Métodos utilizados
 - 3.5 Escala para lectura en la prueba rápida
 - 3.6 Separación de las muestras para análisis cuantitativo
 - 3.7 Métodos utilizados para análisis cuantitativo en el INCAP. Determinación del triptofano.
 - 3.8 Determinación de la lisina
 - 3.9 Diseño experimental
 - 3.10 Análisis estadístico
 - 3.11 Análisis de regresión
4. DISCUSION DE RESULTADOS
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES
6. BIBLIOGRAFIA
7. APENDICES

CUADROS

1. Ingesta de maíz y su contribución de proteína y calorías a la dieta diaria.
2. Distribución de la proteína y sus componentes en el endospermo del grano del maíz normal, Opaco-2 y Harinoso-2
3. Contenido de aminoácidos en fracciones de proteína de endospermo de maíz.
4. Composición de aminoácidos en endosperma y germen desgrasados de maíz normal y Opaco-2 (g por 100 g de proteína)
5. Materiales y resultados en grados de intensidad de color y % de triptofano, lisina y proteína.
6. Descripción de los materiales y resultados obtenidos en la prueba rápida, según intensidad de color y % de triptofano en la proteína del endospermo.
7. Descripción de los materiales y resultados obtenidos en la prueba rápida, según intensidad de color y % de lisina en la proteína del endospermo.
8. Análisis de varianza de los datos de g de triptofano por 100 g de proteína en 15 variedades de maíz.
9. Contenido promedio g de triptofano por 100 g de proteína.
10. Análisis de varianza de los datos de 5 grados de intensidad de coloración para determinar triptofano.
11. Promedio de los grados de intensidad de coloración.
12. Análisis de varianza de los datos de g de lisina por 100 g de proteína en 15 variedades de maíz.
13. Análisis de varianza de los datos de 5 grados de intensidad de coloración para determinar lisina.
14. Promedio de los grados de intensidad de coloración para determinar lisina.

FIGURAS

1. Distribución de la proteína y sus componentes en el grano de maíz.

GRAFICAS

1. Análisis de regresión con los datos de % de triptofano en la variedad Quetzal Oro Amarillo.
2. Análisis de regresión con los datos de % de triptofano en la variedad Quetzal Oro Blanco.
3. Análisis de regresión con los datos de % de triptofano en la variedad O₂E.D.A. Ch. 76
4. Análisis de regresión con los datos de % de triptofano en O₂ ### 71-13
5. Análisis de regresión con los datos de % de triptofano en la variedad Sintético I x O₂
6. Análisis de regresión con los datos de % de triptofano en la variedad Guatelan Xela x O₂
7. Análisis de regresión con los datos de % de triptofano en la variedad San Marceño x O₂
8. Análisis de regresión con los datos de % de lisina en la variedad Quetzal Oro Amarillo
9. Análisis de regresión con los datos de % de lisina en la variedad Quetzal Oro Blanco
10. Análisis de regresión con los datos de % de lisina en la variedad O₂E.D.A. Ch 76
11. Análisis de regresión con los datos de % de lisina en la variedad O₂ ### 71-13
12. Análisis de regresión con los datos de % de lisina en la variedad Sintético I x O₂
13. Análisis de regresión con los datos de % de lisina en la variedad Guatelan Xela x O₂
14. Análisis de regresión con los datos de % de lisina en la variedad San Marceño x O₂

INTRODUCCION

En el año de 1975, el autor tuvo la oportunidad de ser asignado por el Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola (ICTA), para trabajar en el Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP), con el objeto de encontrar una metodología apropiada y práctica para analizar rápidamente aquellos genotipos de maíz que son el resultado de los trabajos de mejoramiento proteico que el programa de Maíz del ICTA, ha desarrollado. Como resultado se obtuvo un método que aparentemente reunía las condiciones solicitadas por los fitogenetistas dedicados al mejoramiento de la calidad proteica del maíz.

Posteriormente tuve la oportunidad de tratar de probar en forma práctica las bondades y deficiencias de este método, los resultados aquí presentados son el fruto de esos estudios, que espero puedan ser utilizados por aquellos que se dedican al mejoramiento del maíz, en su aspecto nutricional, para bien de la mayoría de compatriotas que dependen de este grano básico para su alimentación.

En el presente trabajo de tesis se presentan los resultados obtenidos en la fase del análisis de la prueba rápida y en la comprobación mediante análisis cuantitativos.

Los objetivos del presente trabajo de investigación son los siguientes:

1. Determinar si es posible relacionar la intensidad de coloración que se obtiene en la prueba rápida y el contenido de los aminoácidos libres triptofano y lisina en el endospermo.
2. Comprobar mediante análisis cuantitativo el contenido de los aminoácidos triptofano y lisina en los diferentes gradientes de coloración obtenidos en la prueba rápida.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 Importancia del maíz.

El maíz es uno de los alimentos básicos de la población de la mayoría de los países del continente americano (5, 11, 20), debido a la gran variabilidad genética de este cereal, representa uno de los más grandes recursos naturales del hemisferio y del mundo, para alimentar a una creciente población.

A nivel mundial las proteínas de origen vegetal constituyen el 71% de las fuentes de proteína, de los cuales los cereales aportan con el 50% (5, 6, 38).

El maíz en los países en vías de desarrollo contribuye con un 50 a 60% de la proteína empleada en la dieta de estos países (5, 6). Del total de la producción mundial de proteína derivada de los cereales, aproximadamente 106 millones de toneladas, el maíz ocupa el segundo lugar en orden de producción y contribuye con la cuarta parte de este total (38). Los cereales por lo tanto constituyen los alimentos más importantes de los países en desarrollo cerca del 95% de la población de estos países obtienen de los cereales las calorías y proteínas que consumen (1, 5, 38).

Guatemala, resalta entre los países de mayor consumo diario con 349 gr de maíz por persona: en cuadro 1 se anota la ingesta diaria por persona en 14 países que en el Censo de la FAO de 1962 fue mayor de 100 gr por día, en ese cuadro se detalla la contribución que en calorías y proteínas implican esos consumos de maíz en las dietas diarias (5, 39).

Cuadro 1. Ingesta de maíz y su contribución de proteína y calorías a la dieta diaria.

País	Ingestión	Maíz Calorías g/día/Persona.	Proteínas
Guatemala	349	1,242	33.2
Africa del Sur	308	1,096	29.3
México	272	978	25.2
El Salvador	245	871	23.3
Honduras	228	813	21.7
Rumania	192	694	16.1
Arabia	166	597	15.4
Nicaragua	131	472	11.1
Colombia	122	437	11.5
Bolivia	119	429	11.1
Afganistán	112	402	10.4
Venezuela	108	393	8.7
Brasil	100	360	9.3
Portugal	100	357	8.3

Fuente: F. Poey 1975 (34)

2.2 Morfología del grano.

La constitución morfológica de las plantas y sus frutos determinan el potencial de producción del grano para alimento humano y animal (11, 12, 36). El grano de maíz está compuesto por estructuras morfológicas muy especializadas, esa especialización está asociada a características físicas y químicas que resultan en diferencias notables de las partes del grano (34).

2.2.1 El endospermo.

Generalmente esta estructura contribuye con el 80 - 85% del peso total del grano, siendo su función metabólica la de abastecer reservas alimenticias para el proceso de germinación del embrión y desarrollo inicial de la plántula, está constituido de células de paredes delgadas que contienen granos de almidón y proteína (3, 34, 36).

El endospermo está formado por dos tejidos; la aleurona que se produce por divisiones periclinales de las células periféricas y forman un tejido uniestratificado que circunda el resto del endospermo, y el parénquima amiláceo compuesto por células alargadas y poliédricas en sección transversal con sus ejes mayores orientados generalmente en todas direcciones. Los granos de almidón se encuentran embebidos dentro de una matriz proteínica y todo dentro de las células del parénquima (34, 36).

El contenido relativo de proteína del endospermo es bajo, aproximadamente de 8 a 10% pero su contribución a la calidad de la proteína total del grano es determinante, ya que representa el 75 - 80% de toda la proteína, esto es consecuencia de la alta proporción relativa del endospermo en el peso total del grano (17, 34, 36).

La proteína dentro del endospermo se distribuye uniformemente en asociación con los gránulos de almidón, la mayor concentración se encuentra en la aleurona reduciéndose de 36 a 22% en la región entre las capas celulares número 2 y 7 hasta alcanzar 9% en los números 8 y 14. Se ha establecido que la proteína del endospermo está compuesta por varias fracciones de las cuales la prolamina llamada zeína en maíz, es de bajo valor biológico y se encuentra en corpúsculos ubicados en la matriz proteínica que rodea los gránulos de almidón (34, 36).

Los carbohidratos constituyen generalmente la mayor parte del endospermo contribuyendo con 70 - 85% de su peso. Estos carbohidratos son principalmente almidones, los cuales han sido estimados en más de 85% del total de carbohidratos (11, 12, 16, 34).

El grado de compactación de los gránulos de almidón determina el fenotipo de las dos estructuras que pueden considerarse básicas (17, 34, 36). Cuando los gránulos están muy compactados asumen formas angulares que no permiten espacios entre ellos. Esta compactación caracteriza el endospermo córneo o vítreo, típico de granos cristalinos palomeros y de los hombros o secciones laterales de los granos dentados. Cuando los gránulos no están muy compactados, éstos asumen forma esférica ocasionando su organización la presencia de espacios entre ellos. Esta organización determinan la menor densidad y textura suave de los en-

dospemos de maíces harinosos y la observada en la corona y columna central del endospermo de maíces dentados (34, 36).

En los fenotipos cristalinos la proporción de almidón harinoso es mucho menor, limitándose a la columna central que a veces alcanza levemente la corona del grano (35, 39). En estos casos, dada la poca proporción o total ausencia de almidón harinoso, la superficie de la corona mantiene la característica lisa típica de granos cristalinos (34).

El color del endospermo (36), puede estar dado por la capa de aleurona que puede ser roja o púrpura y en el parenquima endospermico que puede ser amarillo o blanco. La coloración diferente o blanco está determinada químicamente por la presencia de pigmentos carotenoides y flavones. Entre los primeros que ocasionan la coloración amarilla, destacan los carotenos o provitamina A, que son hidrocarburos y las Xantofilas, que son moléculas derivadas de carotenos que contienen oxígeno (5, 7, 34).

Entre los pigmentos flavonoides se encuentran las antocianinas que son responsables de la coloración púrpura. De estos pigmentos, solamente los carotenos contribuyen al valor nutritivo del grano (7, 8, 34).

2.2.2 El germen.

Esta estructura contribuye generalmente con el 10% a 15% del peso seco del grano y su función biológica es la de producir una nueva planta bajo condiciones ambientales apropiadas para el crecimiento y diferenciación de sus tejidos. Se encuentra ubicado en la base del grano en forma aplanada y adyacente al endospermo. Su estructura está constituida por un eje principal vertical a la base del grano, forrado por la radícula y plúmula (7, 24, 34).

La composición química del germen desde el punto de vista nutricional es de singular importancia por su alta concentración de proteína y aceite, de excelente calidad biológica (5, 6, 7). La relación germen-endospermo, representa un potencial determinante para el mejoramiento del valor nutritivo del maíz especialmente cuando se consume el grano entero (5, 24, 34).

El contenido de proteína en esta estructura fluctúa entre 15 y 30% que representa al 15-20% de la proteína total del grano (34, 36).

2.2.3 El pericarpio.

Esta estructura contribuye aproximadamente con el 6% del peso total del grano y corresponde al tejido transformado de la pared ovárica que cubre totalmente el grano de maíz, sus funciones biológicas principales son aislar y proteger los procesos citogenéticos y metabólicos que dan por resultado, primero a la formación del germen y endospermo, posteriormente a la germinación y desarrollo de la nueva planta (34, 37).

A veces la coloración externa del grano depende del pericarpio y no del endospermo,

esta coloración puede ser anaranjada, roja, morada o abigarrada y depende de la presencia de taninos y pigmentos antociánicos (11, 34). Los taninos tienen capacidad de ligamentos de proteínas que inhibe sistemas enzimáticos encontrándose comúnmente en células moribundas o muertas. Su capacidad de inhibir sistemas enzimáticos contribuye a la resistencia de hongos y otros patógenos en esos tejidos, nutricionalmente el pericarpio es de difícil digestión y poco valor nutritivo por estar constituido principalmente por celulosa (32).

2.3 Proteínas y aminoácidos en el grano de maíz.

Las proteínas son grandes moléculas de muy alto peso molecular, que están compuestas por los elementos: Carbono, Hidrógeno, Oxígeno, Nitrógeno y en ocasión Fósforo y Azufre (34, 36).

El contenido de Nitrógeno (34, 36) en la proteína total mantiene una relación bastante constante en los granos de los diferentes cereales, así para el maíz, sorgo y arroz, esta proporción es de 16% razón por lo cual para estimar el contenido de proteína total se multiplica el porcentaje de nitrógeno analizado por el factor 6.25 (100/16).

Para descomponer las proteínas en sus aminoácidos se requiere que los enlaces de Hidrógeno se hidrolicen en presencia de ácido; para analizar el contenido de aminoácidos en el laboratorio se utiliza generalmente ácido clorhídrico, separándose los aminoácidos del hidrolizado en forma de clorhidratos. El aminoácido esencial triptofano se destruye con la digestión ácida, debido a la hidrolización del grupo pirrólico, razón por lo que se acostumbra analizar en hidrólisis alcalina (34, 41).

Los animales monogástricos necesitan de los aminoácidos para su nutrición, pueden sintetizar algunos en su metabolismo natural, mientras que otros deben ser proporcionados en la dieta. Estos últimos se denominan esenciales y son: Valina, Leucina, isoleucina, treonina, metionina, lisina, arginina, histidina, fenilalanina y triptofano (11, 34, 36).

Las proteínas del maíz (5, 7, 34, 36), se dividen de acuerdo a su solubilidad en diferentes agentes en cuatro grupos principales: albuminas, Globulinas, Glutelinas y Prolaminas.

Las albiminas y Glutelinas se caracterizan por un excelente balance de aminoácidos-esenciales y corresponden a las proteínas del germen. Las glutelinas y prolaminas llamados de reserva son proteínas de inferior calidad debido principalmente a su bajo contenido de algunos aminoácidos esenciales entre los que destacan la lisina y triptófano (34, 36).

De las dos proteínas de reserva, prolaminas y globulinas, (fig. 1) las prolaminas llamadas zeína en el maíz son de inferior calidad y se encuentran en mayor concentración en el endospermo (5, 8, 24, 36).

En el cuadro 2 se resumen los valores reportados para cuatro tipos de proteína descritos anteriormente en el endospermo de maíz normal, Opaco-2 y Harinoso-2. También se incluyen estos valores para el grano de maíz normal (Nelson 1919 y Concon 1966) citados por

F. Poey (34, 36).

La composición de aminoácidos en cada fraccionamiento de las proteínas descritas difieren grandemente (véase cuadro 2). Las albuminas y globulinas son ricas en los aminoácidos básicos, lisina, arginina, triptofano y cistina (7, 11). Las prolaminas que en el maíz se denominan Zeína, tienen un alto contenido de aminoácidos no-polares como leucina, alanina, prolina y neutros como glutamina. La zeína es deficiente en lisina y triptofano por lo que contrasta su baja calidad nutricional con las albuminas y globulinas que son de excelente valor biológico (7, 11, 34, 36).

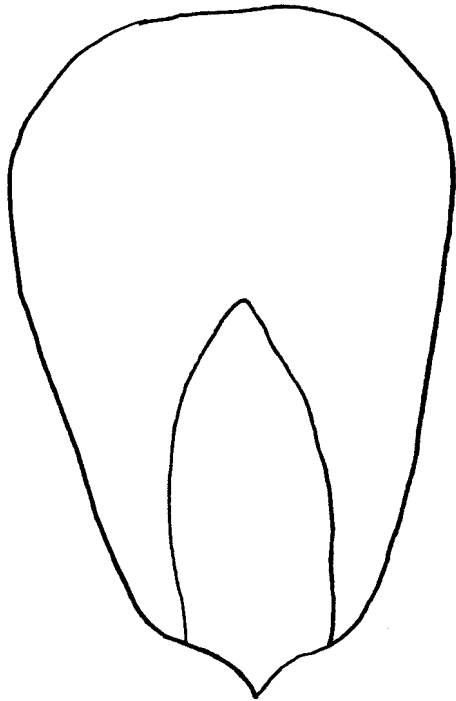
Las proteínas de almacenamiento se encuentran principalmente en el endospermo de los cereales, los cuales son utilizados por el embrión durante los procesos de germinación y desarrollo inicial de la plántula, generalmente la constitución de estas proteínas es de baja calidad, predominando las prolaminas y glutelinas (5, 34, 35).

Para los animales monogástricos las proteínas son particularmente importantes durante el desarrollo de organismos en crecimiento, así por ejemplo: para lactantes la ingesta de proteína recomendada para satisfacer los requerimientos mínimos de aminoácidos esenciales es aproximadamente 10 veces mayor que la requerida por adultos de acuerdo a gramos por Kg. de peso por día (3, 6, 11, 34).

2.3.1 Carbohidratos.

Los carbohidratos desempeñan funciones de fuente y almacenamiento de energía química, además de estructurales en las células de las plantas. Los polisacáridos producen un gran número de monosacáridos al hidrolizarse y son las de mayor importancia por sus funciones nutritivas y estructurales. El almidón componente principal del endospermo del maíz, pertenece a este grupo, así como la celulosa componente principal del pericarpio; es de interés resaltar que estos dos últimos compuestos no nutritivo y el otro de poco o ningún valor biológico para animales monogástricos, son químicamente muy similares (34, 35, 36).

FIGURA 1. DISTRIBUCION DE LA PROTEINA Y SUS COMPONENTES EN EL GRANO DE MAIZ (Nelson 1969, Concon 1966).



ENDOSPERMO: 75-85% de la proteína total

	+	% de la proteína O ₂	fl ₂
Alúminas	3.8	12.1	9.6
Globulinas	2.0	5.1	7.3
Prolaminas (zeína)	55.1	22.9	29.0
Glutelinas	31.8	50.1	40.8

GERMEN: 15-20% de la proteína total.

	+
Alúminas y Globulinas	30-40
Prolaminas (zeína)	5-10
Glutelinas	49-54

Fuente: F. Poey (36).

CUADRO 2. Distribución de la proteína y sus componentes en el endospermo del grano de maíz normal, Opaco-2 y harinoso-2 (Nelson 1969 y Concon, 1966).

	Normal	% de la Proteína O ₂	fl ₂
Albúminas	3.8	12.1	9.6
Globulinas	2.0	5.1	7.3
Prolaminas (zeina)	55.1	22.9	29.0
Glutelinas	31.8	50.1	40.8

Fuente: F. Poey. 1975 (34).

CUADRO 3. Contenido de aminoácidos en fracciones de proteína de endospermo de maíz (Reiners, et al 1973)

Aminoácidos	mg por 100 g proteína			Glutelinas
	Albuminas	Globulinas	zeina	
Lisina	44	41	1	18
Histidina	16	25	8	18
Amoníaco (Principalmente de glutamina y Asparagina)	84	80	148	202
Arginina	43	72	10	30
Acido Aspártico	73	58	41	49
Treonina	45	28	24	34
Serina	48	53	52	47
Acido Glutámico (principalmente como Glutamina)	86	114	166	131
Prolina	45	33	94	73
Glicina	93	73	17	62
Alanina	85	60	110	79
Valina	50	49	31	45
Metionina	10	7	10	25
Isoleucina	28	23	31	29
Tirosina	49	17	31	31
Fenilalanina	21	28	43	27
Triptofano	6	4	0	3

Fuente: F. Poey, (34).

2.4 El maíz Opaco-2

En 1963 el Dr. E. T. Mertz y sus colaboradores en la Universidad de Purdue, descubrieron que el gen mutante Opaco-2 del maíz o_2/o_2 modifica el equilibrio de aminoácidos en la proteína del endospermo del grano. Esta modificación da como resultado mayores cantidades de los aminoácidos lisina y triptofano, abriendo interesantísimas perspectivas para los fitomejoradores, productores y especialistas en nutrición humana y animal (11, 12, 14).

El equipo de Purdue donde figuran Edwin T. Mertz, Lyn S. Bates y Oliver Nelson (4, 28, 34), empleando nuevos métodos para el análisis de aminoácidos, analizaron convenientemente el designado mutante Opaco-2, este reveló una virtud insospechada; su contenido de lisina que fué de 3.4% de la proteína del endospermo y un 70% mayor que en el maíz normal, en tanto que el contenido de triptofano se duplicó todo a costas de la fracción prolamina llamada zeína. La calidad deficiente de la proteína del maíz se debe al hecho de que la proteína total del grano normal, alrededor de un 8 a 10% del endospermo, una buena cantidad está en la fracción zeína de la proteína, que es inapropiada para la nutrición de animales monogástricos como los humanos. En términos prácticos, descontando la zeína, el grano normal representa alrededor de un 4.5% de proteína efectiva, la zeína predomina a costas de la lisina y del triptofano, que son dos de los 10 aminoácidos esenciales en virtud de que el organismo humano no puede sintetizarlos y por ende debe obtenerlos de los alimentos que consume (11, 12, 34, 35, 36).

El gene recesivo normal (o_2) que en la condición homocigota produce la apariencia y textura del grano Opaco, induce también mayores niveles de glutelina, la fracción proteínica rica en lisina y deprime los niveles de la fracción prolamina llamada zeína (11, 35).

El descubrimiento hecho en Purdue apareció en la revista Science en Julio de 1964 (1, 27), más tarde el Dr. Dale Harpstead Fitogenetista de maíz advirtió de inmediato que un maíz de alta calidad proteínica podría tener un impacto trascendental sobre la mal-nutrición proteínica endémica de nuestros países, le llevó dos años más transformar el descubrimiento del laboratorio de Indiana en una cosecha de maíz en Colombia. A principios de 1965, el Dr. D. Harpstead, pudo obtener solo 25 granos de la pequeña y valiosa colección de semilla experimental de Purdue. Después de multiplicar las semillas, cruzarlas con variedades adaptadas a las condiciones locales y de examinar en el laboratorio los híbridos resultantes fue hasta 1967 cuando tuvo suficiente maíz con gen Opaco-2 incorporado, para comenzar pruebas de nutrición con animales (1, 27). Estos resultados abrieron una nueva posibilidad, una nueva esperanza para los millones de seres humanos que se debaten entre la vida y la muerte por la desnutrición que aqueja a la mayoría de los habitantes de los países en desarrollo.

CUADRO 4. Composición de aminoácidos en endosperma y germen desgrasados de maíz normal y Opaco-2 (g por 100 g de proteína) Datos de Nelson et al 1965 y Mertz et al 1966.

Aminoácidos	Normal		Opaco-2	
	Endospermo	Germen	Endospermo	Germen
Lisina	1.6	6.1	3.7	5.9
Triptofano	0.3	- -	0.7	- -
Ammoníaco	- -	2.2	- -	2.1
Histidina	2.9	2.9	3.2	2.9
Arginina	3.4	9.1	5.2	9.2
Acido Aspártico	7.0	8.2	10.8	9.2
Acido Glutámico	26.0	13.1	19.8	13.9
Treonina	3.5	3.9	3.7	3.7
Serina	5.6	5.5	4.8	5.0
Prolina	8.6	4.8	8.6	5.3
Glicina	3.0	5.4	4.7	5.5
Alanina	10.1	6.0	7.2	5.8
Valina	5.4	5.3	5.3	4.4
Cistina	1.8	1.0	0.9	0.9
Metionina	2.0	1.7	1.8	1.5
Isoleucina	4.5	3.1	3.9	2.5
Leucina	18.8	6.5	11.6	5.6
Tirosina	5.3	2.9	3.9	2.2
Fenilalanina	6.5	4.1	4.9	3.6
% Proteína	12.7	- -	11.1	- -

Fuente: P. Poey (34).

2.5 Comparación de la calidad proteínica del maíz normal y Opaco-2.

La cantidad total de proteína en los cereales como se ha expresado anteriormente es baja, el maíz contiene cantidad en poco menores que el trigo (5, 30, 36). Esto es un hecho de mucha importancia, ya que el valor nutritivo de la proteína en los alimentos dependen tanto de la calidad como de la cantidad de ésta. Debido a que la diferencia en el contenido de proteína total en los cereales es relativamente baja, el factor de calidad es el de mayor importancia (34, 35).

Las razones del valor proteínico superior del maíz Opaco-2, en comparación con el maíz común, se resumen en el cuadro 4, en primer término el contenido de proteína, aunque es un poco más alto para el maíz normal que para el Opaco-2, no explica la diferencia en la calidad de la proteína entre los dos, ya que el maíz común puede contener mayor concen-

tración proteínica pero la calidad es inferior como ha sido demostrado; las diferencias en la composición de aminoácidos, sin embargo principian a notarse al comparar la distribución de la proteína del endospermo (7, 34, 36).

Desde el descubrimiento del maíz Opaco-2, se han realizado muchos estudios demostrando sus excelentes cualidades nutritivas en ratas (5, 6, 11) pollos (1, 42), cerdos (1, 11, 42) y en seres humanos, niños y adultos (6, 11).

Pruebas más elaboradas confirmaron que la proteína del endospermo del maíz Opaco-2 proporcionó una base dietética adecuada para la recuperación de niños desnutridos, o bien podría usarse para la alimentación de infantes normales cuando no se dispone de proteínas de origen animal. Derivando una conclusión menos clínica, Pradilla declaró, "Tenemos ahora un fuerte potencial de proteína de alta calidad y bajo costo que puede contribuir mucho a evitar la desnutrición" (6, 42).

A partir de otros estudios con niños, un colega del Dr. Pradilla el Dr. Ricardo Bressani del Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP), con sede en Guatemala, confirma que el valor nutritivo de la proteína del maíz Opaco-2, es alto y su calidad es alrededor del 90% con respecto a la de la leche descremada según se ha probado en niños. Bressani también asegura que "La incorporación del gene Opaco-2, en el maíz común parece ser un enfoque práctico al problema de mejorar la calidad proteínica de las dietas humanas basadas en maíz y de esta manera mejorar el estado nutricional de poblaciones con deficiente ingesta de proteínas" (5, 6, 7, 9, 10).

El efecto inmediato del éxito del maíz con calidad proteínica en Colombia fué el de enfocar y acelerar los esfuerzos en todo el mundo para mejorar la calidad proteínica del maíz y de otros cultivos (1). En el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), propuso integrar la investigación sobre maíz de calidad proteínica con su programa orientado hacia el desarrollo de variedades de maíz tropical ampliamente adaptadas de alto rendimiento (17).

2.6 El mejoramiento de la calidad de proteína del maíz.

El descubrimiento clave de los efectos bioquímicos del gene Opaco-2, demostró que la calidad de la proteína en el endospermo de maíz normal puede ser modificada favorablemente mediante el aumento de los niveles de los aminoácidos esenciales lisina y triptofano (1, 4, 7). Este descubrimiento generó un gran interés entre los genetistas de maíz de todo el mundo por producir versiones Opaco-2 de variedades de maíz normal cristatinas y dentadas, con calidad de proteína mejor balanceada (9, 10, 11, 12).

En 1966 el CIMMYT (12, 16), comenzó a trabajar con Opaco-2 y harinoso-2. Los mutantes que abrieron nuevas perspectivas al mejoramiento de la calidad nutritiva del maíz, se planteó una serie de problemas por resolver antes de lograr maíces comerciales y materiales de mejoramiento con niveles altos de proteína. Desde entonces se han llevado a cabo numerosos estudios con estos dos mutantes comparados con maíces normales y en cruza con diversos materiales, después de más de una década de trabajos de laboratorio y de laborar en

sus campos experimentales, el personal de maíz del CIMMYT pudo informar que para sus mejores variedades elite, "Los rendimientos son hasta de 5,500 kilos por hectárea en parcelas de agricultores, dentro de una variación de 10% con respecto a los rendimientos medios obtenidos en la faja maicera de los Estados Unidos" (11, 14, 15). Pero aún cuando todavía revisaban afanosamente los datos genéticos del maíz normal, y con el éxito último aún en duda, los fitogenetistas aceptaron el riesgo del apareamiento de sus variedades mejoradas normales con el mutante de alta calidad proteínica, que poseía una serie heredada de defectos neutralizadores de sus bondades nutritivas. El problema clave era la apariencia y la textura de los granos; el gene que incrementaba el contenido de lisina y triptofano del grano también se asociaba con sus características de opacidad, color blancuzco de tiza y endospermo suave (11). Si bien la opacidad daba al científico un indicador visual conveniente de la calidad proteínica, también hacía al maíz poco atractivo para los consumidores habituados a un maíz normal translúcido, blanco o amarillo brillante y de textura dura (11, 15, 34).

En los granos Opacos, los gránulos de almidón tienen un empaque menos denso que en los granos normales. Así los granos del maíz opaco son más ligeros, lo cual reduce los rendimientos de los agricultores entre 10 y un 15% como promedio (11, 34, 36).

Para los científicos de maíz del CIMMYT, y de otros programas similares en el mundo el problema por resolver ha sido el de retener los mejores atributos tanto del maíz normal como del maíz Opaco-2, esto ha significado la búsqueda de "genes modificadores", que disocian la característica de calidad proteínica del maíz opaco de la textura que reduce el rendimiento y de la apariencia que ahuyenta a los consumidores (11, 12, 18, 19).

En Guatemala en 1,966 el programa de maíz de la Dirección General de Investigación Agrícola, inició por primera vez trabajos tendientes a mejorar la calidad proteínica de los maíces locales cruzándolos con Opaco-2 proveniente de la Universidad de Purdue. Posteriormente se recibieron nuevas introducciones procedentes de diversas fuentes: Cal Poli, USA, CIMMYT en México y del CIAT de Colombia (2, 20). En el material evaluado inicialmente se pudo observar susceptibilidad a enfermedades, escasa o ninguna producción de pólen, pudriciones y mal aspecto de la mazorca y grano (20, 21).

Actualmente el programa de maíz del ICTA, ha logrado realizar avances en cuanto a metodología genética y mediante un acuerdo entre el INCAP y el ICTA ambas instituciones aunando esfuerzos esperan obtener resultados positivos en un corto plazo, produciendo variedades modificadas que puedan substituir a las criollas actuales que mejorarán la dieta del campesino guatemalteco que depende del maíz para su alimentación.

2.7 Determinación de los aminoácidos lisina y triptofano.

La mayoría de los investigadores dedicados al mejoramiento de maíz (2, 34, 36), durante las etapas iniciales efectuaban estudios con objeto de tratar de identificar cualquier característica morfológica o fisiológica visible del maíz que pudiera ser útil como "Marcador", asociado a la proteína de alta calidad. El grano Opaco caracterizado por el gen Opaco - 2 era el único de esos marcadores y presentaba dos deficiencias fundamentales como criterio de selección. En primer lugar anulaba toda oportunidad de obtener mejores tipos de grano de

endospermo duro y en segundo lugar, en las poblaciones de grano opaco, no servía para diferenciar las líneas de proteína de alta calidad de las normales (11, 17, 18).

La utilización del "Diafanoscopio" como método para separar granos de alta calidad proteínica de los granos normales en poblaciones con el gene Opaco-2 consiste en hacer una selección sobre una superficie transiluminada, los granos opacos se pueden distinguir fácilmente de los normales. Pero en granos modificados el ligamento entre la calidad proteínica y apariencia anormal no se puede diferenciar con certeza por selección visual (2, 11, 25, 26).

Otra alternativa es el análisis químico de los granos para determinar la cantidad y calidad de la proteína de los cereales, de estos hay varios métodos dependiendo de los propósitos y objetivos que se persiguen, sin embargo se ha encontrado que la evaluación bioquímica y biológica constituye la limitación más importante en los programas de mejoramiento proteico en los maíces adaptados con o sin gene Opaco-2 (7, 11, 23, 34).

No se ha hallado otra posibilidad de identificar las líneas de maíz con alto contenido de lisina y de triptofano que no sea la realización de un cuidadoso análisis químico (9, 10, 11, 34).

La mayoría de estos métodos de laboratorio tienen la desventaja para el fitomejorador, que requieren la destrucción del grano para su análisis por lo que se ha tratado de desarrollar métodos que solamente necesiten pequeñas porciones del endospermo para su análisis, de estos hay varios ya en uso; pero requieren equipos de alto costo y son lentos en dar resultados (4, 12, 23, 34, 38, 39).

Para los mejoradores de maíz, se necesitan métodos rápidos y que permitan la utilización de los granos analizados para su siembra posterior, de estos los análisis colorimétricos cualitativos son los más prácticos (25, 29, 31, 39, 41).

Los laboratorios de la Universidad de Purdue, USA, CIMMYT México, e INCAP, Guatemala; han estudiado y modificado varios métodos de análisis colorimétricos con la idea de poner a disposición de los mejoradores de maíz, una herramienta práctica de bajo costo y que permita analizar cualitativamente grandes volúmenes de muestras. Para ellos se han empleado, diferentes reactivos y metodologías que en la práctica han demostrado sus bondades y limitaciones. De todos estos métodos el desarrollado por Mertz, (31) ha demostrado ser por el momento el de mejores posibilidades, la literatura al respecto es extensa (11, 23, 25, 28, 31, 34, 36, 38, 39, 40, 41), la cual explica con detalle cada uno de estos métodos. Para los propósitos de este trabajo sin embargo haré referencia al método de Mertz (31) modificado por el INCAP en el cual el autor tomó parte. (25, 26).

En un simposium en 1971, fué reportado que el endospermo de maíz Opaco-2 contiene más altos niveles de aminoácidos libres solubles en agua que en los maíces normales. En el desarrollo de una prueba rápida colorimétrica para detectar mutantes con alto contenido en lisina y triptofano, surgió la idea que el exceso de aminoácidos libres en un mutante puede ser determinado con ninhidrina (31, 36).

La ninhidrina reacciona rápidamente detectando la diferencia total de aminoácidos libres en el grano normal y un mutante, las diferencias observadas fueron demostradas utilizando granos de maíz, sorgo y cebada; éste método colorimétrico utiliza como reactivos; agua, ninhidrina, citrato de sodio y ácido cítrico, los tubos conteniendo la muestra son sometidos a calentamiento (31).

La ninhidrina para análisis es un reactivo sensible que se utiliza sobre todo para la demostración y la determinación fotométrica de péptidos ligeros y aminoácidos libres. La reacción química se basa en una reducción de la ninhidrina seguida de formación de un colorante (29).

La prueba rápida de ninhidrina desarrollado por E.T. Mertz en 1,973 (31); para seleccionar variedades de maíz, sorgo y cebada altos en lisina, requiere de una mezcla de ninhidrina pH 5.0 obtenidos de 16 gramos de ninhidrina, 58 gramos de citrato de sodio y 26 gramos de ácido cítrico.

Procedimiento: Se cortan por la mitad a lo largo 5 gramos de maíz con una hoja de afeitar o navaja bien afilada. Se colocan los granos cortados en un tubo de vidrio de 3/4 x 5 pulgadas y se les agrega con una jeringa 10 ml de agua destilada. A cada uno de los tubos se les agrega una medida de 300 mg de la mezcla de ninhidrina. Se agitan los tubos y se calientan en una llama hasta que principian a hervir, aproximadamente a los 5 minutos. Se dejan en reposo toda la noche y se observa el color azul violeta al día siguiente; las muestras bajas en lisina no dan color (31).

Este método tiene las siguientes desventajas:

- 1.- Se pierden los genotipos analizados.
- 2.- Solamente identifica los límites máximos y mínimos.
- 3.- Debido al nivel crítico de calentamiento por llama los tubos de ensayo, es errático por factores inherentes a la habilidad del operador.

La prueba rápida desarrollado en el INCAP por Gómez B.R., C.E. Acevedo., R. Bressani y el autor (25, 26) es una modificación del método desarrollado por E.T. Mertz (31) que puede detectar cambios en los materiales mejorados. No necesita de equipo especial, es económica para aplicarla a gran número de muestras. No destruye completamente el material a prueba el cual puede utilizarse para siembras posteriores, es sencilla para que pueda realizarla una persona con poco entrenamiento, es rápida para probar numerosas muestras por día.

Las principales modificaciones y ventajas al método de Mertz consisten en:

- 1.- Se analiza una pequeña porción del endospermo. El resto de la semilla no pierde viabilidad y permite sembrarse para estudios agronómicos posteriores.
- 2.- Los reactivos ácido cítrico y citrato de sodio son reemplazados por acetona.
- 3.- El calentamiento se realiza por medio de calor seco, empleando un horno a tempera-

constante de 100°C durante 5 minutos lo que permite utilizar bandejas de papel de aluminio para colocar las muestras.

- 4.- Se reduce considerable el tiempo aumentando la capacidad de analizar gran cantidad de muestras.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 HIPOTESIS I

El de estudiar la posibilidad de que el método de análisis "Prueba Rápida Método Modificado INCAP", fuese de utilidad práctica en un programa de mejoramiento protéico de maíz.

HIPOTESIS II

La posibilidad de poder diferenciar gradientes de contenido de lisina y triptofano a través de intensidad de coloración.

3.2 Variedades utilizadas en el estudio.

Para el desarrollo de este estudio se utilizaron materiales cultivados en la zona cálida y fría de Guatemala, éstas variedades y algunas familias están en mejoramiento por el Programa de Maíz del ICTA, siendo los siguientes:

1. Quetzal Oro Amarillo
2. Quetzal Oro Blanco
3. O₂ E.D.A. Chimaltenango 76
4. O₂ ### 71-13
5. Sint. I x O₂
6. Guatelan Xela x O₂
7. San Marceño x O₂
8. O₂ ### -9
9. Criollo Amarillo
10. Sintético de 6 líneas
11. San Marceño
12. Compuesto Blanco
13. X-304 A
14. X-306 B
15. Bárcena 71

3.3 Procedimiento de estudio.

En este experimento se siguió una secuencia de trabajo de acuerdo al proyecto elaborado:

Preparación de las muestras: Se recolectaron mazorcas representativas de materiales criollos, variedades de polinización libre, híbridos de explotación comercial y poblaciones con el gen Opaco-2. Los materiales fueron cosechados en las Estaciones Experimentales del ICTA, de la Máquina en la zona cálida y Labor Ovalle en la Zona fría, en el Valle de - Quetzaltenango, además en Chimaltenango para la zona media.

Se utilizaron 500 granos de cada material, los que fueron sometidos al análisis de - prueba rápida y posteriormente para comprobación mediante análisis cuantitativo en el Laboratorio del INCAP.

3.4 Métodos utilizados.

La prueba rápida procedimiento sometido a comprobación en este estudio, este método fué modificado en el INCAP, en 1974, por los Drs. Roberto Gómez B., Ricardo Bressani y el autor de ésta tesis.

La prueba rápida es una modificación del método desarrollado por E.T. Mertz en 1973 (31), la técnica modificada para seleccionar maíces normales y aquellos que tienen el gen Opaco-2. Esta técnica consiste en separar un pedazo del endospermo del grano utilizando una cuchilla o bisturí, se debe tener el cuidado de no lastimar el embrión.

Equipo y reactivos para la prueba rápida "Método Modificado INCAP" para determinar lisina y triptofano:

- a. Horno eléctrico con temperaturas constantes mayores de 100°C.
- b. Balanza para mg. (miligramos).
- c. Bandeja de lámina 30 x 30 cms.
- d. Papel metálico.
- e. Dos frascos de vidrio de color obscuro.
- f. Dos goteros.
- g. Una probeta graduada.
- h. Una espátula de laboratorio.
- i. Pinzas.
- j. Bisturís con su respectivo mango.

Reactivos:

- a. Ninhidrina
- b. Acetona

Procedimiento:

- a. Separar un pedazo del endospermo del grano
- b. Ponerle una gota de solución de Ninhidrina en acetona al 0.2 g. por ciento.
- c. Dejar evaporar la acetona a temperatura ambiente
- d. Calentar la muestra durante 5 minutos a 95 ó 100°C.

Durante el calentamiento se produce la reacción entre los aminoácidos libres del endospermo y la ninhidrina, de tal modo que aquellos granos que tienen mayor contenido de lisina y triptofano libre pueden ser identificados rápidamente por el color azul violeta.

- e. Lectura de las muestras de acuerdo a la intensidad de coloración.
- f. El resto del grano de donde se separó la muestra para la prueba, puede ser sembrado sin ningún problema ya que durante el corte de la muestra no se afecta el germen (25, 26).

3.5 Escala para lectura en la prueba rápida.

Debido a experiencias iniciales en el desarrollo en el que se utilizaron materiales normales criollos y Opaco-2, se optó por calificar de 1 a 5 según la intensidad de coloración que presenta la muestra sometida a prueba rápida para determinar aminoácidos libres, triptófano y lisina, la interpretación de la escala es la siguiente:

- 1. No se tiene reacción de coloración
- 2. Ligero cambio de coloración
- 3. Mediana coloración
- 4. Alta intensidad de coloración
- 5. Intensidad de coloración, se adquiere color azul violeta oscuro.

Para poder hacer la calificación cualitativa, es necesario disponer de un material criollo o normal y un Opaco-2 para poder utilizar como referencias de límite inferior y superior. La calificación de los puntos intermedios puede variar, ya que dependen de la habilidad o criterio del que analiza.

3.6 Separación de las muestras para análisis cuantitativo:

Para poder verificar los resultados de la prueba rápida se agruparon los granos que corresponden a cada calificación, 20 granos se les eliminó el embrión y el epicarpio, se identificó y se llevó a los laboratorios del INCAP, para su análisis cuantitativo.

3.7 Métodos utilizados para análisis cuantitativo en el INCAP.

Determinación del triptófano (34, 40, 41).

Utilizando el método de Opienska-Blauth modificado por Hernández y Bates:

a. Reactivos.

1. Se disuelven 270 mg. de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 0.5 ml. de agua destilada y se afiora a un litro con ácido acético glacial (reactivo A). En cada frasco de ácido acético se debe hacer la prueba de desarrollo de color en presencia del triptófano.

2. Solución de H_2SO_4 30N (Reactivo B).

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

4. Solución de Papaína (grado comercial). Disolver la enzima (4 mg/ml) en solución reguladora de acetato de sodio, 0.1N, pH = 7.0

La Solución de papaína debe ser preparada justo antes de usarse.

b. Procedimiento

1. Pesar entre 90 y 100 mg. de la muestra desengrasada y pulverizada en un tubo de ensayo y añadir 4 ml. de la solución de papaína. Se tapan los tubos y se agitan cuidadosamente procurando que la muestra quede totalmente mojada dentro de la solución (un tubo con únicamente solución de papaína es el blanco que se lleva durante todo el procedimiento).

2. Las muestras son incubadas a 65°C . durante la noche (16 horas).

3. Los hidrolizados se sacan de la estufa y se agitan, dejándolos enfriar a la temperatura ambiente, después de lo cual el sobrenadante debe estar claro. (Si el sobrenadante no está claro, se debe centrifugar).

4. Se pipetea un ml. de hidrolizado a un tubo de ensayo que contiene 4 ml. del reactivo C. se agita vigorosamente y se incuba a 65°C . durante 15 minutos para que desarrolle el color.

5. Dejar enfriar las soluciones coloreadas y transferirlas luego a tubos de colorímetro calibrados. Las lecturas se hacen en el fotocolorímetro Bausch & Lomb Spectronic 20 a una longitud de onda de 545 nm.

6. Se prepara una curva estándar con un rango de 0 a 40 ug/ml. de DL triptófano.

7. El contenido de triptófano de la muestra se calcula a partir de la curva estándar y se reporta en base a la proteína.

3.8 Determinación de la lisina.

Método desarrollado por Tsai, et al 1972 y modificado por Villegas (34, 40, 41).

a) Reactivos:

1. Solución de papaína (4 mg. de papaína por ml. de solución reguladora de fosfato 0.03 M con pH 7.4)

2. Solución reguladora de carbonatos de 0.05 M con pH 9.0

3. Solución reguladora de boratos 0.05 M. con pH 9.0

4. Suspensión de fosfato de cobre. Solución A): pesar 2.8 de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y disolverlos en 100 ml. de agua destilada. Solución B): pesar 13.6 g. de $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ y disolverlos en 200 ml. de agua destilada.

Mezclar A y B agitando, centrifugar a 2000 r.p.m. durante 5 minutos y descartar el sobrenadante. El precipitado se resuspende a 3 veces con 15 ml de solución reguladora de boratos, centrifugando cada suspensión. Después de la tercera lavada, el precipitado se resuspende en 80 ml de solución reguladora de boratos. Este reactivo puede ser usado solamente una semana.

5. Solución HCl, 1.2N

6. Solución de 2-cloro-3, 5 dinitropiridina. Preparar previamente a su uso una solución conteniendo 30 mg. de 2-cloro-3, 5 denitropiridina por ml de metanol.

7. Mezclas de aminoácidos.

Cristina	20 mg.	Fenilalanina	40 mg.
Metionina	20 mg.	Valina	40 mg.
Histidina	30 mg.	Arginina	50 mg.
Alanina	30 mg.	Serina	50 mg.
Isoleucina	30 mg.	Acido Aspártico	60 mg.
Treonina	30 mg.	Acido glutámico	300 mg.

Tirosina	30 mg.	Leucina	80 mg.
Glicina	40 mg.	Prolina	80 mg.

Pesar 100 mg. de la mezcla de aminoácidos y disolverlos en 10 ml de solución reguladora de carbonatos.

b) Procedimiento.

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

2. Incubar a 65°C. durante 16 horas. Agitar y enfriar a temperatura ambiente. Cuando las muestras estén frías, el sobrenadante debe de ser claro, o centrifugar si está turbio (una alícuota de 1 ml. de este hidrolizado puede usarse para la determinación de triptófano).

3. Pipetear una alícuota de 1 ml. en un tubo de centrifuga y añadir 0.5 ml. de solución reguladora de carbonato y 0.5 ml. de suspensión de fosfato de cobre.

4. Agitar durante 5 minutos y centrifugar a 2000 r.p.m.

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

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

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

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

9. Transferir la fase acuosa a tubos del colorímetro calibrados y leer en el fotocolorímetro "Spectronic 20" a una longitud de onda de 390 nm. contra el blanco.

10. Calcular el contenido de lisina de las muestras por comparación con la curva estándar y reportar en base a la proteína.

c) Curva Estándar

Preparar una curva estándar con un rango de 0 a 200 g. de lisina por ml. Solución reguladora de carbonatos (2500 g/ml.)

Preparar la curva con las siguientes concentraciones de lisina: 0, 250, 750 y 1000 ug/ml.

De cada una de estas soluciones, tomar 1 ml. y añadir 4 ml. de solución de papaína (5 mg. de papaína/ml. de solución reguladora de fósforo).

Pipetear 1 ml. de cada solución en un tubo de centrifuga, añadir 0.5 ml. de mezcla de aminoácido y 0.5 ml. de suspensión de fosfato de cobre.

Continuar el procedimiento a partir del inciso (4) de la parte B.

En promedio, el análisis de endospermo da valores colorimétricos de:

a) Maíz normal, alrededor de 0.45 g. de triptófano y 1.8 g. de lisina por 100 g. de proteína (con aproximadamente 9.0% de proteína en la muestra); y

b) Maíz Opaco-2, alrededor de 0.85 g. de triptófano y 3.6 g. de lisina en 100 g. de proteína (con aproximadamente 8.0% de proteína en la muestra).

Los valores indicados pueden variar debido a la genealogía de la muestra o debido al contenido de proteína en la muestra. Se pueden encontrar valores intermedios de triptófano y lisina en la proteína en materiales con el gene harinoso-2, o en algunas muestras con endospermo modificado.

3.9 Diseño Experimental.

Se usó el diseño experimental de Blocks al IRRESTRICTO AZAR.

De acuerdo al número de materiales en estudio fueron 15 tratamientos y en la escala se tiene 5 grados de calificación que para efecto de análisis estadístico es subtratamiento, fueron analizados los datos por separado para hacer las comparaciones.

3.10 Análisis estadístico.

Los efectos de los tratamientos seleccionados fueron evaluados a través de un análisis estadístico, sobre la variable variedades y grados de calificación %g. de triptófano y lisina/proteína; de acuerdo al siguiente esquema de varianza.

Fuente de variación	G.L.
Entre materiales (var.)	14
Dentro de materiales (var.)	30
Total.	44

Fuente de Variación	G.L.
Entre grados de calificación	4
Dentro de Grados de calificación	40
total.	44

3.11 Análisis de regresión.

Se hizo análisis de regresión para conocer la tendencia de los valores de los grados de calificación, % g. de triptófano y lisina en la proteína, se utilizaron los datos de 6 materiales individuales y el promedio general.

Análisis de Correlación.

Para conocer la validez de la prueba rápida se hizo un análisis de correlación con los datos % g. de triptófano y lisina en la proteína de 6 materiales además utilizando el promedio general de la población.

4. DISCUSION DE RESULTADOS

De éste estudio se obtuvieron los resultados que determinan que la prueba rápida utilizando Ninhidrina 0.2 g. por ciento y acetona para identificar lisina y triptofano en el endospermo de maíz, permite separar granos con diferente escala de calificación por intensidad de coloración (véase cuadros 5, 6, 7).

Se observó que entre los materiales evaluados se manifiestan diferencias en intensidad de coloración siendo mayores en granos con genotipo o_2/o_2 é inferiores en los materiales normales $+/+$, maíces criollos y los híbridos que se cultivan en el país (cuadro 5).

Existe relación entre los valores de triptófano y lisina con la intensidad de color en los génotipos, pero difiere entre materiales es decir los grados de variación de coloración observada dentro de genotipos o_2/o_2 y normales. Los valores de lisina y triptofano con baja intensidad de color identifican los genotipos normales, estos fueron inferiores a los obtenidos con los de mayor coloración corresponden a los maíces con Opaco-2.

Los resultados indican que la prueba rápida, utilizando ninhidrina y acetona permite separar fácilmente granos con mayor contenido de lisina y triptófano, según la intensidad de coloración en granos que tengan presencia de modificación harinoso. Los maíces normales mostraron poca o ninguna reacción a la Ninhidrina permitiendo tomarlos como referencia, para determinar bajo contenido de aminoácidos libres en el endospermo; en los granos provenientes de poblaciones en los que se incorporó Opaco-2, se encontraron diferentes intensidades de coloración en la parte harinoso del endospermo.

Las variedades normales é híbridos sin gen Opaco-2, al efectuar la prueba rápida con ninhidrina y acetona, se comportaron semejantes en presentar una coloración pálida como se esperaba; la baja cantidad de aminoácidos libres en el endospermo fué la causa de que no se observara cambios de coloración.

Las muestras fueron separadas en 5 grupos de acuerdo a la escala cualitativa de intensidad de coloración, se efectuaron análisis cuantitativos al endospermo de estos granos para determinar triptofano y lisina y proteína total; los valores de los dos aminoácidos indican que la intensidad de coloración puede ser utilizada como índice de contenido de aminoácidos libres y como consecuencia lisina y triptófano (véase cuadros 6 y 7).

Las variedades quetzal Oro amarillo y Blanco que tienen incorporado el gen Opaco-2, demuestran que no se puede generalizar el criterio de relacionar los grados de intensidad de coloración en la prueba rápida y considerar el contenido de triptófano y lisina de acuerdo a la agrupación según la calificación cualitativa de los materiales. (véase cuadros 6, 7). Esto demuestra que no se puede indicar con certeza los puntos intermedios debido a la variabilidad existente entre las poblaciones en mejoramiento con Opaco-2.

En la comprobación de los resultados de la prueba rápida mediante análisis químico cuantitativo para determinar los contenidos de triptófano y lisina en la proteína del endospermo, la intensidad de color estuvieron asociados a valores de bajo y alto contenido, sin em-

bargo la clasificación hecha, separando cinco grados de intensidad de coloración dentro de los mismos materiales en los puntos intermedios no se pudo demostrar ninguna asociación (cuadros: 5, 6, 7). Los resultados indican que los granos no coloreados corresponden efectivamente a maíces normales ya que el contenido de triptófano fué de 0.29 y 0.49% y de lisina 1.41 y 1.79 por ciento. (véase cuadros: 5, 6, 7, 8, 9).

En los granos con endospermo modificado no se observó reacción de coloración en la porción vitrea, en la porción harinosa si se logró identificar la presencia de aminoácidos libres en los genotipos Opaco-2, esta característica facilita la identificación de familias en poblaciones con o_2/o_2 de granos con fenotipo harinoso y modificados.

En el análisis de varianza de los datos de contenido de triptófano y lisina se determinó que existen diferencias significativas entre intensidad de coloración (véase cuadros: 10, 13).

En la comparación múltiple de medias se determinó diferencias entre los valores de lectura baja y alta intensidad de coloración para triptófano y lisina no habiéndolas entre puntos medios (cuadros: 11, 14).

La comprobación de la prueba rápida confirma para las muestras de baja y alta intensidad de color, el contenido de triptófano en la proteína se determinó valores de 0.36 y 0.81 g. por 100 g. de proteína (véase cuadros: 5, 6 y 9).

Los valores en porcentaje de lisina en la proteína del endospermo determinó valores promedio de 1.31 g. en las muestras que tuvieron lecturas de menor intensidad, siendo los valores de 2.86 g. por 100 g. de proteína las de mayor coloración. Se determinó entonces, diferencias entre grados de intensidad de coloración para lisina (véase cuadro 13).

Se efectuaron análisis de regresión con los datos promedio de triptófano y lisina, los valores están dispersos y no siguen una tendencia definida (véase gráficas 1 y Nos. 2, 3, 4, 5, 6, 7).

El análisis de correlación con los valores de triptófano y lisina determinó que no existe un valor de correlación significativo entre el contenido y la intensidad de coloración, los puntos intermedios de una escala de intensidad de coloración no indica aumento gradual del contenido de triptófano y lisina en el material en estudio (gráficas: 1, 2, 3,14).

Cuadro No. 5

Resultados en grados de intensidad de color y % de Triptófano, Lisina y Proteína.

No.	Materiales	Color	Porcentaje		Proteína	
			Triptófano	Lisina	N ₂	Proteína
1	Quetzal Oro Amarillo	1	0.43	2.24	1.355	8.5
		2	0.63	2.68	1.385	8.7
		3	0.56	2.14	1.188	7.4
		4	0.69	3.23	1.580	10.0
		5	0.70	2.86	1.435	9.0
2	Quetzal Oro Blanco	1	0.43	1.82	1.201	7.5
		2	0.50	1.97	1.112	7.0
		3	0.53	1.75	1.158	7.2
		4	0.54	2.03	1.234	7.7
		5	0.68	1.97	1.174	7.3
3	O ₂ E.D.A. Chimaltgo. 76	1	0.54	1.76	1.403	8.8
		2	0.59	2.11	1.448	9.0
		3	0.62	2.28	1.355	8.5
		4	0.74	2.86	1.370	8.6
		5	0.87	2.17	1.303	8.1
4	O ₂ ### 71-13	1	0.44	1.59	1.250	7.8
		2	0.42	1.65	1.102	7.0
		3	0.74	3.02	1.142	9.0
		4	0.72	2.31	1.218	7.6
		5	0.84	3.04	1.331	8.3
5	Sintético 1 x O ₂	1	0.48	1.95	1.557	9.7
		2	0.46	1.61	1.349	8.4
		3	0.62	2.15	1.410	8.8
		4	0.63	2.37	2.010	12.6
		5	0.78	1.98	1.337	8.4
6	Guatelan Xela x O ₂	1	0.42	1.62	1.235	7.7
		2	0.50	2.70	1.861	11.6
		3	0.44	1.65	1.125	7.0
		4	0.51	1.49	1.093	6.8
		5	0.74	2.22	1.232	7.7
7	San Marceño x O ₂	1	0.45	1.82	1.271	7.9
		2	0.60	1.91	1.428	8.9
		3	0.48	1.94	1.301	8.1
		4	0.75	3.19	1.698	10.6
		5	1.06	4.14	1.500	9.4

No.	Materiales	Color	Triptófano	Lisina	N ₂	Proteína
8	0 ₂ ### - 9	4	0.74	2.86	1.347	8.4
		5	0.87	2.87	1.466	9.2
9	Criollo Amarillo	1	0.42	1.41	1.554	9.7
10	Sintético de 6 líneas	1	0.38	1.68	1.709	10.7
11	San Marceño	1	0.49	1.51	1.204	7.5
12	Compuesto Blanco	1	0.39	1.66	0.901	8.1
13	X-304 A	1	0.29	1.43	1.451	9.1
		2	0.44	1.20	1.326	8.3
14	X-306 B	1	0.39	1.79	1.431	8.9
15	Barcena 71	1	0.42	1.64	1.350	8.4

Cuadro No. 6 RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRUEBA RAPIDA SEGUN INTENSIDAD DE COLOR Y % DE TRIPTOFANO EN LA PROTEINA DEL ENDOSPERMO.

No.	Material	Textura	Color	Genotipo	Intensidad de coloración según escala en la prueba rápida y % de Triptófano.				
					1	2	3	4	5
1	Quetzal Oro Amarillo	V	A	0 ₂ /0 ₂	0.43	0.63	0.56	0.69	0.70
2	Quetzal Oro Blanco	V	B	0 ₂ /0 ₂	0.43	0.50	0.53	0.54	0.68
3	0 ₂ E.D.A. Chimaltenango 76	V	A	0 ₂ /0 ₂	0.54	0.59	0.62	0.74	0.87
4	0 ₂ ### 71-13	H	A	0 ₂ /0 ₂	0.44	0.42	0.74	0.72	0.84
5	Sint. 1 x 0 ₂	V	A	0 ₂ /0 ₂	0.48	0.46	0.62	0.63	0.78
6	Guatelan Xela x 0 ₂	V	A	0 ₂ /0 ₂	0.42	0.50	0.44	0.51	0.74
7	San Marceño x 0 ₂	V	A	0 ₂ /0 ₂	0.45	0.60	0.48	0.75	1.06
8	0 ₂ ### - 9	H	A	0 ₂ /0 ₂	--	--	--	0.74	0.87
9	Criollo Amarillo	V	A	+ / +	0.42	--	--	--	--
10	Sintético de 6 líneas	V	A	+ / +	0.38	--	--	--	--
11	San Marceño	V	A	+ / +	0.49	--	--	--	--
12	Compuesto Blanco	V	B	+ / +	0.39	--	--	--	--
13	X - 304 A	V	A	+ / +	0.29	0.44	--	--	--
14	X - 306 B	V	A	+ / +	0.39	--	--	--	--
15	Bárcena 71	V	A	+ / +	0.42	--	--	--	--

V = Endospermo Vitreo

H = Endospermo Harinoso

A = Amarillo

B = Blanco

Cuadro No. 7 RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRUEBA RAPIDA SEGUN INTENSIDAD DE COLOR Y % DE LISINA EN LA PROTEINA DEL ENDOSPERMO .

No.	Material	Textura	Color	Genotipo	Intensidad de coloración según escala en la prueba rápida y % de lisina				
					1	2	3	4	5
1	Quetzal Oro Amarillo	V	A	0 ₂ /0 ₂	2.24	2.68	2.14	3.23	2.86
2	Quetzal Oro Blanco	V	B	0 ₂ /0 ₂	1.82	1.97	1.75	2.03	1.97
3	0 ₂ E.D.A. Chimaltenango 76	V	A	0 ₂ /0 ₂	1.76	2.11	2.28	2.86	2.17
4	0 ₂ ### 71-13	H	A	0 ₂ /0 ₂	1.59	1.65	3.02	2.31	3.04
5	Sint. 1 x 0 ₂	V	A	0 ₂ /0 ₂	1.95	1.61	2.15	2.37	1.98
6	Guatelan Xela x 0 ₂	V	A	0 ₂ /0 ₂	1.62	2.70	1.65	1.49	2.22
7	San Marceño x 0 ₂	V	A	0 ₂ /0 ₂	1.82	1.91	1.94	3.19	4.14
8	0 ₂ ### - 9	H	A	0 ₂ /0 ₂	--	--	--	2.86	2.87
9	Criollo Amarillo	V	A	+ / +	1.41	--	--	--	--
10	Sintético de 6 líneas	V	A	+ / +	1.68	--	--	--	--
11	San Marceño	V	A	+ / +	1.51	--	--	--	--
12	Compuesto Blanco	V	B	+ / +	1.66	--	--	--	--
13	X - 304 A	V	A	+ / +	1.43	1.20	--	--	--
14	X - 306 B	V	A	+ / +	1.79	--	--	--	--
15	Bárcena 71	V	A	+ / +	1.64	--	--	--	--

V = Endospermo Vítreo

A = Amarillo

H = Endospermo harinoso

B = Blanco

Cuadro No. 8

Análisis de Varianza de los datos de g de Triptófano por 100 g de proteína en 15 variedades de maíz

Fuente de variación	Gl	S.C.	C M	F	F tab.
Entre variedades	14	0.126	0.009	3.6 --	2.74
Dentro de variedades	30	0.074	0.0025		
Total	44	0.200			

C.V. - 8.66

- - - significativo al 1%

Cuadro No. 9

Contenido promedio g de Triptófano por 100 g de proteína

Rango	Variedad	g de Triptófano por 100 g de proteína
1	O ₂ ### - 9	0.81
2	O ₂ E.D.A. Chimaltenango 76	0.67
3	San Marceño x O ₂	0.67
4	O ₂ ### 71-13	0.63
5	Quetzal Oro Amarillo	0.60
6	Sint. I x O ₂	0.59
7	Quetzal Oro Blanco	0.54
8	Guatelan Xela x O ₂	0.52
9	San Marceño	0.49
10	Criollo Amarillo	0.42
11	Bárcena 71	0.42
12	Compuesto Blanco	0.39
13	X - 306 B	0.39
14	Sintético de 6 líneas	0.38
15	X - 304 A	0.36

Cuadro No. 10

Análisis de Varianza de los datos de 5 grados de intensidad de coloración para determinar Triptófano.

Fuente de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	F	F Tab.
Entre grados de calific.	4	0.165	0.041	47.1	3.83 --
Dentro de calificación	40	0.035	0.0087		
Total:	44	0.020			

-- Significativo al 1%

C.V - 5.0 %

Cuadro No. 11

Promedio de los grados de intensidad de coloración

Rango	Calificación de intensidad	% g de Triptófano promedio.
1	5 E	0.82
2	4 D	0.66
3	3 C	0.57
4	2 B	0.52
5	1 A	0.43

Cuadro No. 12

Análisis de Varianza de los datos de g de Lisina por 100 g de proteína en 15 variedades de maíz.

Fuente de Variación	G L	S. C.	C. M.	F	F Tab.
Entre variedades	14	7.15	0.51	2.74	Ns
Dentro de variedades	30	8.675	0.29		
Total:	44	15.825			

Ns = No significativo

C.V = 14.66 %

Cuadro No. 13

Análisis de varianza de los datos de 5 grados de intensidad de coloración para determinar Lisina.

Fuente de variación	G.L	S.C.	C.M.	F	F Tab.
Entre grados de calific.	4	5.82	1.46	5.84 **	3.83
Dentro de calificación	40	9.97	0.25		
Total:	44	15.79			

** = Significativo al 1%

C.V.= 13.61 %

Cuadro No. 14

Promedio de los grados de intensidad de coloración para determinar Lisina.

Rango	Calificación de intensidad	% g de Lisina Promedio
1	5 E	2.66
2	4 D	2.47
3	3 C	2.09
4	2 B	1.98
5	1 A	1.71

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Este estudio permite sugerir las siguientes conclusiones y recomendaciones que pueden servir para futuras investigaciones en el mejoramiento de la calidad de proteína del maíz.

a) Hipótesis I

- 1.- El método de ninhidrina y acetona es efectivo para seleccionar granos individuales de maíz, con superior calidad de proteína y para separar genotipos Opacos y normales - sean estos harinosos o vitreos modificados; la prueba rápida identifica a los genotipos O_2/O_2 harinosos o modificados de los granos de aspecto normales.
- 2.- La prueba rápida con ninhidrina y acetona, utiliza un pedazo del endospermo no destruyendo el grano, facilitando la identificación de granos individuales de calidad de proteína superior, pudiéndose sembrar posteriormente para continuar los trabajos de fitomejoramiento.
- 3.- Es práctico y económico para los propósitos iniciales de un programa de mejoramiento proteico de maíz, permite un volumen grande de análisis.
- 4.- No requiere personal especializado.

b) Hipótesis II

- 1.- Se determinó un gradiente en la intensidad de coloración dentro de las poblaciones Opaco-2, sin embargo no se estableció asociación con el contenido de triptófano y lisina en los grados intermedios por lo que es aplicable solamente para identificar valores bajos y superiores de calidad de proteína.
- 2.- La porción harinosa de los fenotipos modificados permite la selección en población de fenotipo modificado O_2/O_2 mediante la prueba rápida.
- 3.- El endospermo vitreo no reacciona con la ninhidrina, obstaculiza la reacción y no se tiene cambio de coloración esto confirma los resultados obtenidos en el estudio efectuado por B. Vásquez, et al 1974 (39).
- 4.- Los valores de triptófano y lisina encontrados al realizar análisis cuantitativos de los materiales en estudio, demostraron que existe variabilidad de estos valores dependiendo del origen del material por lo que su comportamiento no fue semejante.
- 5.- Se requiere siempre para determinaciones precisas de los análisis complejos de aminoácidos para materiales avanzados.

RECOMENDACIONES

- 1.- Se recomienda la utilización de este método a los fitomejoradores de maíz, interesados en el mejoramiento protéico, por las siguientes razones:
 - a) Pueden analizarse 2,000 granos (fenotipos) diariamente.
 - b) Identifica los genotipos O_2/O_2 harinoso o modificados de los normales
 - c) Es práctico y económico, es de utilidad en el tamizado de gran cantidad de material en los primeros ciclos de un programa de mejoramiento protéico.
- 2.- Esta metodología no reemplaza los análisis avanzados cuantitativos.
- 3.- Se recomienda hacer estudios para proteger los granos seleccionados para evitar que al hacerlos germinar sean invadidos por enfermedades fungosas, sobre todo en los granos vitreos debido a que se requiere llegar a la parte harinosa del grano del germen para que la prueba sea efectiva.

BIBLIOGRAFIA

1. ANDERSEN, PER PINSTRUP. La factibilidad de introducir Maíz Opaco-2 para el consumo humano en Colombia. Colombia CIAT, 1971, 47 p.
2. BARRIOS, A. Mejoramiento nutricional del maíz en el altiplano de Guatemala. Guatemala, Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas, ICTA. 1975. 9 p.
3. BAUMAN, L. F. Variabilidad del germen y el endosperma, elementos minerales, contenido de aceite y genes modificadores en el Maíz Opaco-2. Maíz de alta calidad proteínica. Compendio de las ponencias presentadas en el Simposio Internacional - CIMMYT - Purdue. El Batán, México, CIMMYT, 1977, pp 233-244.
4. ----- y otros. Progress in developing maize with improved protein quality. Lafayette, Indiana. Purdue University Agricultural Experiment Station West, 1974. 10 p. Research Bulletin 914
5. BRESSANI, R. La importancia del maíz en la nutrición humana en América Latina y otros países. En: Mejoramiento Nutricional del Maíz. Memorias de una Conferencia de Nivel Internacional Celebrada en el Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá. INCAP. Ciudad de Guatemala del 6 al 8 de marzo de 1972. Guatemala, Talleres Gráficos del INCAP, 1972 pp 5-30.
6. -----, J. ALVARADO y J. VITERI. Evaluación en niños de la calidad de proteína del Maíz Opaco-2. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, No. 19; 129-140. 1969.
7. ----- . La calidad protéica del maíz con Gene Opaco-2. Separado de Turrialba. No. 18:8-13. 1968.
8. -----, L. G. ELIAS, y R. GOMEZ B. Protein quality of Opaque -2 Corn Evaluation in rats. Nutrition No. 97:17-3-180. 1969.
9. CENTRO INTERNACIONAL DE MEJORAMIENTO DE MAIZ Y TRIGO. Mejoramiento de maíz y trigo. Informe Anual, El Batán, México, CIMMYT, 1972.
10. ----- . Mejoramiento de maíz. CIMMYT: 1974, Informe sobre el programa de mejoramiento de maíz del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. El Batán, México, 1975. 85 p.
11. ----- . El CIMMYT. Hoy maíz de alta calidad proteínica. El Batán, México, CIMMYT, 1975. 15 p.

12. ----- . Mejoramiento proteínico, mejoramiento de maíz. (Revisión de Programas) 10o. Aniversario 1966-76. El Batán, México, CIMMYT, 1978. pp 23-25.
13. ----- . Informe Anual Mejoramiento de Maíz. CIMMYT. El Batán, México, 1971. 54 p.
14. ----- . Central Research Program Protein improvement. Report 1969-70. El Batán, México, CIMMYT, 1970. 51 p.
15. ----- . Calidad de Proteína. Informe CIMMYT. Sobre avances hacia el aumento de maíz y trigo. 1967-68. El Batán, México, CIMMYT, 1969. 58 p.
16. ----- . Protein Quality Report. 1966-67, CIMMYT. El Batán, México. 1967. 53 p.
17. ----- . Estudios para modificar la apariencia de los granos de Opaco-2. Noticiero del CIMMYT. México No. 5:5-8 Mayo-Septiembre. 1970.
18. ----- . Avances en la formación de maíces ricos en proteína. Noticiero del CIMMYT. No. 4:5-6. Mayo-Junio 1969.
19. ----- . La importancia de mejorar el nivel de Lisina. Noticiero del CIMMYT. No. 4:7-8. Julio-Agosto. 1969.
20. FUENTES, A. y C. PEREZ. Situación actual de los trabajos sobre Opaco-2 en Guatemala. XVI Reunión Anual de PCCMCA. Guatemala. Dirección General de Investigación y Extensión Agrícola, 1971. 11 p.
21. ----- . y otros. Trabajos sobre Maíz Opaco-2 en Guatemala. Guatemala, Dirección de Investigación Agrícola, Proyecto de Maíz y Sorgo. 1972. 10 p.
22. GOLDSWORTHY, P.R. Algunas características de crecimiento y rendimiento de l - maíz tropical. Maíz de alta calidad proteínica. Compendio de las ponencias presentadas en el Simposio Internacional CIMMYT-Purdue. El Batán, México, CIMMYT, 1977. pp 179-191.
23. GOMEZ, B.R., y R. BRESSANI. Un método para la determinación de aminoácidos aplicable a problemas de suplementación, fitomejoramiento y bioquímica nutricional. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, Vol. XXIII (4): 446-468. 1973.
24. ----- ., y R. BRESSANI. Relaciones entre algunas características físicas, químicas y nutricionales de maíces latinoamericanos normales y con el gene Opaco-2 y Harinoso-2. Separado de Turrialba. Vol. 23(4): 462-470. 1973.

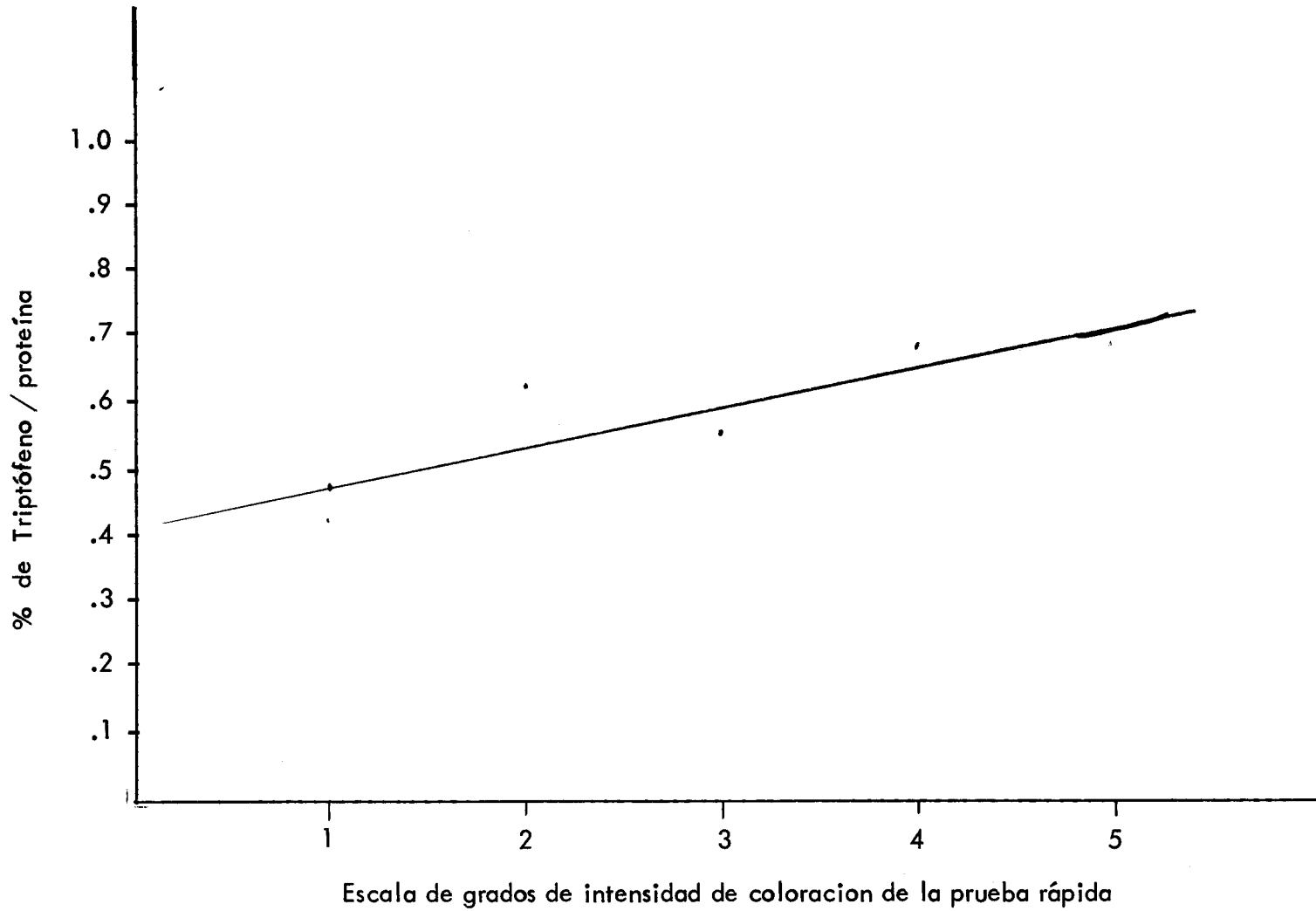
25. ----- . y otros. Método rápido para la identificación de granos de cereales con alto contenido de Lisina. Informe Anual División de Ciencias Agrícolas y de Alimentos del INCAP. Guatemala, INCAP, 1974. 50 p.
26. ----- . Método de campo para la identificación de granos de maíz con alto contenido de Lisina. XXI Reunión Anual del PCCMCA. Del 7 al 11 de Abril de 1975. San Salvador, El Salvador, V. 2.
27. HARPSTEAD, D.D. System for the incorporation of the high lysine EFFECTS INTO FLINT-LIKE MAIZE SEED STOCKS. Copia del resumen de conferencia. - Guatemala, ICTA. 1974. 7 p.
28. HERNANDEZ, H. and L.S. BATES. Modified method for rapid tryptophan analysis - of maize. México, CIMMYT. Research Bulletin No. 13 14 p.
29. MERCK. Ninhidrina para análisis. Guatemala, Departamento de Productos Químicos Merck Centroamericana. 1974. 5 p. (Folleto Técnico).
30. MERTZ, E.T. y otros. Uso de animales pequeños para la evaluación de la calidad proteínica de los cereales. Maíz de calidad proteínica. Compendio de las ponencias presentadas en el Simposio Internacional CIMMYT-Purdue. El Batán, México, CIMMYT, 1977. pp 305-314.
31. ----- . Rapid Ninhydrine color test for screening high lysine mutants of maize, sorghum, barley and other cereal grains. Cereal Chemistry: No. 51:304-307 1973.
32. MIRANDA, O.J. Estrategia de la investigación en el cultivo del maíz en el Bajío. Incorporación del gen Opaco-2 en poblaciones de maíz. Resumen de conferencia. México. Celaya, México, Centro de Investigación de Agricultura del Bajío (CIAB), 1977. 5 p.
33. MIRRA, P.S., E.T. MERTZ y D.V. GLOVER. Características de las proteínas que se encuentran en los mutantes endospermicos sencillos y dobles del maíz. Maíz de alta calidad proteínica. Compendio de las ponencias presentadas en el Simposio Internacional. CIMMYT-Purdue. El Batán, México, CIMMYT. 1977. pp 315-330.
34. POEY, F.R. El mejoramiento integral del maíz - rendimiento y valor nutritivo. Hipótesis y métodos. Chapingo, México. Colegio de Postgraduados: Escuela Nacional de Agricultura. Tesis (Doctor en Ciencias Agrícolas) 1975. 215 p.
35. ----- . Situación del Maíz Opaco-2 en América Latina. En: Mejoramiento Nutricional del Maíz. Memorias de una Conferencia de Nivel Internacional celebrada en el INCAP. Ciudad de Guatemala, del 6-8 de marzo de 1972. Guatemala, INCAP. 1972 pp 36-45.

36. ----- . Mejoramiento del valor nutritivo de la proteína en el grano de maíz; algunas bases para el fitomejoramiento. México, Poey Hibrids, 1972. 19 p.
37. ----- . Desarrollo y utilización del maíz con los genes Opaco-2 y Harinoso-2. En: Recursos Proteínicos en América Latina. Memorias de una Conferencia de Nivel Latinoamericano celebrada en el INCAP. Ciudad de Guatemala, 24-27 de febrero de 1970. Guatemala, INCAP, 1971. pp 259-267.
38. VASAL, S.K. Calidad nutritiva del maíz. El fitomejoramiento del maíz a nivel mundial en la década del setenta y el papel del CIMMYT, Memorias. El Batán, México. Abril 22-26, 1974. 10(1): 10-31.
39. VASQUEZ, B. y otros. Evaluación del método de Ninhidrina de Mertz para seleccionar calidad de proteína en granos individuales de maíz. Departamento de Cereales del INIA. México, 1974, 6 p. (Hojas mimeografiadas).
40. VILLEGAS, E. El sistema para selección química del maíz de alta calidad proteínica. Maíz de alta calidad proteínica. Compendio de las Ponencias presentadas en el Simposio Internacional. CIMMYT-Purdue. El Batán, México, CIMMYT, 1977. pp 357-364.
41. VILLEGAS, E., y E.T. MERTZ. Chemical screening methods for maize protein quality at CIMMYT, México, Research Bulletin No. 20 1971. 14 p.
42. WALL, J. O., y J. W. P. Evaluación química y biológica de la calidad proteínica del maíz: Asuntos y problemas actuales. Maíz de alta calidad proteínica. Compendio de las ponencias presentadas en el Simposio Internacional - CIMMYT-Purdue. El Batán, México, CIMMYT, 1977. pp 305-314.

Gráfica 10 Variedad Quetzal Oro Amarillo

$$Y = .06 x + 0.422$$

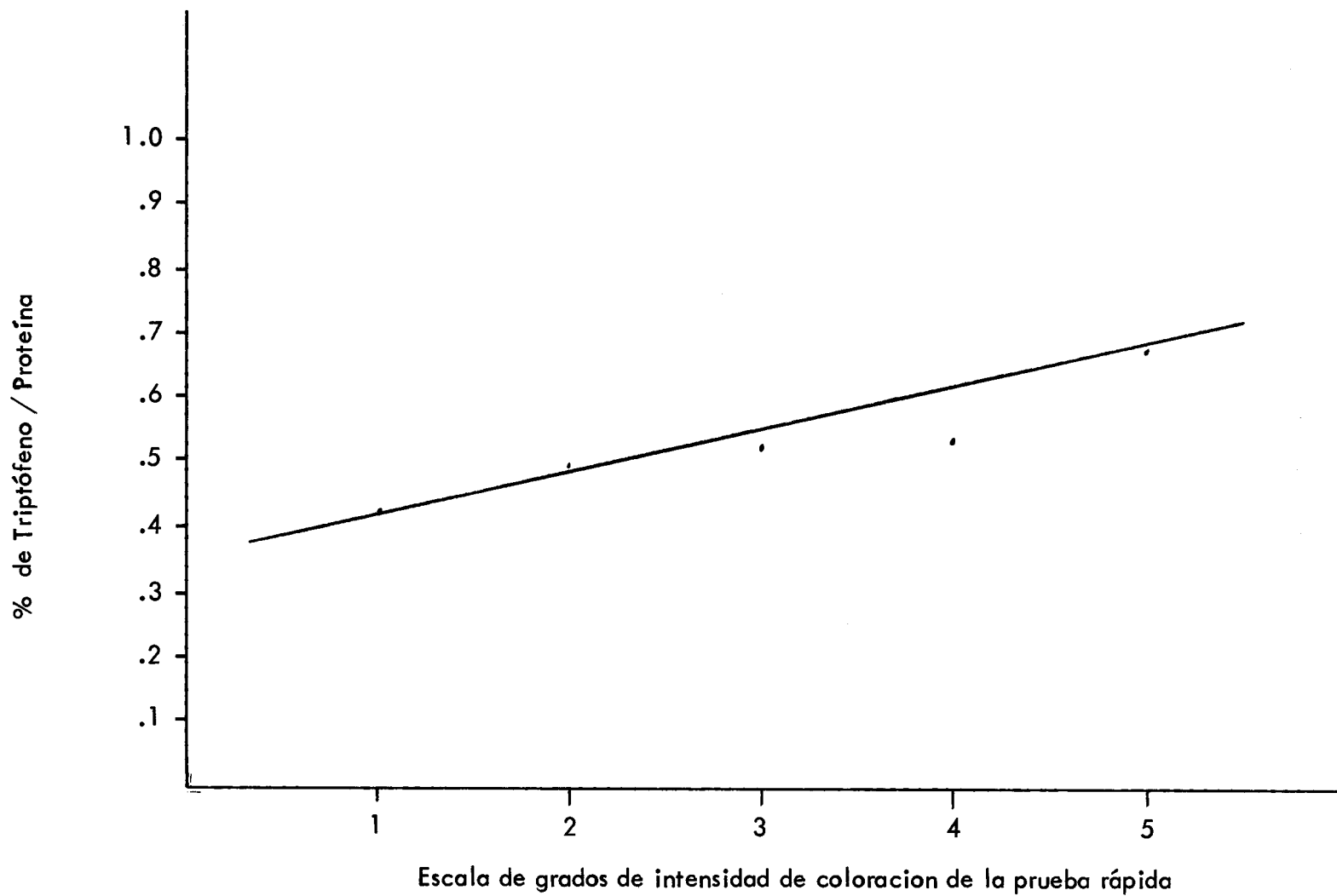
$$r = 0.853$$



Gráfica 2 Variedad Quetzal Oro Blanco

$$Y = 0.054 x + 0.374$$

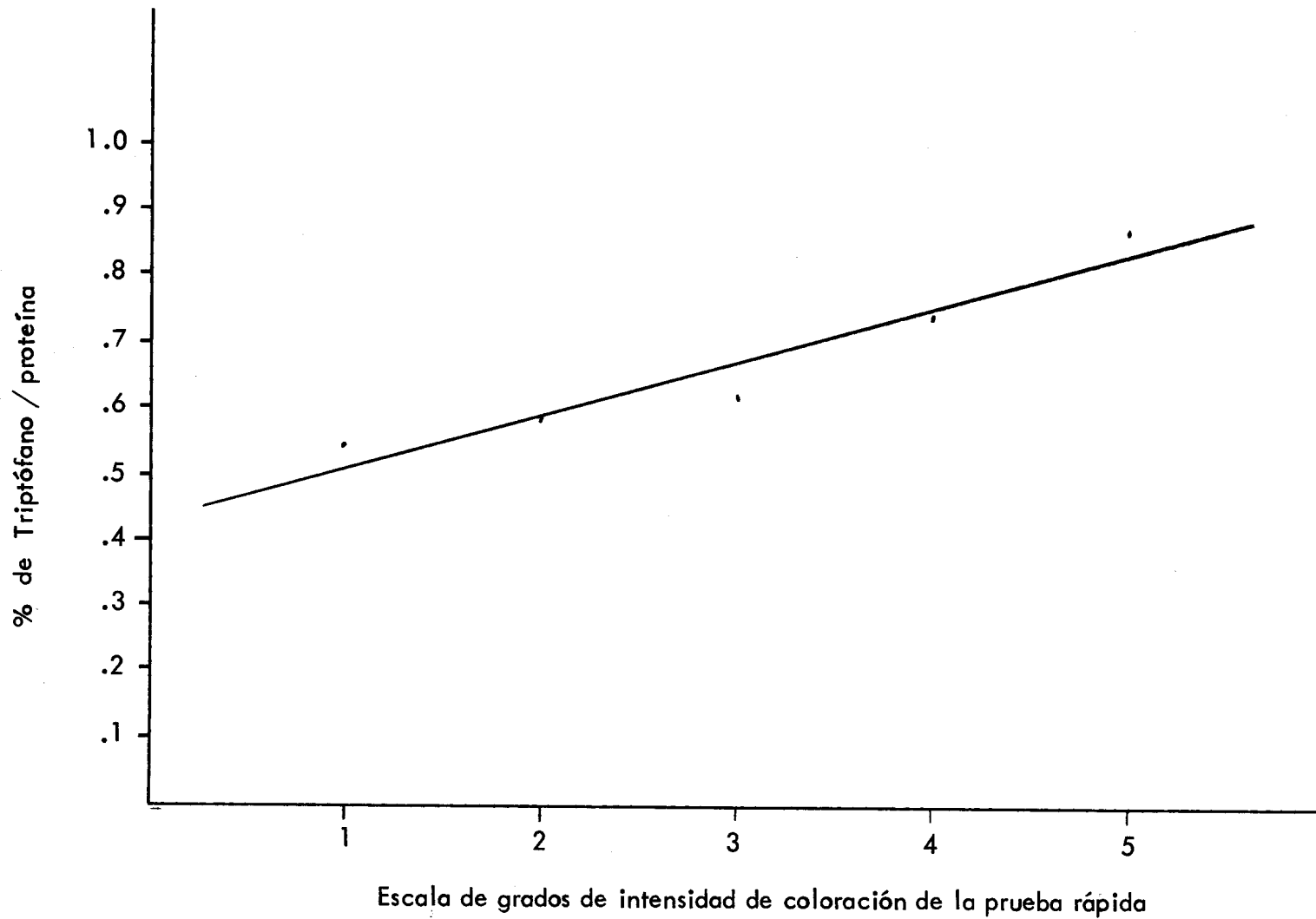
$$r = 0.935$$



Gráfica 3 Variedad 0₂ E.D.A. Chimaltenango 76

$$Y = 0.081 x + 0.429$$

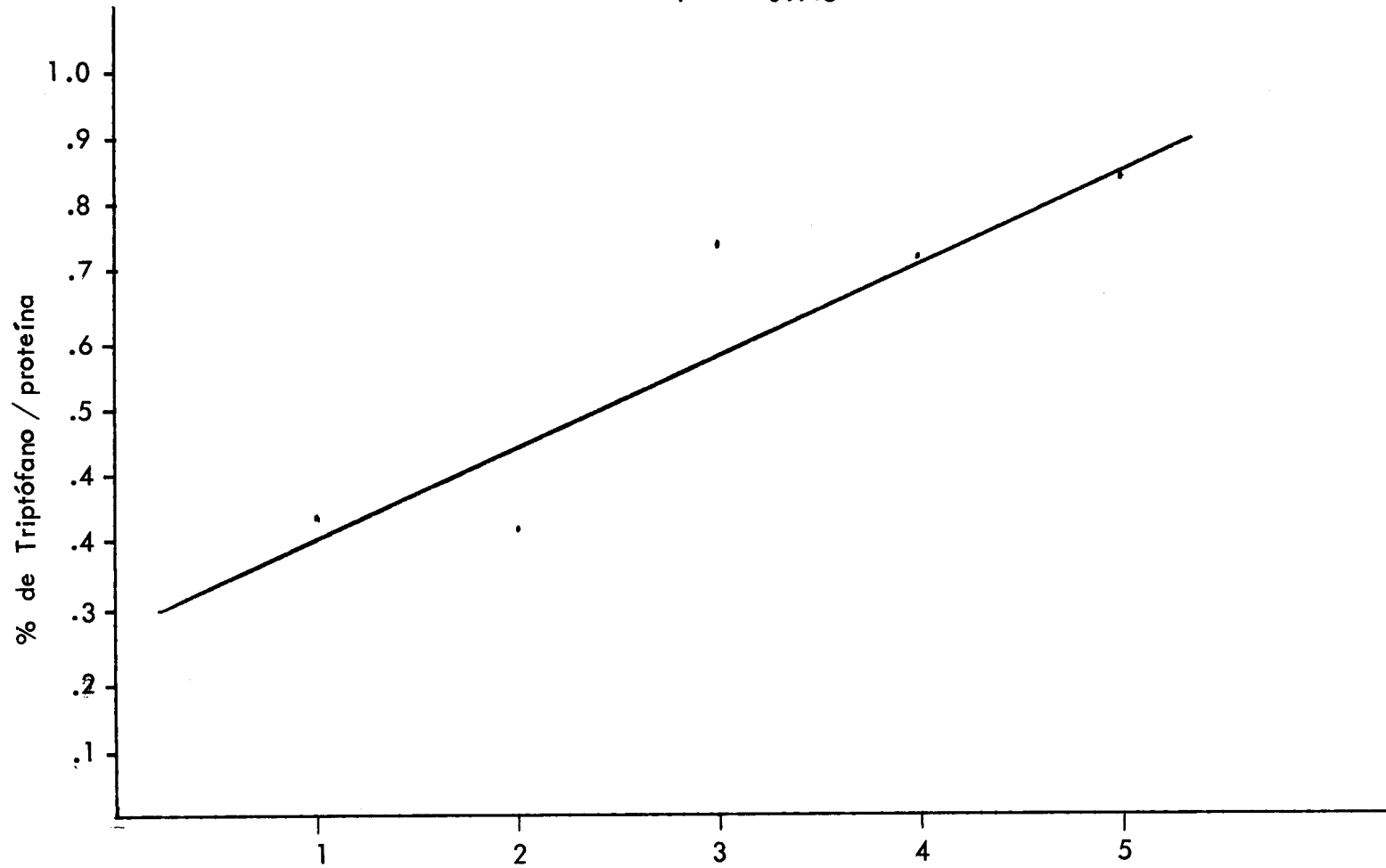
$$r = 0.963$$



Gráfica 4 Variedad O₂ ### 71-13

$$Y = 0.11 x + 0.302$$

$$r = 0.915$$

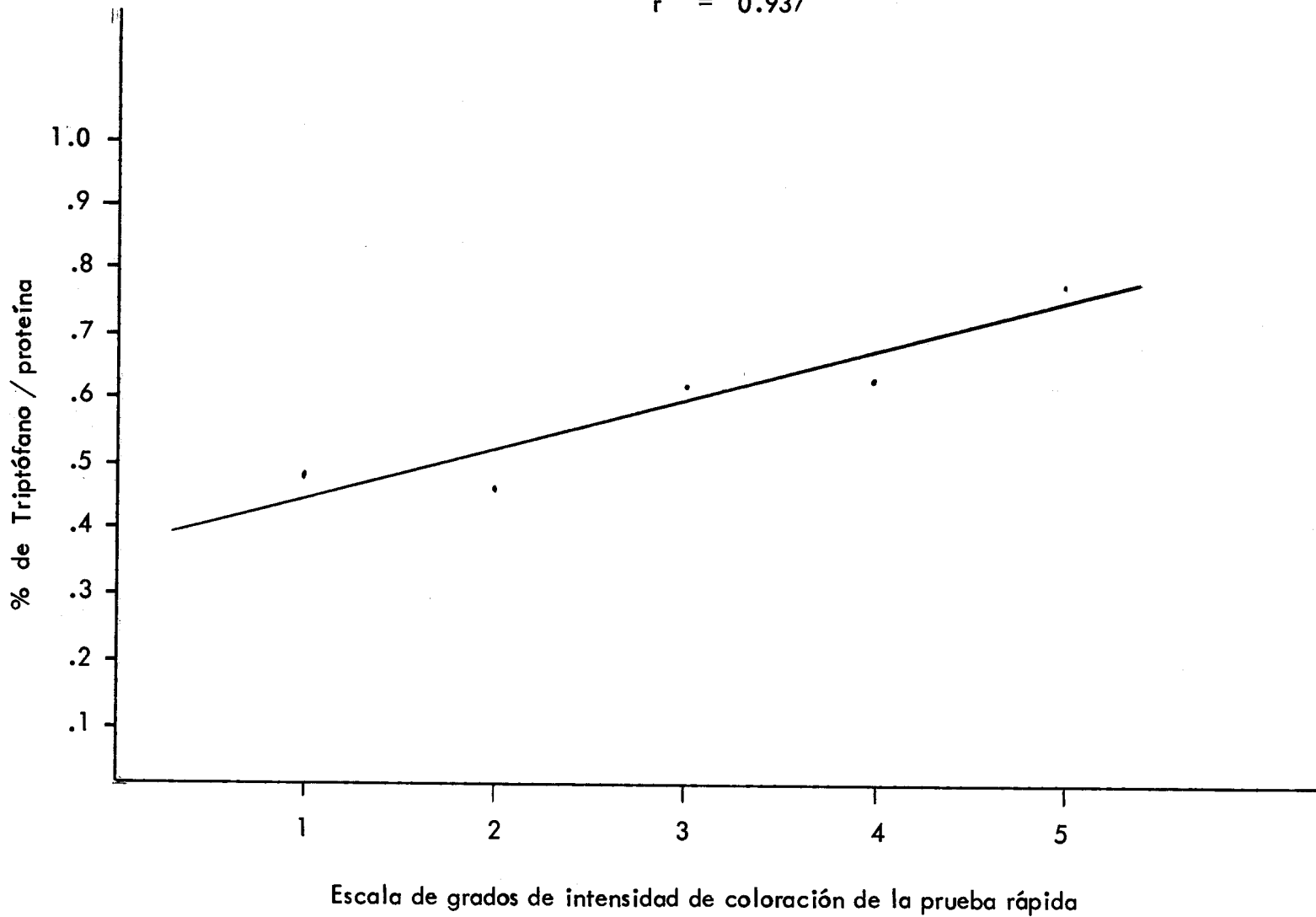


Escala de grados de intensidad de coloración de la prueba rápida

Gráfica 5 Variedad Sintético 1 x O₂

$$Y = 0.077 x + 0.363$$

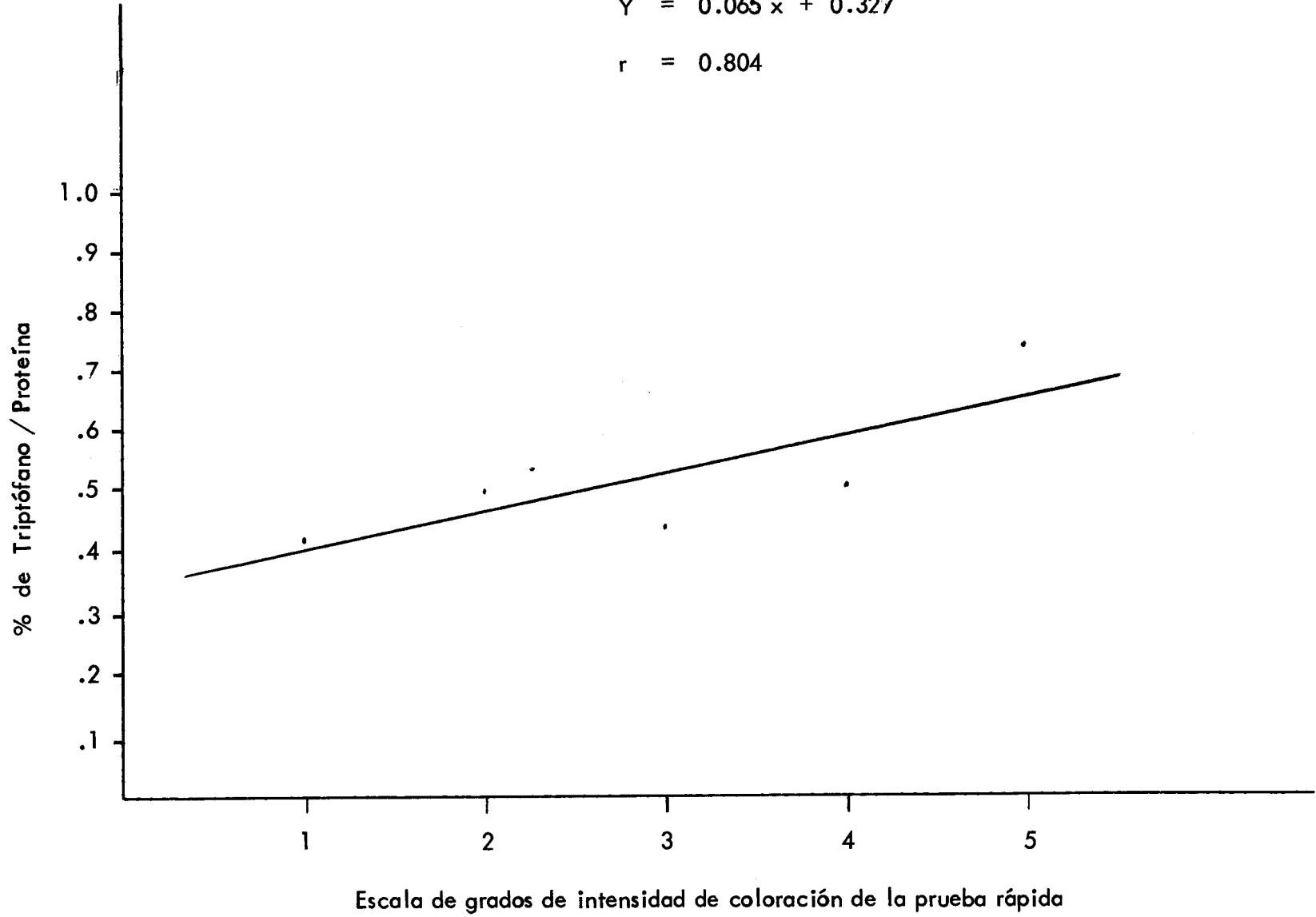
$$r = 0.937$$



Gráfica 6 Variedad Guatelan Xela x O₂

$$Y = 0.065 x + 0.327$$

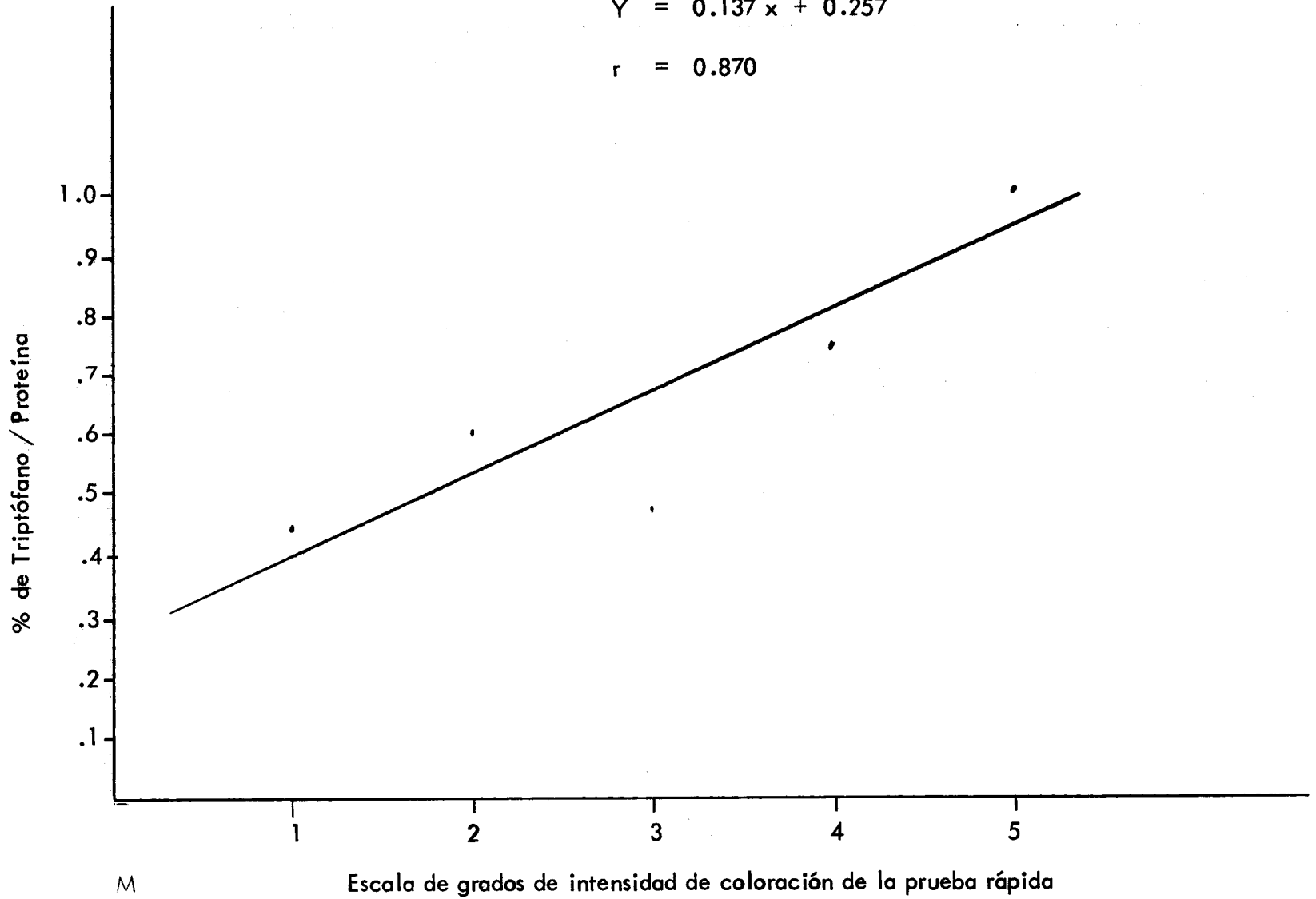
$$r = 0.804$$



Gráfica 7 Variedad San Marceño x O₂

$$Y = 0.137 x + 0.257$$

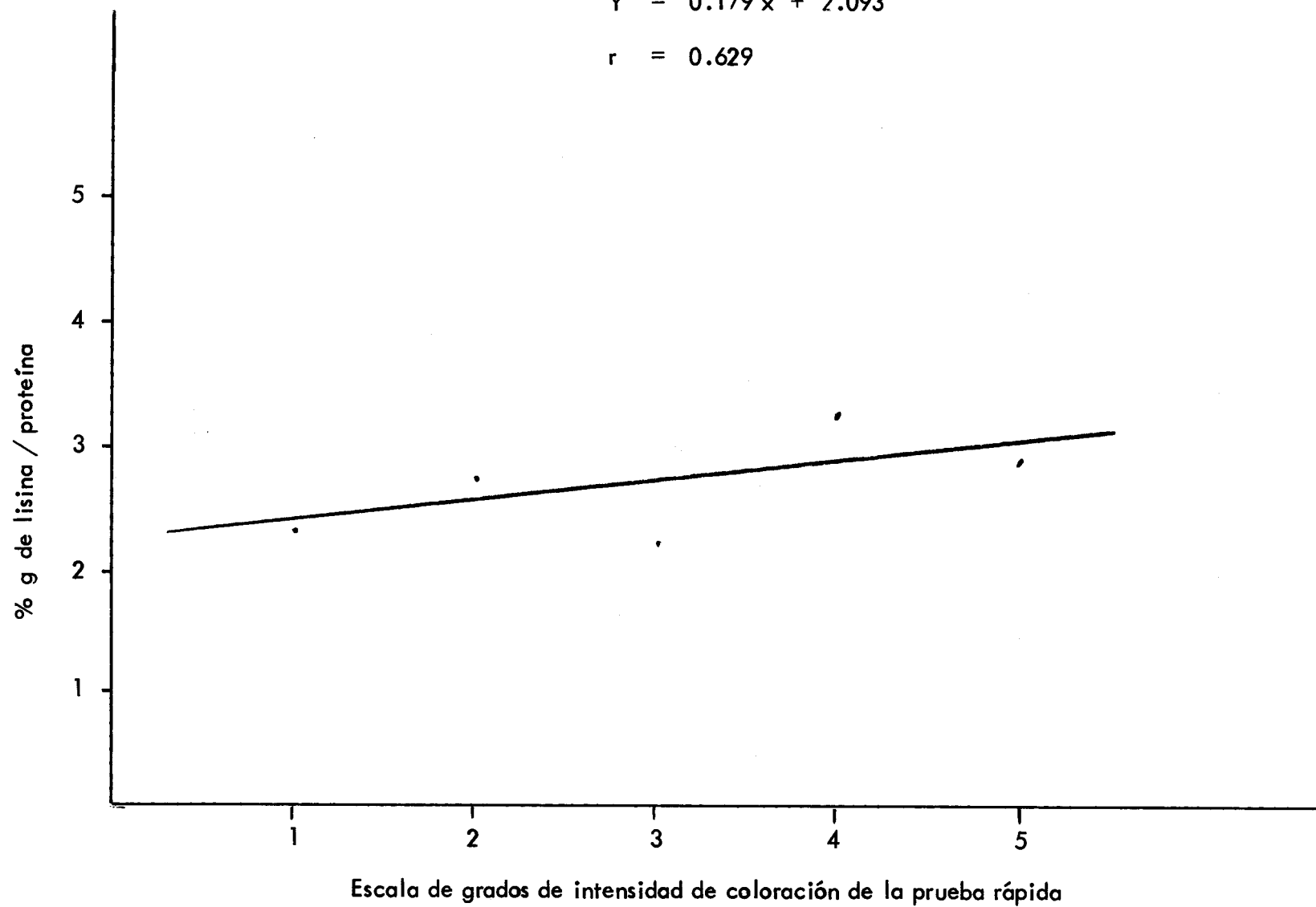
$$r = 0.870$$



Gráfica 8 Variedad Quetzal Oro Amarillo

$$Y = 0.179x + 2.093$$

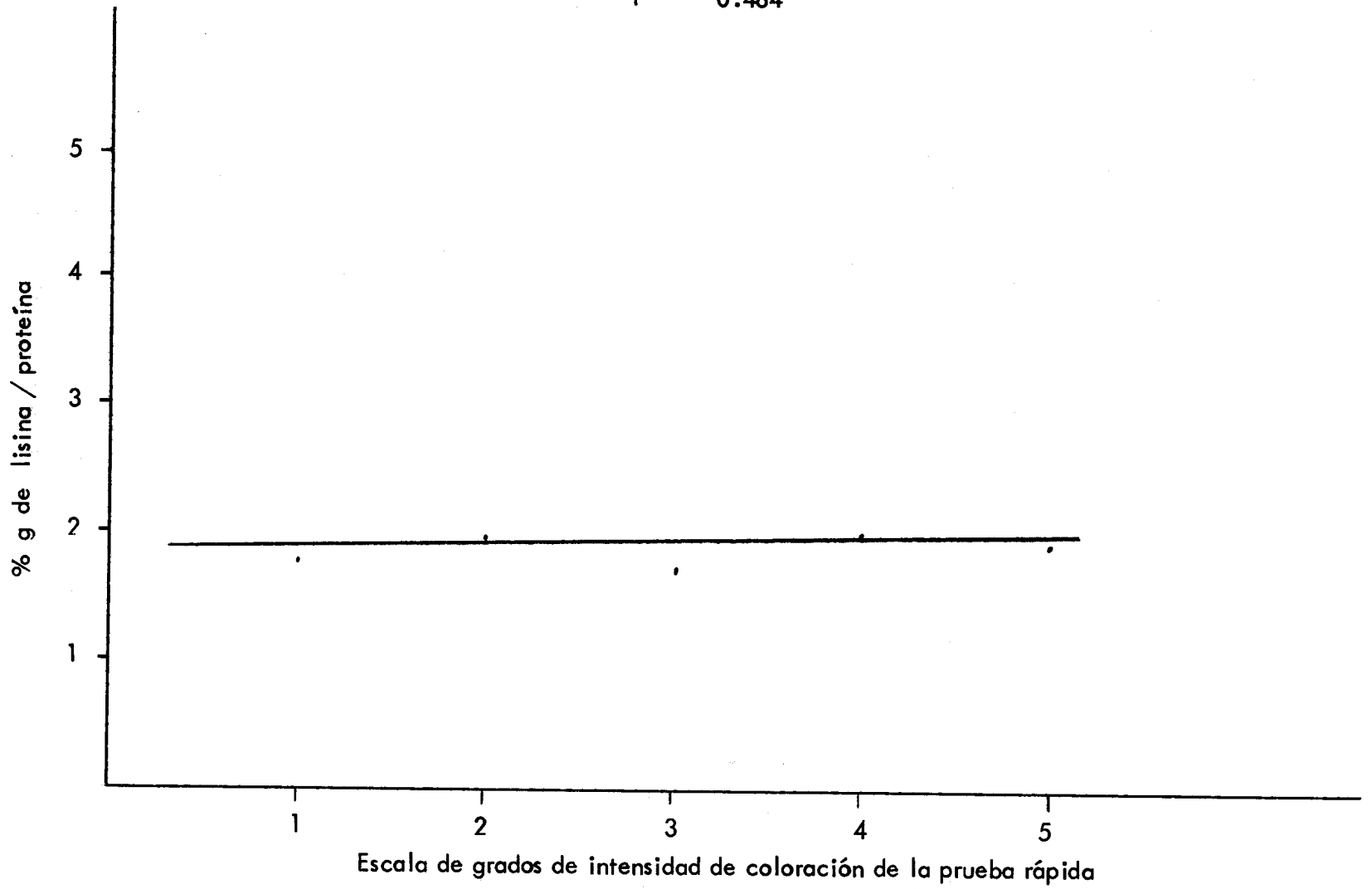
$$r = 0.629$$



Gráfica 9 Variedad Quetzal Oro Blanco

$$Y = 0.036 x + 1.8$$

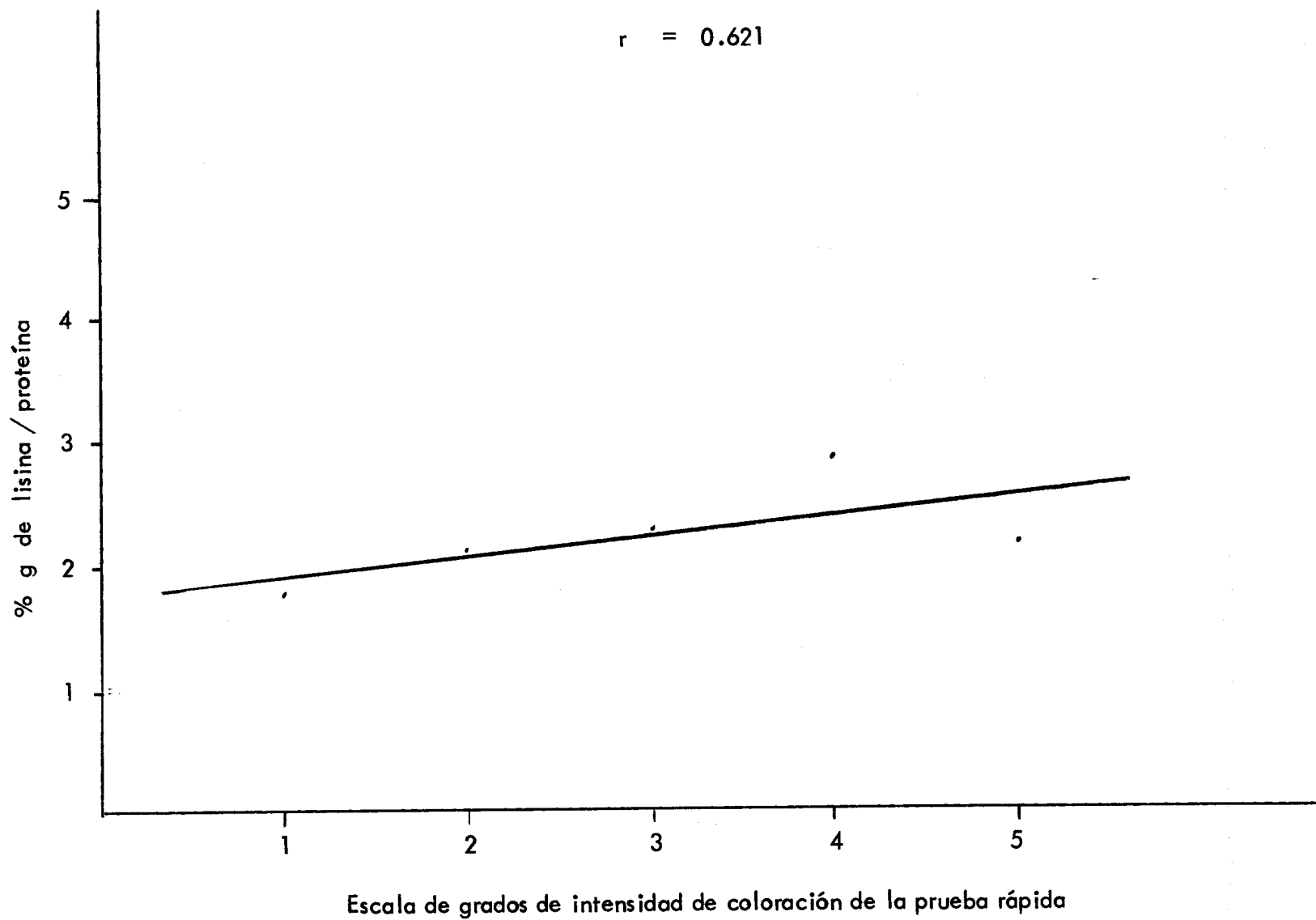
$$r = 0.484$$



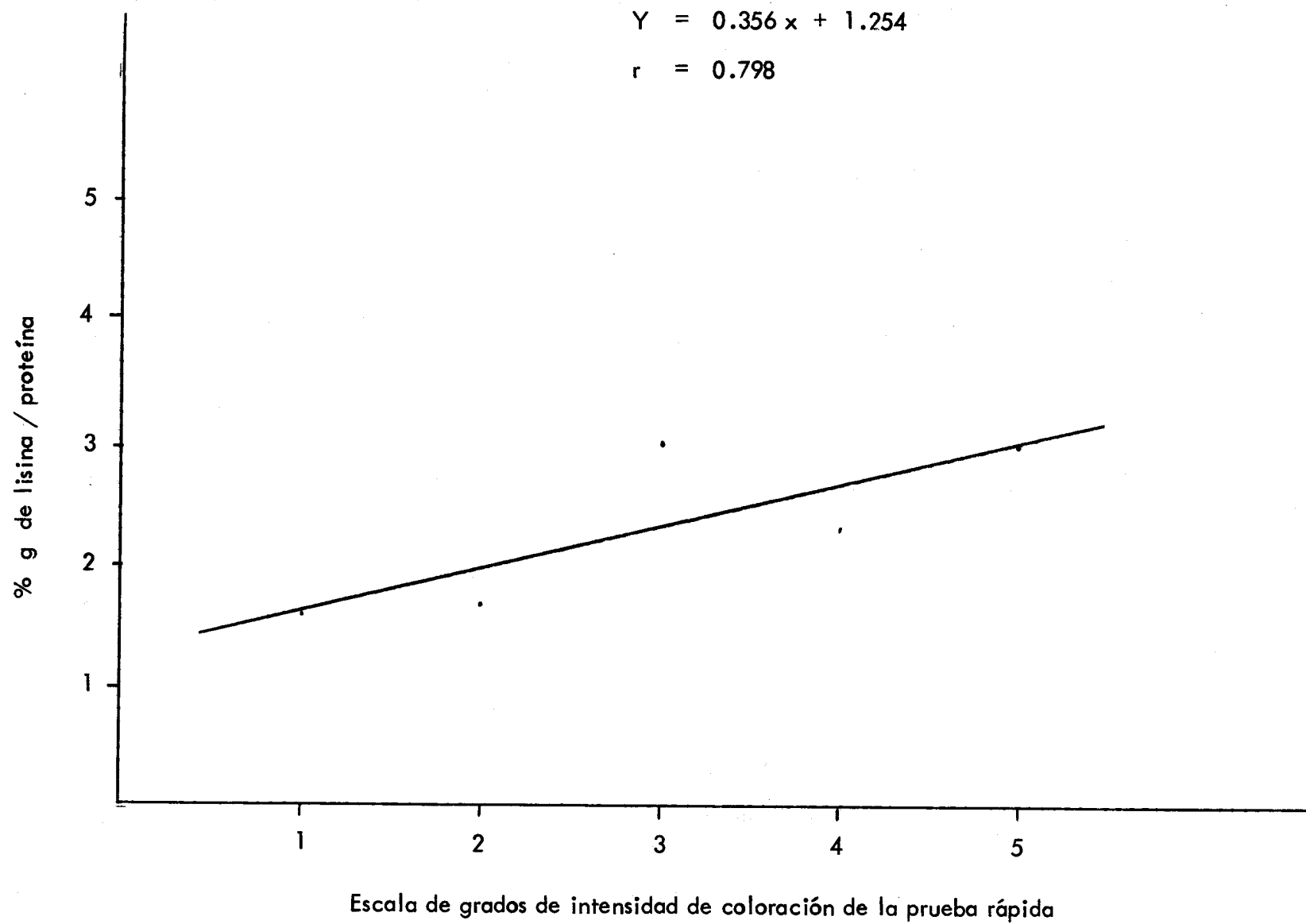
Gráfica 10 Variedad 0 E.D.A. Chimaltenango -76

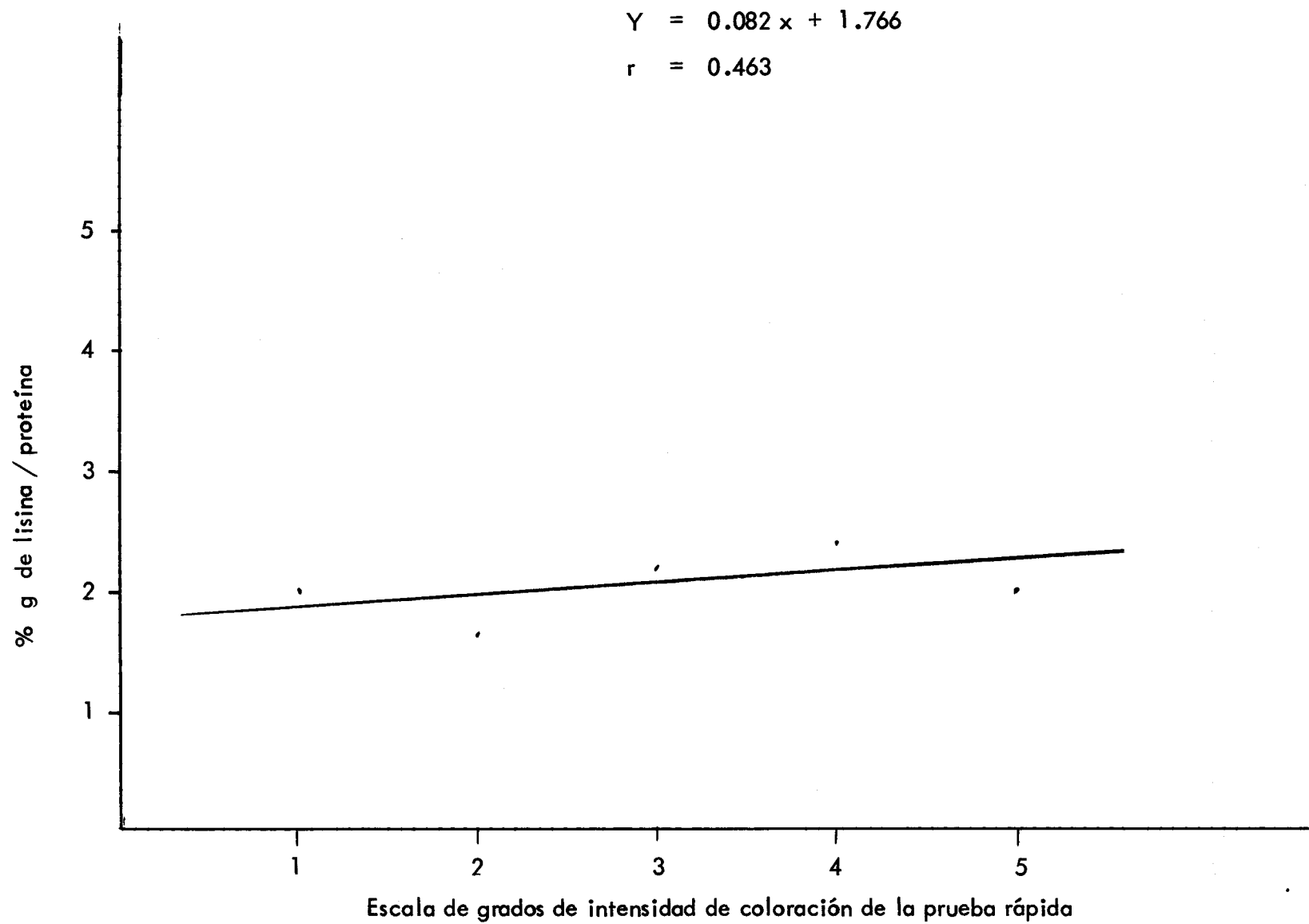
$$Y = 0.157 x + 1.765$$

$$r = 0.621$$



Gráfica 11 Variedad 0₂ ### 71-13

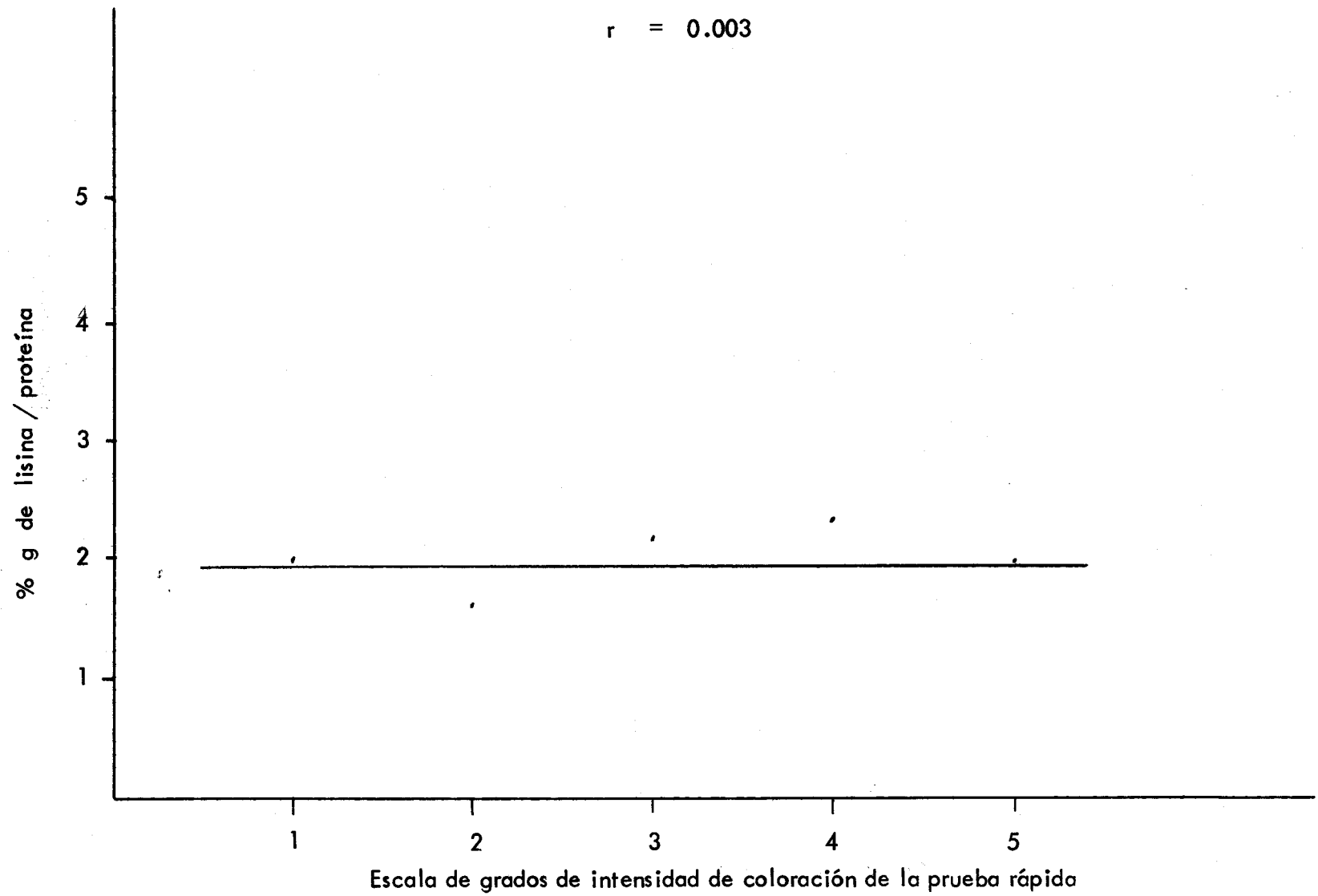


Gráfica 12 Variedad Sintético 1 x O₂

Gráfica 13 Variedad Guatelan Xela x O₂

$$Y = -0.001 x + 1.939$$

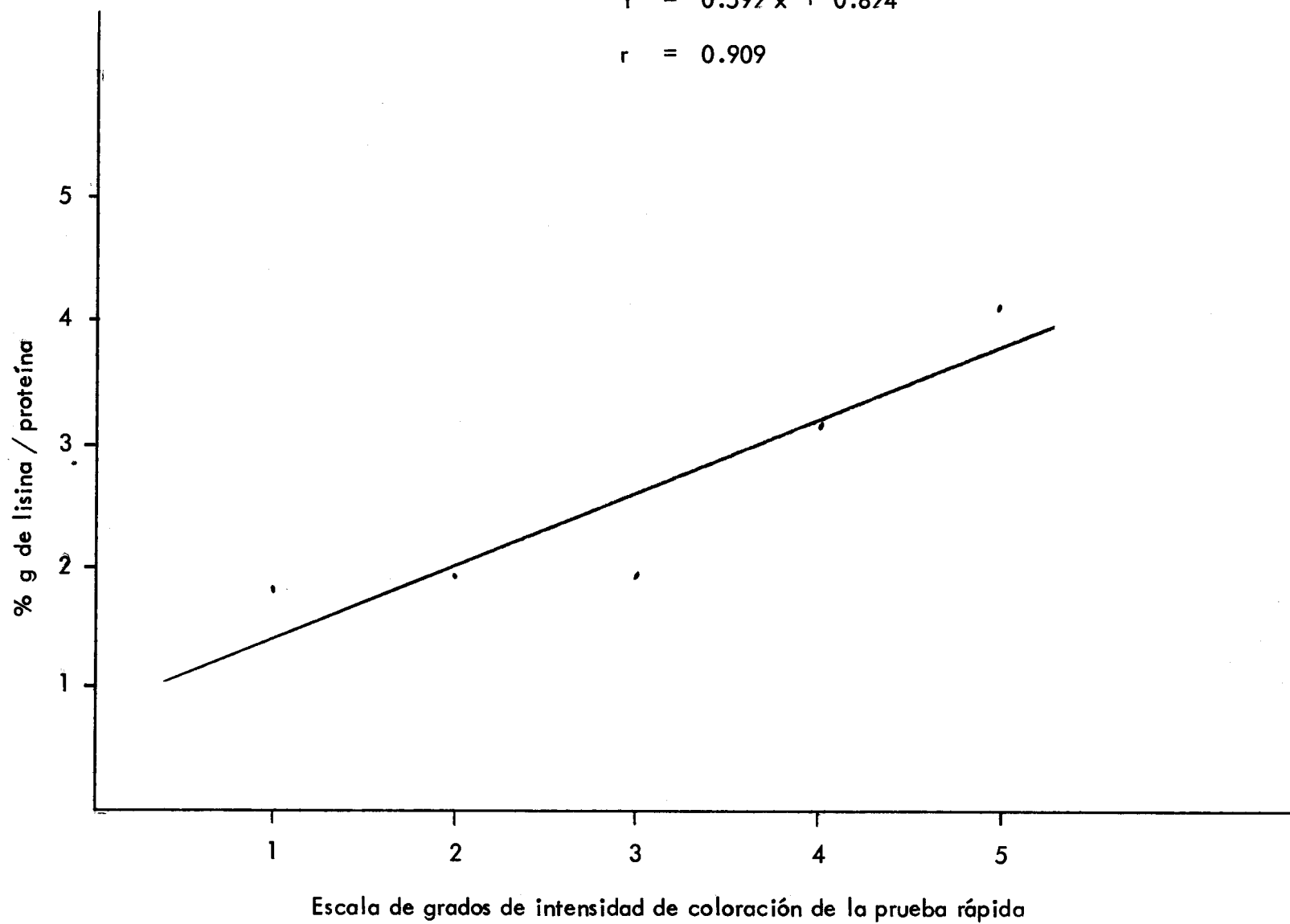
$$r = 0.003$$



Gráfica 14 Variedad San Marceño x O₂

$$Y = 0.592 x + 0.824$$

$$r = 0.909$$



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE AGRONOMIA

Ciudad Universitaria, Zona 12.

Apartado Postal No. 1545

GUATEMALA, CENTRO AMERICA

Referencia ..
Asunto ..
.....

IMPRIMASE :

A handwritten signature in cursive script, appearing to read 'Rodolfo Estrada Gonzalez'.

ING. AGR. RODOLFO ESTRADA GONZALEZ

D E C

