



Mejoramiento de maíz con calidad de proteína

(QPM)

Protocolos para generar variedades QPM

B.S. Vivek, A.F. Krivanek, N. Palacios-Rojas,
S. Twumasi-Afriyie y A.O. Diallo

Mejoramiento de maíz con calidad de proteína (QPM) **Protocolos para generar variedades QPM**

B.S. Vivek,
A.F. Krivanek,
N. Palacios-Rojas,
S. Twumasi-Afriyie
y A.O. Diallo

El Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, conocido como el CIMMYT® (www.cimmyt.org), es un organismo internacional, sin fines de lucro, que se dedica a la investigación científica y la capacitación. Junto con nuestros colaboradores en más de 100 países, aplicamos la ciencia con el objeto de incrementar la seguridad alimentaria, mejorar la productividad y la rentabilidad de los sistemas de producción de maíz y de trigo, y conservar los recursos naturales del mundo en desarrollo. Nuestros productos y servicios incluyen variedades mejoradas de maíz y trigo, avanzados sistemas de cultivo, la conservación de los recursos genéticos del maíz y del trigo, y la formación de capacidad humana. El CIMMYT forma parte del Grupo Consultivo para la Investigación Agrícola Internacional (CGIAR) (www.cgiar.org) y recibe fondos de su parte, así como de gobiernos nacionales, fundaciones, bancos de desarrollo y otras instituciones públicas y privadas.

© Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) 2008. Derechos reservados. Las designaciones empleadas en la presentación de los materiales incluidos en esta publicación de ninguna manera expresan la opinión del CIMMYT o de sus patrocinadores respecto al estado legal de cualquier país, territorio, ciudad o zona, o de las autoridades de éstos, o respecto a la delimitación de sus fronteras. El CIMMYT autoriza el uso razonable de este material, siempre y cuando se cite la fuente.

Cita correcta: Vivek, B.S., A.F. Krivanek, N. Palacios-Rojas, S. Twumasi-Afriyie y A.O. Diallo. 2008. *Mejoramiento de maíz con calidad de proteína (QPM): Protocolos para generar variedades QPM*. México, D.F.: CIMMYT.

Resumen: Este manual, dirigido en primer lugar a los mejoradores de maíz que desean empezar a generar variedades de maíz con calidad de proteína (QPM), constituye una recopilación de varios protocolos de mejoramiento que se han aplicado con éxito en el CIMMYT durante las más de dos décadas que lleva generando y mejorando el QPM. Asimismo, brinda un resumen breve de los antecedentes fitotécnicos y de la teoría básica de los aspectos genéticos del QPM y detalla los métodos y procedimientos que se aplican en el mejoramiento del mismo.

ISBN: 978-970-648-164-1

AGROVOC Descriptores: *Zea mays*; fitomejoramiento; métodos fitotécnicos; recursos genéticos; calidad de proteína; contenido de proteína; métodos de aplicación; lisina; triptófano; componentes de los alimentos

Códigos de categoría AGRIS: F30 Genética vegetal y fitomejoramiento
Q04 Componentes de los alimentos

Clasificación decimal Dewey: 633.15 VIV Es

Impreso en México.

Contenido

Cuadros	v
Figuras	vi
Prólogo	vii
Reconocimientos	viii
1. Introducción y antecedentes	1
2. Utilidad del maíz con alto contenido de lisina y triptófano.....	3
2.1 Nutrición animal	3
2.2 Nutrición humana.....	3
3. Ciencia: Aspecto genético del maíz con alto contenido de lisina y triptófano	4
3.1 Alelo recesivo simple del gene <i>opaco-2</i>	4
3.2 Modificadores del endospermo que contiene el <i>o2o2</i>	5
3.3 Genes que modifican el endospermo suave producido por el <i>opaco-2</i>	5
4. Ciencia: Mejoramiento de maíz con calidad de proteína	7
4.1 Herramientas utilizadas en el mejoramiento del QPM.....	8
4.1.1 Mesa de luz	8
4.1.2 Laboratorio de calidad de proteína	13
4.2 Interpretación de los resultados de laboratorio.....	14
4.2.1 Índice de calidad (IC)	14
4.2.2 La relación entre el IC, la cantidad de proteína y la calidad de proteína	14
4.2.3 Valores de laboratorio que deben considerarse durante la selección.....	14
4.2.4 En conclusión.....	14
4.3 Problemas que surgen en el análisis de laboratorio del triptófano en el QPM (descritos en la Sección 11.2.3).....	15
4.3.1 Breve resumen del análisis de triptófano	15
4.3.2 El problema	15
4.4 Componentes del mejoramiento del QPM.....	16
4.4.1 Germoplasma fuente elite.....	16
4.4.2 Donadores QPM.....	16
4.4.3 Probadores QPM	18
4.5 Métodos para mejorar el QPM.....	20
4.5.1 Reciclaje de QPM elite con QPM elite	34
5. Producción de semilla	35
5.1 Producción de semilla del mejorador de las VPL	35
5.2 Producción de semilla básica de las VPL	36
6. Cómo beneficia el QPM a los agricultores y las comunidades.....	37
6.1 Contaminación del QPM sembrado en campos de agricultores.....	37

6.2 Adopción y comercialización del QPM.....	38
6.3 Estabilidad de la calidad del QPM cultivado en suelos infértiles	39
6.4 Estabilidad de la calidad del QPM no contaminado por maíz normal.....	39
7. Normas de la calidad de proteína	40
7.1 Preparación de las muestras para el análisis de laboratorio	41
8. Métodos nuevos	42
8.1 Selección con la ayuda de marcadores moleculares (MAS)	42
8.1.1 Marcadores moleculares del gene <i>opaco-2</i>	42
8.1.2 Limitaciones en el uso de marcadores moleculares en el mejoramiento genético	43
9. Conclusión.....	44
10. Referencias bibliográficas.....	45
11. Apéndice	46
11.1 Lo que el QPM puede contribuir a la nutrición humana	46
11.1.1 El valor biológico del QPM	46
11.1.2 El vínculo entre la situación económica, la calidad de la dieta, la proteína y la desnutrición por falta de lisina.....	46
11.1.3 Desnutrición proteínica en países donde el maíz es el alimento básico	47
11.1.4 Referencias bibliográficas	48
11.2 Protocolos de laboratorio	48
11.2.1 Determinación de nitrógeno	48
11.2.2 Determinación de proteína.....	52
11.2.3 Determinación de triptófano.....	52
11.2.4 Referencias bibliográficas	56
11.3 Donadores QPM disponibles en el CIMMYT	56

Cuadros

Cuadro 1.	Genes mutantes de maíz con alto contenido de lisina.....	1
Cuadro 2.	Comparación de los porcentajes promedio de lisina y triptófano presentes en el maíz <i>opaco-2</i> y el maíz normal (sin el <i>opaco-2</i>).....	2
Cuadro 3.	Comparación del valor proteínico del maíz normal y del maíz <i>opaco-02</i> con el de la leche.....	2
Cuadro 4.	Distribución de la fracción proteínica en muestras de endospermo normal y endospermo suave (<i>o2</i>).....	4
Cuadro 5.	Los niveles de lisina y triptófano como porcentajes de la proteína total en harina de grano integral de maíz normal y maíz <i>o2o2</i>	5
Cuadro 6.	Métodos, componentes, pasos y herramientas utilizados en el mejoramiento de QPM	7
Cuadro 7.	Análisis de laboratorio del endospermo comparado con el de grano entero.	14
Cuadro 8.	Costos usuales de los análisis de laboratorio	14
Cuadro 9.	Guía rápida para interpretar los resultados de laboratorio	14
Cuadro 10.	Conversión a QPM de una VPL normal	23
Cuadro 10a.	Costos aproximados de convertir una VPL a QPM	26
Cuadro 11.	Conversión de una línea de maíz normal a QPM	27
Cuadro 11a.	Costos aproximados de convertir una línea de maíz normal a QPM.....	30
Cuadro 12.	Reciclaje de VPL y líneas de maíz normal utilizando donadores QPM (primer esquema)	31
Cuadro 13.	Reciclaje de VPL y líneas de maíz normal utilizando donadores QPM (segundo esquema)	33
Cuadro 14.	Criterios y normas de selección	40
Apéndice: Cuadro 1.	Reactivos utilizados en la determinación de nitrógeno con el Autoanalizador Technicon	50
Apéndice: Cuadro 2.	Problemas que pueden surgir en la determinación de nitrógeno con el Autoanalizador Technicon, y sus posibles soluciones	50
Apéndice: Cuadro 3.	Reactivos utilizados en la determinación de nitrógeno con el método Micro-Kjeldahl	51
Apéndice: Cuadro 4.	Problemas que pueden surgir en la determinación de nitrógeno con el método Micro-Kjeldahl, y sus posibles soluciones	52
Apéndice: Cuadro 5.	Reactivos utilizados en la determinación de triptófano	53
Apéndice: Cuadro 6.	Preparación de una curva de calibración de triptófano.....	54
Apéndice: Cuadro 7.	Problemas que puede surgir en la determinación de triptófano, y sus posibles soluciones	55

Figuras

Figura 1. Cerdo alimentado con maíz con alto contenido de lisina y triptófano (el animal más grande marcado QPM o Q4) comparado con su hermano alimentado con maíz normal (marcado normal o N4).....	3
Figura 2. Herencia simple y recesiva del gene <i>o2</i>	4
Figura 3. Mazorcas <i>o2</i> de endospermo suave que presentan cuarteaduras del pericarpio.....	5
Figura 4. Mazorcas de maíz <i>o2</i> con endospermo suave del Pool 25, ciclo 0 (izquierda), y mazorcas de la versión mejorada (ciclo 18) (derecha).....	6
Figura 5. Vista superior de una mesa de luz tipo (a)	8
Figura 6. Mesa de luz de tipo (a) donde se muestra el foco en su interior	8
Figura 7. Vista frontal de una mesa de luz de tipo (b).....	8
Figura 8. Vista trasera de una mesa de luz de tipo (b).....	8
Figura 9. Colocación de los focos en una mesa de luz de tipo (b).....	9
Figura 10. Mesa de luz de tipo (b) con la tapa abierta	9
Figura 11. Vista lateral de una mesa de luz de tipo (b) con la tapa abierta	9
Figura 12. Mesa de luz iluminada.....	9
Figura 13. Selección de granos de maíz en una mesa de luz.....	9
Figura 14. Granos de maíz sobre una mesa de luz	9
Figura 15. Granos de maíz que portan el gene <i>o2</i> colocados con el embrión hacia abajo en la mesa de luz. La opacidad de los granos varía, indicando distintos grados de modificación del endospermo	10
Figura 16. Granos de maíz en una mesa de luz, ordenados según el grado de modificación	10
Figura 17. Granos de maíz en una mesa de luz (izquierda) y las clases de modificación en semilla F2 que desciende de maíz normal cruzado con un donador QPM.....	11
Figura 18. Ejemplo de mazorcas F2 segregando para la modificación del endospermo (los granos totalmente blancos son completamente opacos).....	12
Figura 19. Granos de maíz en una mesa de luz, separados según sus puntajes de modificación.....	13
Figura 20. Correlación entre el contenido de lisina y de triptófano en 307 muestras de germoplasma de maíz tropical	13
Figura 21. Comparación del comportamiento de dos híbridos QPM con un testigo comercial normal en 25 localidades del este y el sur de África, 2005.....	39
Apéndice: Figura 1. Ejemplo de una curva de calibración para el triptófano.....	54

Prólogo

Los expertos en ciencias agrícolas desde hace tiempo han tenido interés en mejorar la calidad de la proteína de las plantas. Aunque el contenido de proteína del maíz no es tan bajo como el de otros cultivos básicos, sí es bastante parco (generalmente cerca del 10%). La mitad de esa proteína casi no contiene lisina ni triptófano, dos aminoácidos esenciales para la formación de proteína en los seres humanos y los animales monogástricos.

En 1963, un estudiante de doctorado llamado Lynn Bates, que trabajaba con el Profesor Edwin Mertz en la Universidad de Purdue en Estados Unidos, descubrió que dos razas de maíz originarias de los Andes tenían niveles de lisina y triptófano mucho mayores de lo normal, debido a un gene denominado *opaco-2*.

El descubrimiento del maíz que portaba el *opaco-2* suscitó gran interés y actividad entre los investigadores, que abrigaban la esperanza de poder mejorar de manera sustancial la nutrición de los consumidores de maíz, sobre todo en los países en vías de desarrollo. Desgraciadamente, como muchas veces sucede con las plantas, esa característica altamente beneficiosa resultó estar estrechamente asociada con varias otras que son perjudiciales y el entusiasmo inicial pronto se trocó en desilusión. Los granos de maíz *opaco-2* eran opacos y gredosos, pesaban de 15 a 20% menos de lo normal y eran susceptibles a varios insectos y enfermedades. En vista de estos enormes obstáculos, la mayoría de los programas de investigación redujeron su trabajo con el maíz *opaco-2*.

Sólo unos cuantos institutos de investigación continuaron con esta labor; entre ellos destaca el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) en México. Un grupo interdisciplinario de investigadores en este Centro, originalmente dirigido por el mejorador Dr. Surinder K. Vasal y la química en cereales Dra. Evangelina Villegas, aplicaron las metodologías fitogenéticas convencionales y poco a poco superaron los defectos del *opaco-2*, al mismo tiempo que mantuvieron una calidad nutricional superior. Estos científicos lograron convertir los granos con endospermo suave y harinoso en granos duros, y aumentaron el potencial de rendimiento del maíz QPM al mismo nivel de los mejores maíces normales; además, le confirieron resistencia a enfermedades e insectos y cualidades de almacenamiento y utilización semejantes a las de los mejores maíces normales. El nuevo maíz *opaco-2*, de apariencia y sabor normales, fue denominado “maíz con calidad de proteína” o QPM (por sus siglas en inglés, que representan *quality protein maize*). Los avances logrados han sido notables, sobre todo si se toman en cuenta los escasos recursos que se invirtieron en la creación del QPM.

Algunos programas nacionales de investigación del maíz en el mundo en desarrollo también han dedicado muchos esfuerzos a la generación del maíz QPM. Sobresalen entre éstos la República Sudafricana, Brasil, China, Ghana y la India. Hoy día, más de 1.2 millones de hectáreas se siembran con variedades e híbridos QPM en el mundo en desarrollo. De este total, más de 700,000 ha se localizan en 15 países de África al sur del Sahara. Cabe resaltar que la mayoría del QPM que se cultiva en África se destina al consumo directo por seres humanos.

El maíz con calidad de proteína constituye una valiosa opción como alimento animal, ya que ayuda a reducir los requerimientos de otras fuentes de proteína en los alimentos balanceados. Sin embargo, el QPM siempre me ha interesado primordialmente como fuente de alimento rico en nutrimentos para la gente de escasos recursos en aquellas regiones del mundo donde el maíz es la fuente primaria de energía. Se han realizado ensayos de alimentación infantil con el QPM que han demostrado que cuando éste se utiliza para destetar a los infantes, éstos crecen más y ganan más peso, con lo cual mejora su salud.

En vista de que el QPM es un cultivo alimentario que brinda mayor contenido de nutrimentos a los pobres, resulta esencial el asunto de su genotipo. Una variedad QPM de polinización libre generalmente responde mejor a las necesidades de los agricultores pobres que un híbrido, como consecuencia de los altos costos y problemas de distribución del segundo. No obstante, debido a que el gene *opaco-2* es recesivo, resultan problemáticas la dilución y pérdida gradual de la calidad nutricional del QPM ocasionadas por la contaminación con polen de maíz que no es QPM (es decir, que tiene proteína normal). Desde el punto de vista de retener el gene *opaco-2* en el grano, son preferibles los híbridos. Por otra parte, la falta de sistemas adecuados de multiplicación y distribución de semillas sigue siendo uno de los graves problemas que enfrentan los mejoradores y promotores del QPM.

Aprovecho esta ocasión para expresar mi reconocimiento a los autores por haber producido este práctico manual sobre el mejoramiento y la producción de semilla QPM. Estoy seguro que contribuirá al avance del QPM y a resolver los problemas de calidad que aquí he señalado.

Norman E. Borlaug

Reconocimientos

Los autores agradecen a J. MacRobert y a K. Pixley por su revisión de este manual. Asimismo, les dan las gracias a J. López-Cessati, E. Nurit y Luis Alberto Galicia por su ayuda en la verificación de los protocolos de laboratorio. También expresan su reconocimiento a K. Pixley por haber coordinado la revisión de esta obra, a Alma McNab por la edición, y a Antonio Luna y Miguel Mellado por el diseño y formación de texto.

En los 30 años que han transcurrido desde el inicio de la investigación de QPM, son numerosos los científicos, técnicos y trabajadores, tanto del CIMMYT como de las instituciones que colaboran con nosotros, que han contribuido a estos esfuerzos. Cada uno de ellos ha hecho alguna aportación a los conocimientos que hoy tenemos —resumidos en este manual— de cómo mejorar maíz QPM de manera eficaz y eficiente. Aunque no es posible reconocer a cada uno de ellos por separado, el liderazgo del programa QPM del CIMMYT ejercido en su momento por Surinder Vasal, Magni Bjarnason y Hugo Córdova contribuyó a modificar e incorporar el gene *opaco-2* en una amplia y útil base de germoplasma; sentar los fundamentos e iniciar el mejoramiento de híbridos de QPM; e identificar y promover variedades de polinización libre e híbridos QPM competitivos.

Aparte del liderazgo en materia científica aportado por el CIMMYT, existen cientos de colegas y trabajadores por todo el mundo que dedicaron miles de horas de trabajo en el campo y en el laboratorio a generar maíz QPM. A todos ellos les expresamos nuestro profundo agradecimiento.

1. Introducción y antecedentes

El maíz (*Zea mays* L.) se siembra en más de 96.5 millones de hectáreas en el mundo en desarrollo (FAOSTAT-Agric. 2004) y constituye el alimento básico de muchos millones de habitantes por todo el planeta. Además, aporta entre el 15 y 56% de todas las calorías ingeridas por los seres humanos en cerca de 25 países en vías de desarrollo (Prasanna et al., 2001). En África, el maíz suministra al menos una quinta parte de todas las calorías que la gente consume a diario y aporta entre 17 y 60% de las proteínas totales en 12 países, según estimaciones asentadas en las hojas del balance de alimentos de la FAO (Krivaneck et al., 2007). Estas cifras representan estimaciones promedio per cápita; sin embargo, existen grupos específicos en estos países (niños que están siendo destetados, niños enfermos, adultos enfermos y, cuando la producción de cultivos es escasa, todos los grupos) que dependen aun más del maíz como la principal fuente de proteína en la dieta. Los alimentos que contienen proteína son esenciales para que los niños crezcan rápidamente (Millward y Rivers, 1989) y, en algunos países, el maíz se utiliza como alimento durante el proceso de destetar a los infantes.

Esta dependencia del maíz como fuente de proteína pone a la gente en riesgo de presentar deficiencia proteínica porque la proteína del maíz (al igual que la de la mayoría de los cereales) adolece de dos aminoácidos esenciales,¹ lisina y triptófano; por lo tanto, el maíz constituye una fuente insuficiente de proteína tanto para los seres humanos como para los animales monogástricos. En consecuencia, una dieta basada en el maíz, que no incluye alimentos complementarios ricos en proteínas, como la carne, las leguminosas y los productos lácteos, es considerada deficiente en proteína. La deficiencia proteínica, particularmente en niños, provoca kwashiorkor, un síndrome potencialmente mortal caracterizado por deficiencia del crecimiento en

infantes, irritabilidad, lesiones de la piel, edema e hígado graso (esteatosis hepática). Por ende, resulta indispensable contar con variedades de maíz con un mejor perfil proteínico para comunidades con una fuerte dependencia del maíz como alimento básico.

Varias mutaciones naturales de los genes del maíz que confieren mayores niveles de lisina y triptófano fueron identificadas en las décadas de 1960 y 1970, a saber, el *opaco-2* (*o2*), *harinoso-2* (*fl2*), *opaco-7* (*o7*), *opaco-6* (*o6*) y *harinoso-3* (*fl3*) (Cuadro 1).

De éstas, se encontró que la mutación *o2*, originalmente identificada en un campo de maíz en el estado de Connecticut, en Estados Unidos (Vietmeyer, 2000), era la más apta para ser utilizada en la manipulación genética por los programas fitotécnicos dirigidos a generar maíz con altos niveles de lisina y triptófano. Se demostró que el maíz homocigoto respecto a la mutación *o2* (recesiva) tenía un contenido considerablemente mayor de lisina y triptófano (Cuadro 2) que el maíz que era heterocigoto (*O2o2*) u homocigoto dominante (*O2O2*) en el locus *opaco-2* (Crow y Kermicle, 2002). Bressani (1992) demostró que una mayor concentración de estos dos aminoácidos en el endospermo del grano puede duplicar el valor biológico² de la proteína del maíz. Sin embargo, la cantidad de proteína en este

Cuadro 1. Genes mutantes de maíz con alto contenido de lisina.

Gene	Alelo	Descubridores	Año en que fue descubierto
<i>Opaco-2</i>	<i>o2</i>	Mertz, Bates y Nelson	1964
<i>Harinoso-2</i>	<i>fl2</i>	Nelson, Mertz y Bates	1965
<i>Opaco-6</i>	<i>o6</i>	McWhirter	1971
<i>Opaco-7</i>	<i>o7</i>	Ma y Nelson	1975
<i>Harinoso-3</i>	<i>fl3</i>	Ma y Nelson	1975

¹ Las proteínas se componen de aminoácidos, de los cuales hay 20. De éstos, la lisina y el triptófano no pueden ser sintetizados por el metabolismo de animales monogástricos como los cerdos, los pollos y los seres humanos. Por consiguiente, estos dos aminoácidos tienen que ingerirse como parte de la alimentación, para completar el perfil de aminoácidos requerido para la síntesis de proteínas. Por eso, la lisina y el triptófano son considerados esenciales; los demás aminoácidos no son considerados esenciales, pues pueden ser sintetizados por los procesos metabólicos de los animales monogástricos.

² El valor biológico de la proteína es la proporción de proteína absorbida que es retenida en el cuerpo para ser utilizada en su mantenimiento y crecimiento.

tipo de maíz sigue siendo del 10%, lo mismo que en el maíz común (con endospermo normal). En otras palabras, la cantidad de maíz común que habría que consumir para lograr equilibrar los aminoácidos es más de dos veces mayor que la cantidad de maíz *opaco-2* (FAO, 1992). Se considera que el valor nutritivo de la proteína de la leche es mayor que el

de la proteína del maíz (Cuadro 3); sin embargo, a nivel mundial, muy poca gente tiene los medios para comprar leche regularmente. Por eso, es importante el hecho que el maíz homocigoto respecto al mutante *o2* tiene un valor de calidad equivalente al 90% del valor de la leche.

Cuadro 2. Comparación de los porcentajes promedio de lisina y triptófano presentes en el maíz *opaco-2* y el maíz normal (sin el *opaco-2*).

	Normal	<i>Opaco-2</i>
	g/100 g proteína	
Lisina	2.6	4.2
Triptófano	0.4	0.9

Cuadro 3. Comparación del valor proteínico del maíz normal y del maíz *opaco-o2* con el de la leche.

	% de la calidad de la leche
Maíz normal	39
Maíz <i>o2</i>	90
Leche	100

Fuente: Bressani et al., 1969b; Viteri et al., 1972.

Cabe resaltar que el *o2* es un mutante natural, no un organismo genéticamente modificado (OGM). La mutación *o2* recesiva en estado homocigótico confiere una mayor calidad (lisina y triptófano) a la proteína de maíz, pero no cambia la cantidad de proteína presente en el grano.

Los términos “maíz común” o “maíz normal” se utilizan en este manual para referirse al maíz común que no es QPM, es decir, que no tiene niveles mejorados de lisina y triptófano.

2. Utilidad del maíz con alto contenido de lisina y triptófano

El maíz con alto contenido de lisina y triptófano, generado en los últimos 15 años, se ha utilizado en ensayos de alimentación con animales (monogástricos) y seres humanos. Enseguida se incluye un breve resumen de varios de esos estudios.

2.1 Nutrición animal

Los cerdos alimentados con maíz con altos niveles de lisina y triptófano aumentan de peso cerca de dos veces más rápido que los alimentados sólo con maíz normal y sin suplementos proteínicos agregados. Cuando se sustituye el maíz normal con una cantidad igual de maíz con alto nivel de lisina en el alimento de cerdos, se mantiene el balance de aminoácidos y no es necesario usar tanta lisina sintética (Burgeon et al., 1992). Los pequeños productores (que usualmente no tienen los recursos para comprar alimentos balanceados) y los productores comerciales encuentran que esto resulta sumamente lucrativo. En El Salvador, un agricultor informó que después de 60 días, 14 cerdos alimentados con grano del híbrido HQ-61 (un maíz con alto contenido de lisina y triptófano) pesaban 18 kg más que los cerdos alimentados con maíz normal. En Guizhou, una de las provincias más pobres de China, se les otorgó crédito a varios agricultores para que compraran cerdos y los criaran con maíz con alto contenido de lisina y triptófano. El resultado fue que los agricultores en cuestión ganaron suficiente dinero para construir



Figura 1. Cerdo alimentado con maíz con alto contenido de lisina y triptófano (el animal más grande marcado QPM o Q4) comparado con su hermano alimentado con maíz normal (marcado normal o N4).

Por cortesía de: Instituto de Investigación de Cultivos, Kumasi, Ghana; Departamento de Ciencias Animales, Universidad de Ciencia y Tecnología Kwame Nkrumah, Kumasi, Ghana, y Sasakawa Global 2000.

sus casas y llevar a cabo actividades orientadas al desarrollo de la comunidad.

2.2 Nutrición humana

Varios estudios de la nutrición humana llevados a cabo por Akuamo-Boateng (2002) en Ghana encontraron lo siguiente:

- que los niños alimentados con maíz con alto contenido de lisina y triptófano estuvieron enfermos menos días y corrieron menos riesgo de morir por diarrea y otras infecciones que los que se alimentaron con papilla hecha de maíz normal.
- menos enanismo en niños alimentados, después del destete, con maíz con alto contenido de lisina y triptófano que en los alimentados con papilla hecha de maíz normal.
- mayor capacidad de crecimiento en niños que consumieron maíz con alto contenido de lisina y triptófano que los alimentados con papilla hecha de maíz normal.

Con base en esos resultados, Akuamo-Boateng llegó a la conclusión que el maíz con alto contenido de lisina y triptófano promete mejorar el estado nutricional de grupos vulnerables, cuyo alimento básico es el maíz y que no pueden comprar alimentos ricos en proteínas para suplementar su dieta.

En Colombia, unos niños que padecían kwashiorkor, una grave enfermedad provocada por deficiencia proteínica, recuperaron la salud con una dieta cuya única fuente de proteína era el maíz con alto contenido de lisina y triptófano. Estudios recientes han mostrado que, además, los altos niveles de lisina ayudan a asimilar el zinc y el hierro provenientes del grano de maíz.

En vista de la extensa superficie sembrada con maíz y el gran número de agricultores que se dedican a su producción, la generación, introducción y adopción de variedades de este cultivo con alto contenido de lisina y triptófano tienen un gran potencial para reducir la desnutrición proteínica, aminorar el hambre, aumentar los ingresos y mejorar el nivel de vida de la población.

A aquellos lectores que se interesen en un resumen más amplio de este tema, se les sugiere consultar la Sección 11.1: "Lo que el QPM puede contribuir a la nutrición humana".

3. Ciencia: Aspecto genético del maíz con alto contenido de lisina y triptófano

Para generar maíz con alto contenido de lisina y triptófano, es necesario manipular tres sistemas genéticos distintos:

- El alelo recesivo simple del gene *opaco-2*,
- Los modificadores o enriquecedores del endospermo que contiene el *o2o2*, y que aumentan los niveles de lisina y triptófano,
- Los genes que modifican el endospermo suave producto del *opaco-2* y lo transforman en endospermo duro.

3.1 Alelo recesivo simple del gene *opaco-2*

Este alelo es un componente central del sistema genético que confiere niveles altos de lisina y triptófano a la proteína del endospermo del maíz. El alelo *o2* se hereda de manera simple y recesiva (Figura 2). La presencia del *o2* en estado homocigoto recesivo (*o2o2*) es indispensable para poder obtener maíz con alto contenido de lisina y triptófano, procedimiento descrito en las secciones subsecuentes.

Las proteínas más abundantes en el endospermo del grano son las zeínas y, especialmente, las alfa-zeínas (la fracción II en el Cuadro 4), que son deficientes en lisina y triptófano (Gibbon y Larkins, 2005). El mutante homocigoto *o2* provoca una reducción en la producción de la fracción de alfa-zeína de la proteína

del endospermo y un aumento correspondiente en la proporción de proteínas no-zeínas (las fracciones I, IV y V) que en forma natural contienen niveles mayores de lisina y triptófano (Gibbon y Larkins, 2005) (Cuadro 4). Por tanto, en una cantidad dada de proteína proveniente de maíz *o2o2*, la proporción de no-zeínas es mayor, lo cual predispone al maíz *o2* a tener mayores niveles de lisina y triptófano.

Cuadro 4. Distribución de la fracción proteínica en muestras de endospermo normal y endospermo suave (*o2*).

Número	Fracción proteínica	Porcentaje de proteína total (g/100 g de proteína)	
		Tuxpeño-1 endospermo normal	Tuxpeño- <i>o2</i> endospermo suave
I	Albúminas, globulinas, nitrógeno soluble	6.6	17.0
II	Zeínas (alfa, beta, delta, gamma)	48.7	9.7
III	Semejantes a la zeína	14.0	13.4
IV	Semejantes a la glutelina	9.2	17.2
V	Glutelina	17.0	34.5
	Residuo	4.5	8.1

Fuente: Citada por Bjarnason y Vasal (1992).

Nótese que:

- El *o2o2* reduce la cantidad de zeína en la fracción de proteína porque inhibe la transcripción de zeína. El contenido de lisina en la zeína es muy bajo.
- Al disminuir la cantidad de zeína, aumentan otras fracciones; por ejemplo, se duplican las fracciones I y V, que tienen alrededor de 60 veces más lisina que la zeína.

Herencia recesiva simple del gene *o2*

$O2O2 \times o2o2$

$O2o2$

$\frac{1}{4}O2O2; \frac{1}{2}O2o2; \frac{1}{4}o2o2$

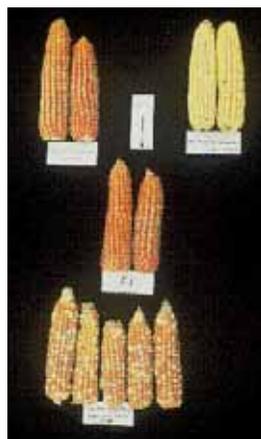


Figura 2. Herencia simple y recesiva del gene *o2*.

Sin embargo, la sola presencia del alelo *o2* en condición recesiva (*o2o2*) en sí no asegura que habrá niveles altos de lisina y triptófano; solo predispone el maíz a presentarlos. Se requiere la presencia de otro juego de genes (ver la Sección 3.2) que aumentan los niveles de estos aminoácidos para conferir niveles más altos de los mismos.

3.2 Modificadores del endospermo que contiene el *o2o2*

Éste es el segundo sistema genético esencial que confiere niveles altos de lisina y triptófano al maíz. Dicho sistema consiste en loci modificadores menores que afectan los niveles de lisina y triptófano del endospermo. Los niveles de lisina en el maíz normal y el *o2* representan, en promedio, 2.0% y 4.0%, respectivamente, de la proteína total en la harina de grano integral. Sin embargo, en una diversidad de configuraciones genéticas, estos niveles se sitúan entre 1.5 y 2.8% en maíz normal y hasta 2.6 y 5.0% en sus contrapartes convertidas en *o2* (Moro et al., 1996). Por tanto, si los niveles de lisina y triptófano no son monitoreados mientras se generan variedades nuevas, al final se podría obtener una variedad con el genotipo *o2o2* y con niveles de lisina y triptófano iguales a los del maíz normal, debido a que los límites inferiores de estos aminoácidos en el maíz *o2o2* son iguales a los límites superiores de los mismos en el maíz normal (Cuadro 5).

3.3 Genes que modifican el endospermo suave producido por el *opaco-2*

La mutación *o2* y los modificadores o enriquecedores de lisina y triptófano no son, por sí solos, suficientes para generar maíz con alto contenido de estos aminoácidos y buen comportamiento agronómico. Los efectos pleiotrópicos del alelo *o2* vuelven el endospermo suave y susceptible a las cuarteaduras, a las pudriciones de la mazorca y a los gorgojos (Figura 3). Estos efectos secundarios negativos son obviamente indeseados. La suavidad se expresa en un fenotipo opaco que es observable en una mesa de luz (ver la Sección 4.1.1.4). Por tanto, para mejorar el contenido de lisina y triptófano del maíz, se requiere seleccionar con base en un tercer sistema genético, también compuesto por loci modificadores menores, que convierte el endospermo mutante de fenotipo suave, opaco y harinoso en uno duro y cristalino, semejante al del maíz normal.

Se ha demostrado (Wallace et al., 1990) que un nivel mayor de zeína gamma contribuye a recuperar el fenotipo de endospermo duro, dado que los granos con el *o2* modificado (endospermo duro) tienen aproximadamente el doble de zeína gamma en el endospermo que los mutantes que portan sólo el *o2*. (Si bien es cierto que la proporción de zeínas generalmente disminuye en el endospermo *o2*, como se observa en el Cuadro 4, la zeína gamma aumenta durante la recuperación del endospermo duro [no se muestran datos].) Los alelos benéficos de los loci modificadores que controlan la producción de zeína gamma pueden ser seleccionados utilizando el método de la mesa de luz, rápido y de bajo costo, descrito en detalle en la Sección 4.1.1.

Cuadro 5. Los niveles de lisina y triptófano como porcentajes de la proteína total en harina de grano integral de maíz normal y maíz *o2o2*.

	Maíz normal	Maíz <i>o2o2</i>
Lisina ^a	1.6-2.6 (media: 2.0)	2.7-4.5 (media: 4.0)
Triptófano ^b	0.2-0.6 (media: 0.4)	0.5-1.1 (media: 0.8)

^a Moro et al. (1996).

^b Sub-programa de maíz tropical de tierras bajas del CIMMYT.



Figura 3. Mazorcas *o2* de endospermo suave que presentan cuarteaduras del pericarpio.

El término maíz con calidad de proteína (QPM) en adelante se usará para referirse al maíz que presenta:

- el gene *o2* en estado homocigoto recesivo (*o2o2*),
- altos niveles de lisina y triptófano, y
- endospermo lo suficientemente duro para asegurar que las mazorcas tendrán características aceptables (Figura 4).

El maíz QPM tiene la apariencia de maíz común y sólo se puede diferenciar de éste mediante ensayos bioquímicos en el laboratorio (ver las Secciones 4.1.2 y 11.2).



Figura 4. Mazorcas de maíz *o2* con endospermo suave del Pool 25, ciclo 0 (izquierda), y mazorcas de la versión mejorada (ciclo 18) (derecha).

Nota: Tanto el ciclo 0 como el 18 presentan altos niveles de lisina y triptófano. Sin embargo, el ciclo 18 es considerado QPM porque también presenta buenas características de grano.

4. Ciencia: Mejoramiento de maíz con calidad de proteína

El procedimiento para generar germoplasma de maíz QPM es relativamente breve. En vista del creciente interés que está suscitando el QPM, los programas de mejoramiento deberían comenzar la conversión³ a QPM de sus líneas endogámicas (o puras) elite y variedades de polinización libre (VPL) que no son QPM, ya sea mediante retrocruzas o cruza genealógicas entre germoplasma elite no-QPM y donadores QPM elite. Una vez que el programa genotécnico cuenta con germoplasma QPM elite, puede comenzar a reciclar dicho germoplasma con otro germoplasma del mismo tipo que provenga del programa mismo o de otros (es decir, usar cruza entre QPM elite y QPM elite).

Con cualquiera de los métodos genotécnicos descritos anteriormente, existen dos maneras de mejorar el maíz QPM, ya sea utilizando un enfoque convencional o marcadores moleculares (de ahora en adelante, denominado el método molecular) para ayudar a hacer la selección del *o2*. El método principal que se describe en este manual es el convencional; la aplicación del método molecular se examina brevemente hacia el final de esta obra (Sección 8.1).

No importa el método genotécnico que se utilice, hay dos pasos distintivos (es decir, que son diferentes de los pasos que se siguen al mejorar otras características del maíz) y esenciales para generar germoplasma QPM:

- Identificación de líneas segregantes de una familia o población que tienen el alelo *o2* en el estado homocigoto recesivo (*o2o2*) y el endospermo duro (identificados al mismo tiempo). El método convencional requiere el uso de una mesa de luz (ver la Sección 4.1.1.1). Con el método molecular, se analizan muestras foliares de plantas que podrían portar el alelo, utilizando marcadores para identificar el genotipo *o2o2*; sin embargo, al igual que en el método convencional, se necesita una mesa de luz para distinguir los tipos con endospermo duro de los genotipos *o2o2*.
- Identificación y confirmación de la calidad QPM (porcentaje de triptófano y proteína en la muestra) por medio de análisis de laboratorio (Secciones 4.1.2 y 11.2).

Al igual que en todos los programas genotécnicos, se requieren elementos como germoplasma fuente elite, donadores y probadores para mejorar el QPM. La anterior exposición del procedimiento se resume en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Métodos, componentes, pasos y herramientas utilizados en el mejoramiento de QPM.

	Métodos	
	Convencionales	Moleculares
Métodos genotécnicos	Conversión de maíz no QPM a maíz QPM utilizando retrocruzas Método genealógico cruzando no-QPM con QPM Método genealógico cruzando QPM con QPM	
Componentes	Germoplasma no-QPM elite Buenos donadores QPM Buenos probadores de la capacidad combinatoria	Marcadores moleculares
Primer paso	Identificación del <i>o2o2</i> (determinación cualitativa) y endospermo duro	
Herramientas	Mesa de luz	Marcadores moleculares y mesa de luz
Segundo paso	Determinación de cantidades de lisina, triptófano y proteína (determinación cuantitativa)	
Herramientas	Laboratorio bioquímico	

Las siguientes secciones están ordenadas de abajo para arriba, como sigue:

- Primero se describen las herramientas utilizadas en cada uno de los dos pasos distintivos del mejoramiento de QPM. Es necesario entender estas herramientas para seguir estos dos pasos.
- A continuación se describen los componentes del mejoramiento de QPM. Si se está familiarizado con las herramientas y los pasos, esto ayuda a entender los componentes.
- Por último, damos una descripción detallada de los protocolos utilizados en los distintos métodos genotécnicos (principalmente, retrocruzamiento y mejoramiento genealógico), incluyendo todos los pasos del mejoramiento de QPM con el uso apropiado de los componentes. Cabe señalar que los métodos de mejoramiento de poblaciones, que utilizan poblaciones establecidas, no se incluyen en este manual.

³ El procedimiento de transferir (ya sea mediante las retrocruzas o por los métodos genealógicos) el gene *o2*, los modificadores de aminoácidos y los modificadores del grano a germoplasma de maíz normal, suele denominarse conversión.

4.1 Herramientas utilizadas en el mejoramiento del QPM

4.1.1 Mesa de luz

4.1.1.1 ¿Qué es una mesa de luz?

- Una caja hecha a la medida que se utiliza para distinguir los tipos de maíz con endospermo duro de los genotipos *o2o2* suaves.
- Generalmente los lados de la caja están hechos de madera, pero no la tapa, que está hecha de vidrio o plástico semi-transparente.
- Dentro de la caja, hay una lámpara con uno o dos focos fluorescentes (o de otro tipo) que se conecta a una fuente de electricidad. Para observar las características de los granos, colóquelos sobre la mesa y prenda la luz.
- El tamaño de la mesa de luz puede variar:
 - a) El tamaño mínimo es de 27.5 cm de largo, 15 cm de ancho y 7.5 cm de alto (Figuras 5 y 6);
 - b) Pero normalmente mide 72 cm de largo, 63 cm de ancho y 11 cm de alto. La tapa de plástico o vidrio debe tener 3 mm de espesor (Figuras 7 a 12).
- En dos lados opuestos de la caja hay dos agujeros para permitir una ventilación adecuada y evitar el sobre-calentamiento.
- Una mesa tipo (a) (Figuras 5 y 6) generalmente lleva un foco fluorescente de 9 vatios (o más). Una de tipo (b) (Figuras 9 y 10) requiere tres focos fluorescentes de 18 vatios.

4.1.1.2 ¿Cómo se opera una mesa de luz?

- Conecte la mesa a una fuente de electricidad y préndala.
- Coloque los granos sobre el vidrio o plástico con el embrión hacia abajo (Figuras 13 y 14).



Figura 5. Vista superior de una mesa de luz tipo (a).

Diseñada por el Instituto de Investigación de Cultivos, Kumasi, Ghana.

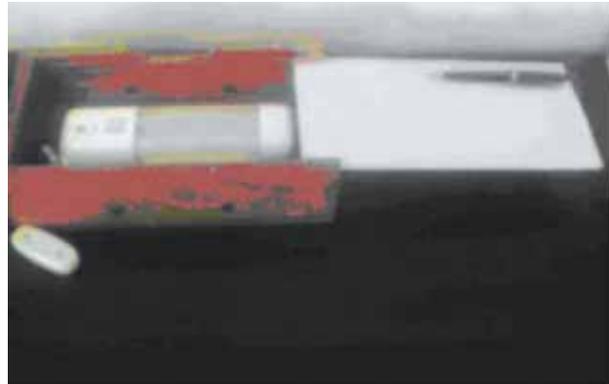


Figura 6. Mesa de luz de tipo (a) donde se muestra el foco en su interior.

Diseñada por el Instituto de Investigación de Cultivos, Kumasi, Ghana.



Figura 7. Vista frontal de una mesa de luz de tipo (b).



Figura 8. Vista trasera de una mesa de luz de tipo (b).



Figura 9. Colocación de los focos en una mesa de luz de tipo (b).

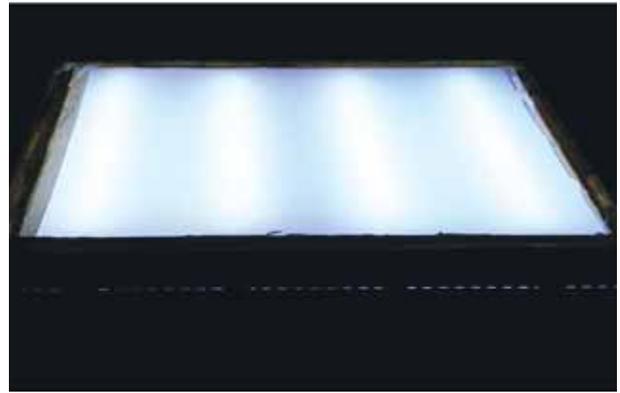


Figura 12. Mesa de luz iluminada.



Figura 10. Mesa de luz de tipo (b) con la tapa abierta.



Figura 13. Selección de granos de maíz en una mesa de luz.



Figura 11. Vista lateral de una mesa de luz de tipo (b) con la tapa abierta.



Figura 14. Granos de maíz sobre una mesa de luz.

4.1.1.3 ¿Qué se busca seleccionar en una mesa de luz?

Un grado adecuado de opacidad (o modificación) en el grano (Figura 16, Sección 4.1.1.5).

4.1.1.4 ¿Cuál es el principio en que se funda la selección en mesa de luz –es decir, por qué se utiliza?

La selección utilizando una mesa de luz se basa en el principio que los genotipos *o2o2* portan una característica indeseable, grano suave, que en la mesa se ve completamente opaco. Debido a la segregación de genes que confieren dureza (o suavidad) al endospermo (ver modificadores en la Sección 3.3), en las generaciones segregantes éste expresa varios grados de dureza o suavidad (es decir, varios niveles de opacidad se observan en la mesa de luz; Figuras 15 y 16, Sección 4.1.1.5). Un grano con genotipo *O2o2* ó *O2O2* es normal, es decir que no es suave ni presenta las características de grano indeseables que se asocian con el genotipo *o2o2* y, por lo tanto, es traslúcido. Si dichas características están ausentes, la acción contraria de los modificadores, aunque estos estén presentes, no es visible y, por lo tanto, no tiene importancia.

La mesa de luz se utiliza para seleccionar granos que portan el genotipo *o2o2* empleando el grado de opacidad como medida indirecta o característica secundaria de ese genotipo. Nótese que los genotipos *O2o2* ó *O2O2* pueden mostrar un grado insignificante de suavidad.

4.1.1.5 ¿Cómo se determina el grado de modificación y qué significa el puntaje de modificación?

Se utiliza una escala del 1 al 5 para evaluar el grado de opacidad del grano; esto permite dar descripciones claras de las distintas clases de modificación y facilita el análisis estadístico. El porcentaje de opacidad se evalúa en forma visual, como se ilustra en la Figura 16.

Tipo (puntaje de modificación) 1: No es opaco
Tipo (puntaje de modificación) 2: opaco al 25%
Tipo (puntaje de modificación) 3: opaco al 50%
Tipo (puntaje de modificación) 4: opaco al 75%
Tipo (puntaje de modificación) 5: opaco al 100%

Un menor grado de opacidad indica una mayor acción de los modificadores.

Los tipos 1 a 3 se pueden considerar QPM, siempre y cuando se verifique su calidad de proteína.

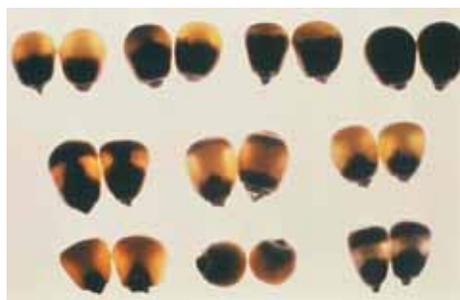


Figura 15. Granos de maíz que portan el gene *o2* colocados con el embrión hacia abajo en la mesa de luz. La opacidad de los granos varía, indicando distintos grados de modificación del endospermo.

(Nótese que la opacidad no siempre progresa ordenadamente desde la parte superior del grano hasta la base; esto se debe a que hay distintos genes modificadores que convierten el endospermo suave en duro.)

- Es esencial identificar el genotipo *o2o2* en las generaciones tempranas en el desarrollo de líneas puras.
- Resulta indispensable utilizar la mesa de luz para identificar aquellos granos que portan el gene *o2o2* en estado homocigoto recesivo.
- Es preferible usar la mesa de luz a los marcadores moleculares o los análisis de laboratorio, puesto que resulta más rápido y económico, especialmente cuando es necesario seleccionar cientos o miles de genotipos de las poblaciones segregantes.
- El grado de modificación es casi (pero no completamente) independiente de la calidad de proteína. Por lo tanto, la mesa de luz no puede sustituir los análisis de laboratorio que se llevan a cabo en las últimas etapas del mejoramiento con el objeto de confirmar el contenido de lisina y triptófano.



Figura 16. Granos de maíz en una mesa de luz, ordenados según el grado de modificación.

4.1.1.6 ¿Cuándo se utiliza la mesa de luz?

Si se aplica el mejoramiento convencional, se lleva a cabo la selección con mesa de luz en todas las generaciones segregantes. Resulta particularmente importante utilizarla en las generaciones tempranas (de F2 a F6) durante la creación de líneas puras.

4.1.1.7 ¿Cuál escala se debe seleccionar?

- En la generación F2, se selecciona el puntaje de modificación 3.
- En las dos siguientes generaciones (F3 y F4), se selecciona el puntaje de modificación 2 ó 3.
- En las otras generaciones avanzadas, se selecciona el puntaje de modificación 2.

4.1.1.8 El hecho de que se seleccione un puntaje de modificación particular en las generaciones tempranas, ¿significa que el genotipo ya ha sido fijado?

Los modificadores son, en realidad, un juego de genes menores. Por lo tanto, los granos seleccionados por ser de tipo 3 en una generación temprana (por ejemplo, la F2) seguramente producirán una

gran diversidad de tipos de grano en la siguiente generación como consecuencia de la segregación de genes menores. El grado de homocigocidad incrementa con cada generación endogámica. Cada vez que la modificación de tipo 2 es seleccionada, se avanza hacia la fijación de este grado de modificación en el grano. Lo ideal es que las líneas puras QPM elite tengan los modificadores fijos con un puntaje de 2, pero no es raro encontrar líneas puras elite con un puntaje de 3.

4.1.1.9 ¿Por qué no se deben seleccionar los tipos 1, 4 y 5? o ¿por qué sólo se deben seleccionar los tipos 2 y 3?

Los granos de **tipo 1** son completamente traslúcidos, sin opacidad. Es posible que porten el gene *o2* en estado homocigoto recesivo (*o2o2*) y que los modificadores hayan vuelto el endospermo completamente duro (lo cual es deseable). Sin embargo, también es posible que estos granos sean heterocigotos (*O2o2*) u homocigotos dominantes (*O2O2*), en cuyo caso, tienen bajos niveles de lisina y triptófano, y la dureza (modificación) del endospermo no es importante, ya que la suavidad inducida por el *o2o2* sencillamente no está presente (ver el principio básico de la selección con mesa de luz en la Sección 4.1.1.4). La única forma de establecer el estado alélico de los granos de tipo 1 (aparte de usar marcadores moleculares) es realizar un análisis de triptófano en el laboratorio. Sin embargo, este procedimiento es costoso y poco práctico cuando se trata de seleccionar grandes números de segregantes. Por lo tanto, no se recomienda seleccionar los granos de este tipo.

Es casi seguro que el *o2o2* está presente en los granos de **tipo 2**; sin embargo, existe la posibilidad de que un grano de tipo 1 haya sido clasificado como de tipo 2 por error. Por otra parte, también es posible que un genotipo *O2o2* ó *O2O2* presente un grado bajo de opacidad. Por lo tanto, no se recomienda seleccionar granos de tipo 2 en las generaciones tempranas, ya que la prioridad es garantizar la presencia de *o2o2* en dichas generaciones.

En los granos de **tipo 3**, la presencia del *o2o2* está garantizada. Se recomienda seleccionar este tipo de grano en generaciones tempranas, puesto que

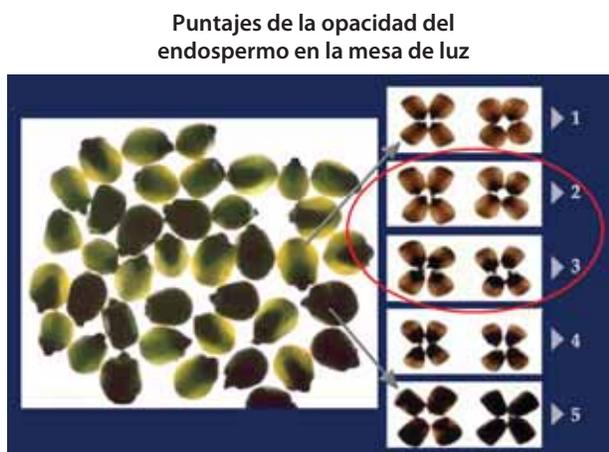


Figura 17. Granos de maíz en una mesa de luz (izquierda) y las clases de modificación en semilla F2 que desciende de maíz normal cruzado con un donador QPM.

Fuente: Adaptado de Krivanek y Vivek (2006).

reúne la presencia del *o2o2* (una prioridad mayor) y una buena modificación (que puede ser mejorada en generaciones subsecuentes; ver la Sección 4.1.1.8).

En los granos de **tipo 4**, la presencia del *o2o2* está garantizada, pero cuando se selecciona este tipo, la probabilidad de obtener granos con buena modificación en las generaciones subsecuentes es mucho menor que si se seleccionan los tipos 2 y 3.

Los granos de **tipo 5** son completamente opacos, al igual que el mutante *o2* original. Estos granos tienen un endospermo muy suave y ningún modificador, lo cual produce características indeseadas como la susceptibilidad a la pudrición de la mazorca, los gorgojos y las cuarteaduras.

4.1.1.10 ¿Es necesario seleccionar todas las generaciones en la mesa de luz?

Sí.

4.1.1.11 ¿En qué momento se deben enviar las muestras al laboratorio para el análisis de triptófano?

Se envían las muestras al laboratorio cuando el puntaje de modificación de la mayoría de los granos es 2. Lo usual es realizar el primer análisis de triptófano en la generación F3 o F4 (antes de la primera cruza testigo).

4.1.1.12 ¿Cuáles son los pasos que se siguen para seleccionar de manera eficaz los modificadores del endospermo del locus *o2* en la generación F2?

(Nota: Los tres pasos asentados a continuación están dirigidos a las personas con menos experiencia en la selección del QPM. Se recomienda seguirlos sólo para asegurar que se han seleccionados las clases de modificación deseadas. A medida que se adquiere experiencia con el QPM, se pueden seleccionar las clases de modificación deseadas directamente de lotes de maíz QPM cosechado y desgranado.)

Primer paso: De cada población F2, sólo seleccione las mazorcas que están segregando para los modificadores del endospermo (como las mazorcas en el círculo inferior izquierdo en la Figura 18). Deseche aquéllas que no muestran segregación. En otras palabras, las mazorcas seleccionadas deben presentar algunos granos opacos (granos opacos suaves y densos visibles en el olote). En mazorcas con buena frecuencia de modificadores, alrededor del 5% de los granos muestra una opacidad suave completa (es decir que estos granos recibirían un puntaje de 5).

Segundo paso:

- Desgrane en forma individual cada mazorca en segregación y separe todos los granos que muestren algún grado de modificación (es decir, un puntaje de modificación entre 2 y 5).
- Cunte los granos modificados y compárelos con el número de granos normales. Los granos totalmente modificados (normales) deben constituir alrededor del 75% de todos los granos, y los que presentan los tipos 2 a 5 de modificación deben alcanzar el 25%.
- Si los granos modificados suman en total más del 25% esperado, revise el lote seleccionado una vez más y separe los granos normales. Si los granos modificados representan menos del 25%, revise una vez más los granos que parecen normales y escoja los modificados hasta alcanzar una proporción aproximada de 3:1. Este paso ayuda a afinar la selección y evitar errores.



Figura 18. Ejemplo de mazorcas F2 segregando para la modificación del endospermo (los granos totalmente blancos son completamente opacos).

Tercer paso: Del 25% de granos modificados, seleccione granos bien modificados con un puntaje de 3. En las generaciones avanzadas, escoja granos con un puntaje de 2.

4.1.2 Laboratorio de calidad de proteína

En general, las muestras se envían al laboratorio para que se les analice el contenido de proteína y triptófano en la etapa F3 o F4. En esta sección se da una introducción a esos análisis y, en la Sección 11.2, se presentan en detalle los protocolos de laboratorio que se usan en el análisis de proteína y triptófano.

Los materiales QPM presentan incrementos de las concentraciones tanto de lisina como de triptófano. Estos incrementos deben ser monitoreados durante el mejoramiento; sin embargo, sólo el triptófano es analizado regularmente debido a que los valores de lisina (Lis) y triptófano (Trp) están altamente correlacionados. Lo normal es que el valor de lisina sea cuatro veces mayor que el de triptófano. Como consecuencia de la bien establecida relación entre estos aminoácidos en la proteína de endospermo del maíz *opaco-2* (Hernández y Bates, 1969; Villegas et al., 1992), el triptófano puede servir como el parámetro común para evaluar la calidad nutritiva de la proteína. Como se ilustra en la Figura 20, en años recientes se ha encontrado una alta correlación entre la lisina y el triptófano (H. Córdova y A. Krivanek, 2006, com. pers.), lo cual confirma que es innecesario analizar ambos aminoácidos.



Figura 19. Granos de maíz en una mesa de luz, separados según sus puntajes de modificación.

Tratar de analizar el contenido de lisina tiene la desventaja de que la reacción colorimétrica que forma parte de la evaluación de lisina en grano de maíz (Tsai et al., 1972) toma mucho tiempo y su reproducibilidad es afectada por numerosos factores, lo cual dificulta su uso para analizar grandes números de muestras; por ende, no se recomienda usar el análisis de lisina en un programa genotécnico práctico.

El análisis de laboratorio requiere de muestras que contengan entre 20 y 30 granos cada una (ver la Sección 7). El análisis se puede realizar con granos enteros o con sólo el endospermo. El contenido de lisina y triptófano del endospermo de maíz suele ser deficiente, en tanto que el germen tiene una composición de aminoácidos bastante constante y bien balanceada, sin importar cual sea su genealogía. Se presenta en el Cuadro 7 una comparación de estos dos tipos de análisis.

En la Sección 11.2 se detallan los protocolos de laboratorio utilizados en los análisis de proteína y triptófano. El método HPLC utilizado en la determinación de lisina (Huang et al., 2006) es el método más confiable, pero también el más costoso. Si fuera necesario analizar el contenido de lisina de las muestras, habría que mandarlos a hacer en un laboratorio de buena reputación.

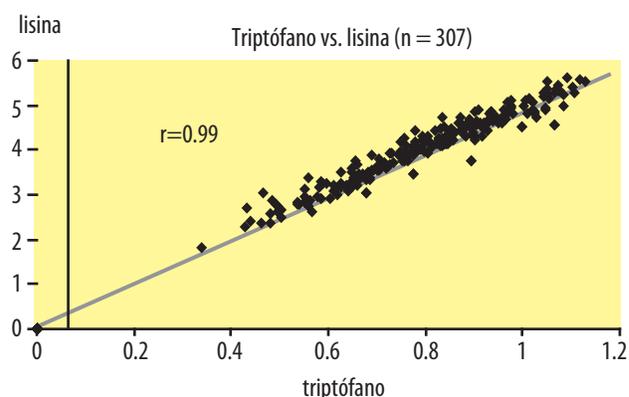


Figura 20. Correlación entre el contenido de lisina y de triptófano en 307 muestras de germoplasma de maíz tropical.

Fuente: H. Córdova y A. Krivanek (2006, com. pers.).

Cuadro 7. Análisis de laboratorio del endospermo comparado con el de grano entero.

Análisis del endospermo	Análisis de grano entero
Se retiran el pericarpio y el embrión antes de moler el grano, por lo que esto toma más tiempo y requiere más recursos (Cuadro 8).	El grano se muele entero, por lo que esto toma menos tiempo y requiere menos recursos (Cuadro 8).
Los valores estimados de triptófano, proteína y lisina son más bajos.	Los valores estimados de triptófano, proteína y lisina son un poco más altos.
Su uso resulta ideal en germoplasma elite y productos finales.	Su uso resulta ideal en las generaciones segregantes.

Cuadro 8. Costos usuales de los análisis de laboratorio.

Análisis	Costo (en EUA\$ por muestra)	
	Grano entero	Endospermo
Preparación de muestras	2.2	3.8
Nitrógeno	3.3	
Triptófano	2.5	
Lisina	2.9	

- Notas:**
- Los costos pueden variar según el laboratorio.
 - Con el método colorimétrico, normalmente dos personas pueden analizar el contenido de triptófano de 160 muestras duplicadas en un día.

4.2 Interpretación de los resultados de laboratorio

Los valores de proteína y triptófano que se obtienen del laboratorio se refieren a cierto número de muestras y se expresan en porcentajes. Si el valor correspondiente al triptófano es del 0.08%, esto se refiere a la cantidad de triptófano presente en esas muestras y NO al porcentaje del mismo en la proteína.

4.2.1 Índice de calidad (IC)

El índice de calidad representa la proporción de triptófano a proteína presente en la muestra, expresada en un porcentaje. Por ejemplo:

- Si el triptófano presente en la muestra = 0.08%
- y la proteína en la muestra = 10%,
- entonces el IC = $100 * 0.08/10$, lo cual = 0.8

4.2.2 La relación entre el IC, la cantidad de proteína y la calidad de proteína

Debido a la relación descrita en la Sección 4.2.1, existe una correlación negativa entre

- la calidad y la cantidad de proteína
- el porcentaje de proteína y el IC

4.2.3 Valores de laboratorio que deben considerarse durante la selección

A estas alturas, resulta obvio que el IC no indica la cantidad de proteína. Por lo tanto, al interpretar los resultados de laboratorio como base para hacer la selección, hay que estar seguro que los valores de proteína, de triptófano y el IC superan los límites aceptables descritos en el Cuadro 9.

4.2.4 En conclusión

- El análisis de grano de entero se realiza en generaciones segregantes tempranas, y el de endospermo, en germoplasma elite y productos finales.
- Existe una correlación entre los valores de lisina y triptófano. Por eso, se analiza (aunque no es necesario) la lisina en el producto final sólo si los valores de triptófano son aceptables.
- No existen valores absolutos que “definen” el QPM.
- Siempre compare los valores del QPM con los de los testigos de maíz normal.
- Estudie la aptitud combinatoria y las características agronómicas (Sección 4.4.3).
- Seleccione lo mejor que tenga y sea muy exigente.

Cuadro 9. Guía rápida para interpretar los resultados de laboratorio.

(Todos los valores se dan en %)		QPM	Maíz normal
En proteína	Proteína	>= 8	>= 8
	Lisina	4	2
	Triptófano	>0.65	<0.60
		Grano entero	Endospermo
En la muestra	Triptófano	>0.075	>0.070
	Índice de calidad	>0.8	>0.7

4.3 Problemas que surgen en el análisis de laboratorio del triptófano en el QPM (descritos en la Sección 11.2.3)

4.3.1 Breve resumen del análisis de triptófano

El procedimiento para analizar el porcentaje de triptófano en una muestra de QPM es el siguiente:

- 1 Se puede moler el grano entero o sólo el endospermo.
- 2 Desgrase las muestras molidas con un aparato Kjeldahl.
- 3 Agregue papaína (una enzima) para hidrolizar (es decir, cortar) las proteínas.
- 4 Agregue una mezcla de ácido acético glacial y H_2SO_4 (ácido sulfúrico) para inducir el desarrollo de color (a morado) en la muestra.
- 5 Mida la intensidad del color con un espectrofotómetro a 560 nm. Una mayor intensidad de color indica una mayor cantidad de triptófano. Se utiliza una fórmula para convertir el resultado del espectrofotómetro al porcentaje de triptófano en la muestra.

El paso más crítico y demandante de este procedimiento es el desarrollo de color. Un buen desarrollo de color se debe a las siguientes reacciones químicas.

ácido acético + cloruro férrico \rightarrow ácido glioxílico

ácido glioxílico + ácido sulfúrico + triptófano (en la muestra) \rightarrow color (detectable a 560 nm)

4.3.2 El problema

Como consecuencia de las reacciones químicas, el ácido acético normalmente contiene ácido glioxílico, que puede considerarse una impureza. Sin embargo, en este caso, la impureza (es decir, el ácido glioxílico) reacciona con el triptófano de la muestra y garantiza el desarrollo de color. Por lo tanto, aquí la “impureza” es deseada.

Cabe señalar que la cantidad de “impureza” presente en un lote de ácido acético no es controlada y, por lo tanto, distintos lotes de ácido acético no producen la misma intensidad de color (absorbancia con un espectrofotómetro) con una cantidad dada de triptófano (o con la misma muestra). Por ende, hay que probar el desarrollo de color con diferentes lotes de ácido acético para poder decidir cuál lote usar en el análisis.

En resumen, un deficiente desarrollo de color debido a los distintos grados de “impureza” presentes en el ácido acético causa problemas en los análisis de triptófano. Los laboratorios más importantes, como el del CIMMYT o del IITA, han superado este problema mediante:

- la compra de pequeñas cantidades de diferentes lotes de ácido acético para probarlas y ver si producen un desarrollo de color adecuado;
- una vez que se identifica un lote adecuado del ácido, se compran cantidades más grandes (suficiente para realizar análisis durante por lo menos un año) del mismo lote.

Empero, esta solución no es viable en todos los laboratorios, especialmente los localizados en África, debido a:

- la falta de personal bien calificado y
- los aspectos logísticos de pedir y probar muchos lotes de ácido acético y, luego, volver a pedir el lote correcto. Esto implica muchas consideraciones no técnicas como, por ejemplo, la posibilidad de obtener ácido acético en la localidad, su importación a través de fronteras internacionales, los reglamentos aduanales, tiempo y dinero.

El problema de tener que probar distintos lotes de ácido acético es la principal razón por la cual en el CIMMYT se está validando otro método para determinar el triptófano (Nurit et al., 2007, en preparación). Si desea más detalles, por favor comuníquese con Natalia Palacios (n.palacios@cgiar.org).

4.4 Componentes del mejoramiento del QPM

4.4.1 Germoplasma fuente elite⁴

El mejoramiento o reciclado genealógico es un procedimiento utilizado para derivar, extraer y generar líneas puras mediante el uso de cruza entre líneas elite (y/o VPL elite) como germoplasma fuente. El retrocruzamiento es un término más específico que se refiere al proceso de mejorar una característica específica (por ejemplo, una línea de maíz normal se mejora para convertirla en QPM) de una línea elite al mismo tiempo que se mantiene, en gran parte, su genealogía original.

La decisión respecto a cuál cruza realizar durante el reciclado o retrocruzamiento debe tomarse de manera cuidadosa y bien informada, ya que determinará el perfil del producto, la razón costo:beneficio y, por lo tanto, el buen resultado final que el programa genotécnico logrará años después.

- i. En un programa de mejoramiento genealógico, el avance genético dependerá del grado de superioridad del germoplasma fuente. El uso del mejor germoplasma elite en un proyecto dado garantiza que se logrará el mayor avance genético posible. De todas las líneas avanzadas que se tienen en un programa genotécnico, sólo se deben usar aquellas pocas que han probado ser las mejores (tanto desde el punto de vista agronómico como de la aptitud combinatoria) para iniciar un proyecto de mejoramiento genealógico. En el caso del QPM, esto garantiza que los genotipos que resulten tendrán toda, o parte, de la configuración genealógica del germoplasma donador.
- ii. Es preciso asegurar que las dos líneas utilizadas en una cruza compensen mutuamente sus deficiencias en el híbrido generado (en adelante denominado el híbrido fuente), puesto que éste será sometido a la endogamia durante el proceso de generar líneas puras. En otras palabras, los progenitores utilizados en una cruza deben complementarse. Por ejemplo, una línea pura puede no tener una característica

específica (resistencia a una enfermedad o, en este caso, los componentes QPM), pero el híbrido fuente tiene que poseer la gama completa de las características deseadas. Como este híbrido es sometido a la endogamia durante varias generaciones de autofecundación, se van escogiendo las líneas segregantes deseadas.

- iii. Lo ideal es que las líneas utilizadas en una cruza pertenezcan al mismo grupo heterótico (cuando éste se conoce). Si las líneas puras se derivan de cruza entre líneas del mismo grupo heterótico, esto aumenta las probabilidades de que las líneas resultantes muestren el máximo grado de heterosis cuando ellas, a su vez, sean cruzadas con líneas creadas de manera semejante, pero a partir del grupo heterótico opuesto. Si los grupos heteróticos no se conocen o no se identifican de manera clara, se pueden hacer, sin violar los incisos (i) y (ii), cruza entre fuentes de germoplasma a fin de generar el híbrido fuente (más tarde es posible que se establezca que la cruza es heterótica, es decir, que las líneas pertenecen a grupos heteróticos opuestos).

Los problemas que surgen en la generación de QPM serán evidentes en las secciones siguientes; por lo tanto, a fin de aumentar las probabilidades de éxito, los proyectos deben comenzar con un mínimo de cinco líneas elite (líneas puras o VPL), cuando existe un gran número de éstas.

4.4.2 Donadores QPM

La elección de un donador QPM tiene la misma importancia que la elección de las líneas recurrentes (receptoras) y, a veces, aun mayor, puesto que los donadores tienden a emplearse repetidamente para iniciar los proyectos genealógicos de un programa genotécnico. Si se elige un donador deficiente, esto podría ocasionar un gasto excesivo o el desperdicio de recursos.

En un programa de maíz normal, un donador es una línea elite que posee una característica que compensa alguna deficiencia de la línea recurrente. Incluso en un programa QPM, la línea QPM o VPL que se escoge como donadora para un proyecto de

⁴ El germoplasma elite representa el mejor germoplasma de un programa genotécnico, pues tiene un comportamiento agronómico probado, buena aptitud combinatoria y resistencia o tolerancia a factores adversos bióticos y abióticos.

conversión es generalmente la más elite, pero con un requerimiento adicional: debe conferir buena modificación del endospermo a las líneas recurrentes. Este aspecto puede parecer contrario a la intuición, dado que una línea (o VPL), por el hecho de ser elite, tiene que poseer buenos modificadores y la capacidad de heredárselos a sus descendientes. El procedimiento funciona como sigue:

- El gene *o2* es un gene simple recesivo y, como tal, muy fácil de transferir a cualquier germoplasma. Cuando se cruza una línea portadora del *o2* con un donador QPM, esto da como resultado la F1; gracias a la autofecundación subsecuente de la F1, se generan segregantes para el locus *o2* en una proporción de 1:2:1 (Figura 2). Sin embargo, la transferencia de los modificadores de la textura del grano es más difícil porque en ella participan muchos genes menores. Los mejoradores han encontrado que algunas líneas puras son fáciles de convertir a QPM (es decir, es fácil transferirles el gene *o2* y sus modificadores de aminoácidos y grano) y otras no. Según ellos, el mayor problema radica en la transferencia de los modificadores de la dureza del grano (ver la Sección 3.3) y, en menor grado, de los modificadores de aminoácidos (Sección 3.2) (a pesar de que estos últimos son conjuntos de muchos genes menores).
- Aunque los investigadores apenas están comenzando a estudiar esta dificultad de la conversión, es lógico suponer que la composición genética del receptor o del donador, o ambos, podría ser la causa del problema. Es necesaria una gran prudencia al escoger un donador QPM, porque será utilizado repetidamente y lo más probable es que sea mejor caracterizado que el resto del germoplasma elite.

Aunque una línea QPM sea elite y posea buena calidad de proteína, puede no ser la mejor opción como donadora.

La capacidad de una línea QPM, una vez convertida, de funcionar como donadora en proyectos subsecuentes se evalúa según la dificultad con que se convirtió a QPM. Cuando se utilizan como donadoras de QPM, las líneas puras (o VPL) que fueron convertidas a QPM con facilidad, transfieren sus modificadores con más facilidad que las líneas o VPL que fueron difíciles de convertir. Por ende, es posible que las nuevas líneas QPM (o VPL) muestren grados variables de la capacidad "donadora", desde excelente o buena hasta deficiente.

Existe otro tipo de estudio más sistemático de los donadores, en el que se cruza una serie de líneas (o VPL) QPM elite (que muestren buena aptitud combinatoria y buena calidad de proteína) con líneas recurrentes no QPM utilizando el Diseño II de Carolina del Norte. En este sistema, los híbridos son autofecundados con el objeto de formar las poblaciones F2. Se compara la proporción de granos de los tipos 1, 2 y 3 (como los que se observan en una mesa de luz en las Secciones 4.1.1.5 y 4.1.1) presentes en las poblaciones F2 derivadas de cruza entre un donador dado y todas las líneas recurrentes no QPM, con la proporción presente en las poblaciones F2 generadas mediante cruza entre otros donadores QPM y las mismas líneas recurrentes no QPM. Un buen donador es aquel que presenta un porcentaje combinado alto (cerca del 90%) de puntajes de modificación 1, 2 ó 3, cuando se le cruza con una gama de líneas recurrentes.

La realización del procedimiento antes descrito, con el objeto de diferenciar las líneas donadoras buenas de las malas cada vez que se generan nuevas líneas elite, no debe convertirse en un ejercicio académico en los programas genotécnicos, a menos que ése sea el objetivo específico. Más bien, desde un punto de vista práctico, este ejercicio debe ser un paso (determinado sistemáticamente) en los proyectos genealógicos dirigidos a crear líneas puras. El procedimiento completo incluye los siguientes pasos:

- 1 Cruce una serie de líneas recurrentes elite con otra de donadoras cuya aptitud donadora se desconoce.
- 2 Estudie las poblaciones F2 para detectar la modificación, como se mostró arriba.
- 3 Identifique las donadoras buenas y las malas.
- 4 Al mismo tiempo, identifique las líneas F2 con alta frecuencia de modificadores y clasifíquelas según el tipo de donadora (excelente, buena, regular, deficiente).
- 5 Continúe la endocria de F2 selectas que poseen una alta frecuencia de modificadores. En ese momento, es posible que haya algunas F2 con alta frecuencia de modificadores, pero que descienden de cruza entre líneas que han sido identificadas como malas donadoras. En otras palabras, las malas

donadoras pueden generar una alta frecuencia de modificación con ciertas líneas recurrentes específicas, quizá debido a la contribución de la línea recurrente a los genes de modificación. Continuar con la endocria de este tipo de cruza F2 específicas.

Sin embargo, no utilice las líneas que han sido identificadas como malas donadoras para iniciar otros proyectos de conversión. Sólo se deben usar buenas donadoras para comenzar nuevos proyectos; a la larga, la serie actual de donadoras será remplazada por líneas puras más nuevas que han sido identificadas como buenas donadoras utilizando el procedimiento arriba descrito. Debido a las impredecibles incompatibilidades específicas que pueden existir entre las donadoras y las receptoras, siempre es preferible cruzar algunas donadoras buenas con varias líneas recurrentes al iniciar proyectos genealógicos.

Es importante reiterar que una donadora no sólo debe tener buena capacidad de modificar el fenotipo del grano, sino también ser “elite” en todos los aspectos.

Con base en los procedimientos arriba descritos, se clasificaron varias líneas QPM en los siguientes cuatro grupos:

- Grupo 1 = Donadoras excelentes: CML144, CML181f, CML176, CML150, CL-RCWQ83, CML491. Éstas funcionan bien con la mayoría de las líneas.
- Grupo 2 = Buenas donadoras: CML173, CML154, CML175.
- Grupo 3 = Donadoras regulares: CML181d, CML182.
- Grupo 4 = Donadora deficiente: CML159.

Desde que se realizó esta clasificación, se han creado en el CIMMYT varias líneas nuevas, algunas derivadas de donadoras buenas (por ejemplo, de la CML176). Estas líneas descienden de buenas donadoras, han sido mejoradas en otros aspectos y son recomendadas para su uso inmediato en programas genotécnicos.

Se debe tener en cuenta que el hecho de que existe diversidad en la naturaleza es lo que hace posible seleccionar lo bueno y descartar lo malo (es decir que, sin diversidad, no sería posible el mejoramiento genético). Gracias a la diversidad, las plantas han sido dotadas, entre otras cosas, de resistencia o tolerancia al estrés biótico y abiótico. Por lo tanto, es indispensable la conservación a largo plazo de la diversidad genética. Hay que tener en mente que el hecho de usar sólo una o unas cuantas líneas QPM como donadoras puede socavar la base genética. Por otro lado, usar donadoras malas sólo para conservar la diversidad disminuye la rapidez del avance genético. Por lo tanto, es fundamental balancear las dos cosas.

4.4.3 Probadores QPM

Todos los programas de generación de híbridos tienen que hacer un gran esfuerzo por elegir un probador apropiado para evaluar la aptitud combinatoria de las líneas segregantes. Un probador puede ser una línea pura, una VPL o un híbrido simple. Un buen probador debe facilitar la discriminación entre genotipos con base en la aptitud combinatoria y otras características deseadas, identificar productos híbridos útiles que se puedan utilizar directamente y ser compatible con un programa de mejoramiento de maíz (Vasal et al., 1997). Al seleccionar los probadores, es necesario tomar en cuenta varios aspectos teóricos y prácticos (Bänziger et al., 2000), como son:

- la amplitud de la base genética del probador;
- si éste debe ser de alto o bajo rendimiento;
- si debe poseer una alta o baja frecuencia de las características deseadas;
- si debe tener buena o mala aptitud combinatoria general;
- cuántos probadores se utilizarán;
- cuántos grupos heteróticos se están manejando, y
- si los probadores deben estar emparentados o no.

En la práctica, un probador de un programa genotécnico suele ser una línea elite, una VPL elite o una cruza simple entre líneas elite del mismo grupo heterótico. Un programa generalmente cuenta con dos grupos heteróticos, como mínimo.

Cabe señalar que dar una explicación de cómo se identifica un probador va más allá de los alcances de este manual. Por lo tanto, recomendamos a los interesados en el tema que consulten libros de texto sobre el mejoramiento de maíz o artículos científicos que traten el tema de la aptitud combinatoria.

Enseguida aparecen varios listados de las consideraciones prácticas que conviene tener en mente al identificar o seleccionar los probadores.

Uso de los grupos heteróticos:

- ✓ Usar por lo menos dos grupos heteróticos, más un probador proveniente de cada grupo.
- ✓ Los grupos heteróticos deben escogerse con cuidado a fin de asegurar la máxima heterosis entre ellos.

Selección de una línea pura o una VPL como probador:

- ✓ Utilice una línea pura o una VPL como probador si el producto final que busca es un híbrido simple o mestizo. Esto hace posible identificar el producto final durante los ensayos de generaciones tempranas.
- ✓ Los probadores deben poseer buenos efectos de aptitud combinatoria general (ACG).
- ✓ El comportamiento per se del probador (su rendimiento, fortaleza del tallo, resistencia a enfermedades) debe ser razonablemente bueno.

Selección de un probador que sea cruce simple:

- ✓ Utilizar un probador que sea cruce simple si el producto final es una cruce trilineal, ya que esto hará posible la identificación de dicho producto durante los ensayos de generaciones tempranas.
- ✓ Las líneas puras que constituyen un probador de cruce simple deben tener buenos efectos de ACG.
- ✓ Las líneas puras que constituyen un probador de cruce simple deben pertenecer al mismo grupo heterótico.
- ✓ El comportamiento per se de las líneas puras que constituyen un probador de cruce simple debe ser razonablemente bueno.
- ✓ La depresión endogámica del probador híbrido debe ser soportable => un probador de cruce simple debe rendir bastante bien para ser apto para usarse como progenitor hembra de híbridos mestizos o dobles.

Una vez identificados los probadores, el germoplasma tiene que ser clasificado por grupo heterótico. En los programas genotécnicos bien establecidos, el germoplasma generalmente ya está debidamente clasificado por grupo heterótico. Los programas nuevos que todavía no han efectuado esta clasificación, deben tratar de hacerla cuando antes.

Durante el proceso de probar la aptitud combinatoria, también es posible clasificar las nuevas líneas puras en grupos heteróticos (cuando éstos no se conocen) o confirmar los patrones heteróticos de las líneas generadas a partir de cruces dentro del mismo grupo heterótico. Por lo general, la aptitud combinatoria se prueba por primera vez en la fase S1 (F3) o S2 (F4). Es usual que los programas genotécnicos hagan cruces de prueba y evalúen cientos de líneas de generación temprana en por lo menos cinco localidades-objetivo. Se selecciona y se avanza entre un 5 y un 20% de las mejores líneas. Para cuando la aptitud combinatoria se prueba por segunda vez, usualmente en la fase S3 (F5) o S4 (F6), las líneas seleccionadas están casi fijas y pueden ser cruzadas con otros probadores para identificar los productos finales. En esta etapa, generalmente se utiliza un número mayor de localidades para ensayar e identificar los híbridos.

Una vez que un híbrido QPM prometedor ha sido identificado siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, es necesario analizar la calidad de proteína del grano producido por este híbrido (puesto que los agricultores lo utilizarán). El grano que se utiliza en el análisis puede provenir de las líneas F1 de un ensayo. Se cubren con bolsas los jilotes de dos o tres plantas de las parcelas elegidas y se efectúa polinización cruzada (apareamiento de hermanos) de planta a planta. Esto simula la polinización cruzada que se da entre las plantas de una población híbrida sembrada en el campo de un productor; la cosecha recogida representa el grano que éste cosecharía. Por último, se recogen muestras del grano producido mediante estas polinizaciones y se envían al laboratorio para que su contenido de triptófano y proteína sea analizado (Sección 11.2).

Recuerde que:

- Los grupos heteróticos son hechos por el hombre (y, por lo tanto, son subjetivos) y que clasificar las líneas puras en grupos heteróticos es un procedimiento en constante evolución.
- Es importante clasificar los materiales en grupos heteróticos, ya que el uso correcto de estos grupos incrementa las probabilidades de éxito. El fitomejoramiento es una mera “lotería” y los grupos heteróticos aumentan la probabilidad de identificar un buen genotipo. Esto, a su vez, determina la rapidez del avance genético y los beneficios generados por la inversión (es decir, los costos de identificar el producto final).
- Todos los programas genotécnicos deben, en el mediano o largo plazo, empezar a clasificar su germoplasma en grupos heteróticos.
- En el corto plazo, la falta de conocimiento del patrón heterótico de una línea dada no debe impedir su utilización, puesto que una línea elite no clasificada puede ser usada en cruza genealógicas con germoplasma elite proveniente de varios grupos heteróticos. Aunque la probabilidad de éxito es menor en tales casos, peor sería no usar este germoplasma para nada.
- Por lo tanto, utilice los grupos heteróticos como herramientas, no como normas restrictivas.

4.5 Métodos para mejorar el QPM

Muchos de los procedimientos descritos en esta sección son, en principio, los mismos que los empleados para mejorar el maíz normal, salvo que los protocolos del mejoramiento del QPM deben, a cada paso, tener por objeto aumentar al máximo la frecuencia de los modificadores. Los protocolos que se presentan enseguida son modificaciones y adaptaciones de los creados en el CIMMYT, según informaron (mediante comunicaciones personales y algunos informes internos del Centro), en distintos momentos, varios científicos del CIMMYT (Córdova, Pixley, Vasal, Vergara).

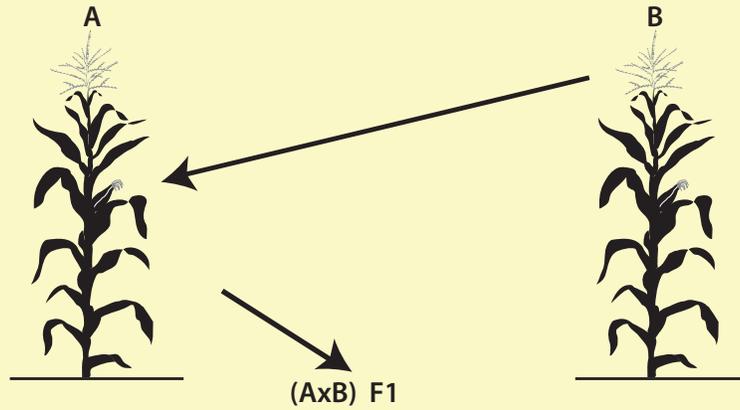
He aquí una ilustración esquemática de la conversión a QPM de una línea de maíz normal, para ayudar al lector a visualizar todo el procedimiento (descrito en los Cuadros 10 y 11).

Diagrama esquemático que ilustra la conversión a QPM de una línea de maíz normal (no QPM), según los protocolos siguientes (adaptados de Vergara y Córdova, del CIMMYT en México, comunicación personal).

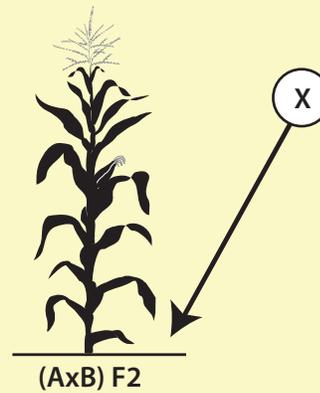
A = progenitor donador de QPM

B = Progenitor recurrente normal (no QPM)

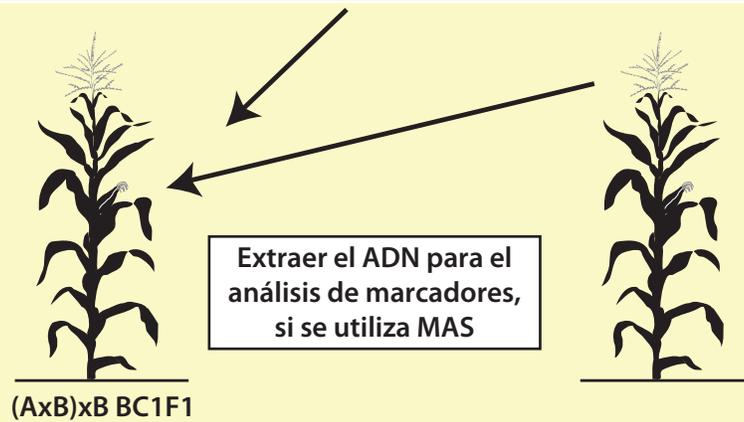
Ciclo 1:



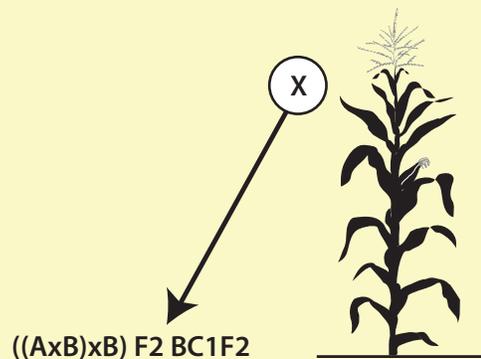
Ciclo 2

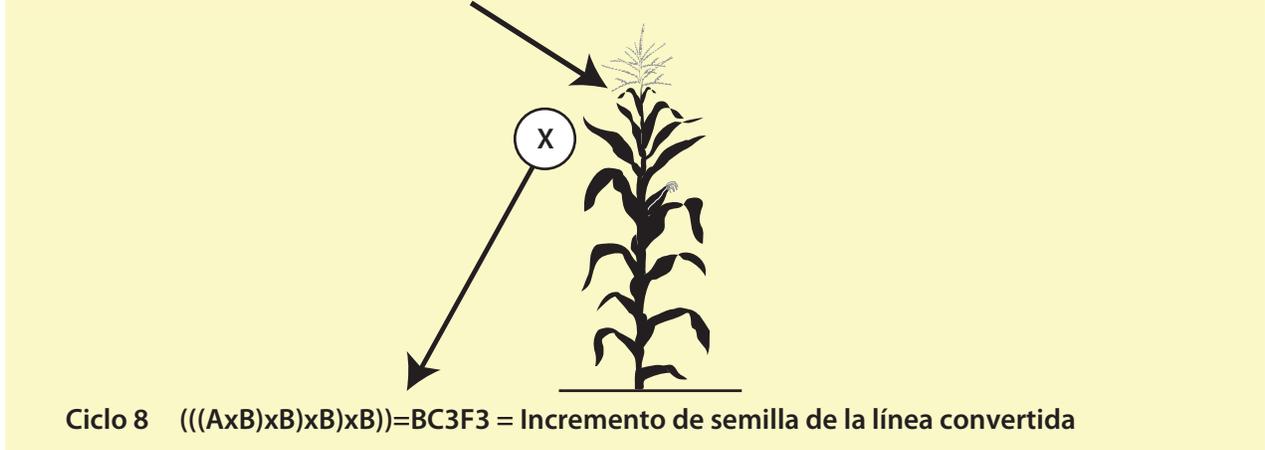
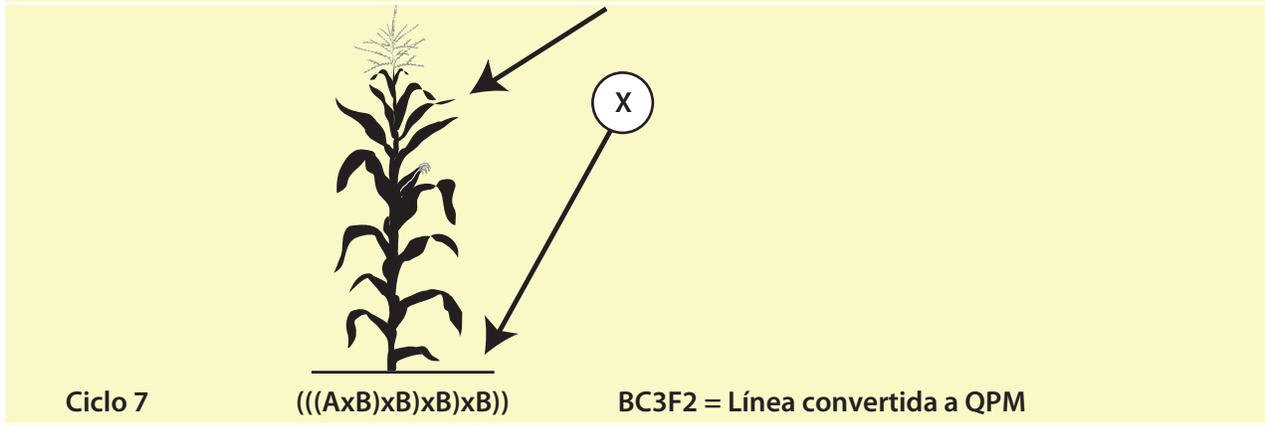
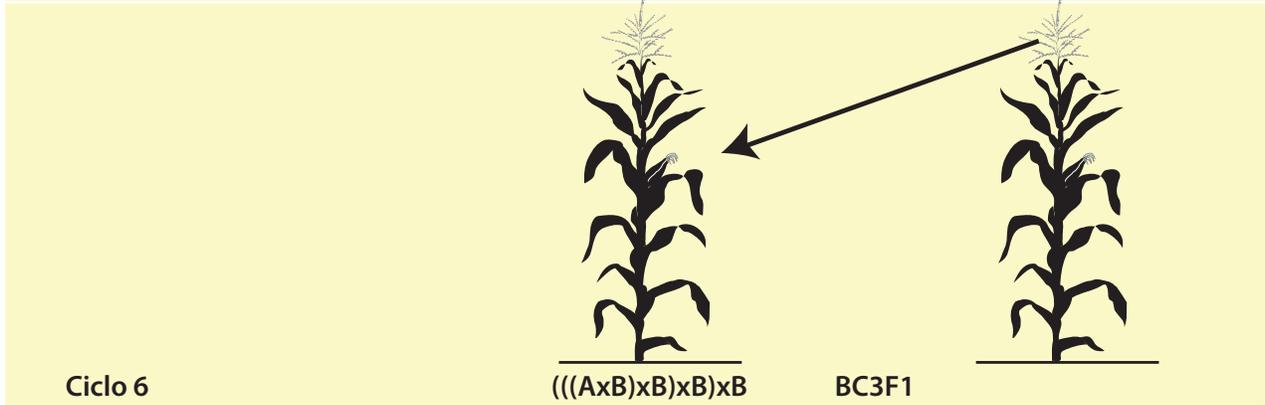
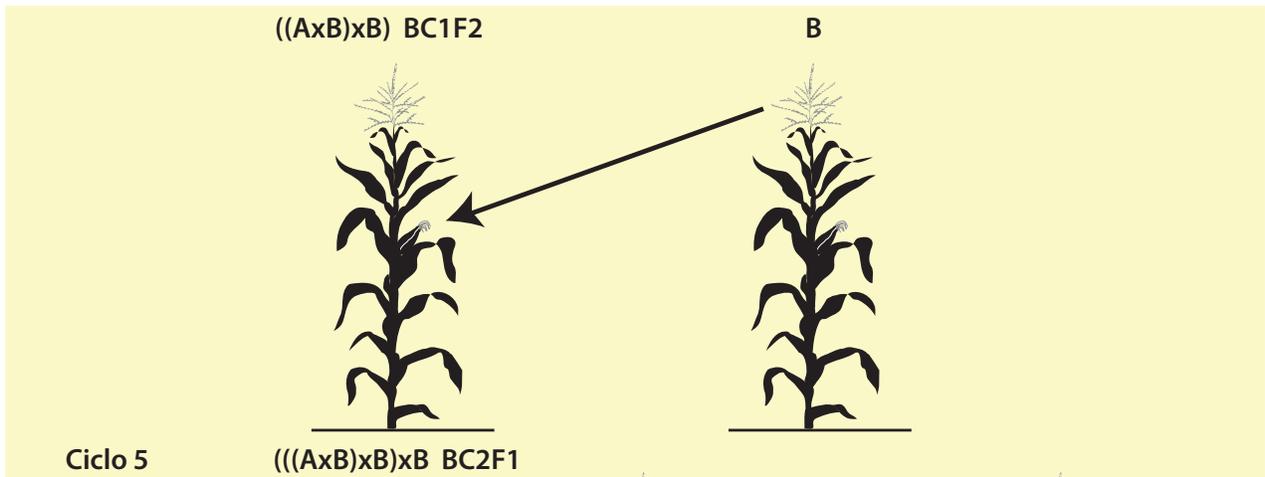


Ciclo 3



Ciclo 4





Cuadro 10. Conversión a QPM de una VPL normal.

Temporada ideal	Objetivos	Materiales que deben sembrarse	Instrucciones
1) Menor	Formar la F_1 (BC_0F_1)	<p>Si se usa una línea pura como donador: Sembrar 1 surco (17 a 26 plantas) del donador QPM (Q) y 20 surcos (mínimo 250 plantas) del progenitor recurrente (N) VPL.</p> <p>(Si no se cuenta con un buen donador, sembrar 3 a 5 posibles progenitores donadores.)</p>	<p>Haga una mezcla con el polen de 75 plantas del progenitor recurrente (N) y polinice 5 plantas donadoras (Q) para formar la F_1. Elimine las espigas de las plantas del progenitor recurrente una vez mezclado el polen. Repetir la mezcla de polen y la polinización del donador dos veces más. Usar por lo menos 200 plantas del progenitor recurrente VPL. Cosechar y seleccionar un mínimo de 10 mazorcas F_1 limpias (sin pudrición). De las mazorcas seleccionadas, hacer una mezcla de semilla F_1 de cada familia.</p> <p>(Si se tienen muchos progenitores donadores, formar de 3 a 5 F_1 de cada uno. Cosechar y seleccionar por lo menos 10 mazorcas F_1 limpias de cada familia. Por separado, hacer una mezcla de semilla F_1 de cada familia.)</p>
1) Menor	Formar la F_1 (BC_0F_1)	<p>Si se usa una VPL como donador: Sembrar 20 surcos (mínimo 250 plantas) del progenitor recurrente (N) VPL. Sembrar 20 surcos (mínimo 250 plantas) del donador QPM (Q) VPL.</p> <p>(Si no se cuenta con un buen donador, sembrar 3 a 5 posibles progenitores donadores.)</p>	<p>Haga una mezcla con el polen de 75 plantas del progenitor donador VPL y polinice 75 plantas del progenitor recurrente (N) para formar la F_1. Elimine las espigas de las plantas donadoras una vez hecha la mezcla de polen. Repetir la mezcla de polen y la polinización del progenitor recurrente dos veces más. Use al menos 200 plantas del progenitor recurrente VPL y 200 del donador VPL. Cosechar y seleccionar un mínimo de 20 mazorcas F_1 limpias (sin pudrición). De las mazorcas seleccionadas, hacer una mezcla de semilla F_1 de cada familia.</p> <p>(Si se tienen muchos progenitores donadores, formar de 3 a 5 F_1 de cada uno. Cosechar y seleccionar por lo menos 10 mazorcas F_1 limpias de cada familia. Por separado, hacer una mezcla de semilla F_1 de cada familia.)</p>
2) Principal	Avanzar a la F_2 (BC_0F_2)	<p>Sembrar 15 surcos (255 a 390 plantas) de una mezcla de la F_1 (o, si hay 3 a 5 familias F_1, sembrar 15 surcos de cada una).</p>	<p>Seleccionar plantas sanas y resistentes a enfermedades que poseen otras características agronómicas convenientes. Autopolinice todas las plantas F_1 seleccionadas para avanzarlas a F_2. Polinizar un mínimo de 100 plantas.</p> <p>En la cosecha, seleccionar por lo menos 30 mazorcas sanas, hacer una mezcla de semilla F_2 y guardar las semillas restantes para que representen la población F_2.</p> <p>Sobre la mesa de luz, seleccionar la escala de modificación del endospermo 3 (se puede escoger la escala 2 si no se tiene una cantidad suficiente de semilla de escala 3). Por lo tanto, ~80% de la semilla será rechazada con la escala 1 (~75% es maíz normal $O2O2$ ó $O2o2$ y ~5% es $o2o2$ completamente modificado y, por lo tanto, no se distinguen) y otro ~10% es $o2o2$ opaco y mal modificado (escala del 4 al 5). En promedio, sólo ~10% de la semilla sobrevivirá a esta selección (dependiendo del germoplasma).</p> <p>Si se utilizó más de un donador QPM, enviar una muestra de 20 semillas (seleccionadas por poseer la modificación 3) de cada familia F_2 al laboratorio para el análisis de triptófano en grano entero, que posibilitará la selección en familia. Los análisis se tardan por lo menos 1 mes. Eliminar todas las familias F_2 que presenten niveles de triptófano por debajo del 0.075%.</p>

Cuadro 10. continúa...

Temporada ideal	Objetivos	Materiales que deben sembrarse	Instrucciones
3) Menor	Formar la BC ₁ F ₁	<p>Sembrar 5 surcos (85 a 130 plantas) de la familia o2o2 F₂ con el mayor contenido de triptófano. Sembrar sólo 1 semilla por golpe.</p> <p>Sembrar 10 surcos (170 a 260 plantas) del progenitor recurrente (N) de cada lado para poder hacer la comparación fenotípica.</p>	<p>Seleccionar de una misma familia las plantas cuyas características fenotípicas son semejantes a las del progenitor recurrente (selección de la base genética según el fenotipo). Hacer una mezcla con el polen de 75 plantas del progenitor recurrente N y polinizar las plantas F₂ seleccionadas para formar la BC₁F₁. Eliminar las espigas de las plantas del progenitor recurrente una vez hecha la mezcla de polen. Repetir la mezcla de polen y la polinización de la BC₀F₂ dos veces más. Usar un mínimo de 200 plantas del progenitor recurrente VPL.</p> <p>En el momento de la cosecha, seleccionar 20 mazorcas sanas. Formar una familia compuesta y balanceada, y guardar la semilla restante para que represente a la BC₁F₁.</p>
4) Principal	Avanzar a la BC ₁ F ₂	Sembrar 5 surcos (85 a 130 plantas) de la familia compuesta y balanceada BC ₁ F ₁ .	<p>Seleccionar plantas vigorosas, resistentes a enfermedades, que poseen características agronómicas convenientes. Autopolinizar todas las plantas seleccionadas para avanzarlas a la BC₁F₂. Polinizar un mínimo de 75 plantas para incrementar la frecuencia de los modificadores.</p> <p>En la cosecha, seleccionar por lo menos 30 mazorcas resistentes a la pudrición; desgranar cada mazorca y colocar el grano en sobres separados. Cada mazorca BC₁F₂ debe examinarse en la mesa de luz para seleccionar las que tienen granos con una modificación 2 ó 3. Las mazorcas seleccionadas deben presentar una frecuencia mayor de granos con buena modificación.</p> <p>Tomar una muestra de 20 granos de cada mazorca BC₁F₂ (que fue seleccionada por presentar la modificación 2 ó 3) y enviarla al laboratorio para el análisis de triptófano en grano entero.</p>
5) Menor	Formar la BC ₂ F ₁	<p>Sembrar cada familia BC₁F₂ seleccionada mazorca por surco (~30 surcos). Sembrar sólo 1 semilla por golpe.</p> <p>Sembrar 10 surcos (170 a 260 plantas) del progenitor recurrente (N) de cada lado para poder hacer la comparación fenotípica.</p>	<p>Eliminar todos los surcos con niveles de triptófano por debajo del 0.075% y dejar de 8 a 10 familias. Enseguida seleccionar, en la misma familia, aquellas plantas resistentes a enfermedades que poseen características agronómicas deseables y un fenotipo similar al del progenitor recurrente (selección de la base genética según el fenotipo).</p> <p>Hacer una mezcla con el polen de 75 plantas del progenitor recurrente (N) y polinizar las plantas seleccionadas de los surcos familiares BC₁F₂ seleccionados para formar la BC₂F₁. Una vez que se recoge el polen de una planta, desespigarla para que no se vuelva a usar. Repetir la mezcla de polen y la polinización del progenitor recurrente dos veces más. Usar un mínimo de 200 plantas del progenitor recurrente VPL.</p> <p>En la cosecha, seleccionar las 10 mejores mazorcas resistentes a la pudrición de una misma familia BC₁F₂. Formar una familia compuesta y balanceada con el mismo número de granos de las mazorcas seleccionadas de cada familia para que representen a la BC₂F₁.</p>

Cuadro 10. continúa...

Temporada ideal	Objetivos	Materiales que deben sembrarse	Instrucciones
6) Principal	Avanzar a la $BC_2F_2^a$	Sembrar 5 surcos (85 a 130 plantas) de la familia compuesta y balanceada BC_2F_1 .	<p>Seleccionar plantas vigorosas, resistentes a enfermedades, que tienen otras características agronómicas deseables. Autopolinizar todas las plantas seleccionadas para avanzarlas a la BC_2F_2. Polinizar un mínimo de 75 plantas para incrementar la frecuencia de modificadores.</p> <p>En la cosecha, seleccionar por lo menos 30 mazorcas resistentes a la pudrición; desgranar cada mazorca en un sobre por separado. Cada mazorca BC_2F_2 debe examinarse en la mesa de luz a fin de seleccionar los granos con la modificación grado 2. Las mazorcas seleccionadas deben tener una mayor frecuencia de granos con buena modificación.</p> <p>Tomar una muestra de 20 granos de cada mazorca BC_2F_2 (seleccionada por poseer la modificación 2) y enviarla al laboratorio para el análisis de triptófano en grano entero.</p>
7) Menor	Formar la BC_3F_1	<p>Sembrar cada familia BC_2F_2 seleccionada mazorca por surco (~30 surcos). Sembrar sólo 1 semilla por golpe.</p> <p>Sembrar 5 surcos (85 a 130 plantas) del progenitor recurrente (N) de cada lado para poder hacer la comparación fenotípica.</p>	<p>Primero, seleccionar las familias según el análisis de triptófano y eliminar todas las que presenten menos de un 0.075% del mismo, dejando entre 8 y 10 familias. Enseguida, seleccionar entre las familias y dentro de una misma familia, las plantas resistentes al acame y a las enfermedades, cuyas características fenotípicas son similares a las del progenitor recurrente (selección de la base genética según el fenotipo).</p> <p>Compare las características agronómicas de cada familia BC_2F_2 con las del progenitor recurrente y sólo polinice las mejores familias que se parecen a dicho progenitor. Haga una mezcla con el polen de 75 plantas del progenitor recurrente (N) y polinice todas las plantas seleccionadas de los surcos familiares BC_2F_2 para formar la BC_3F_1. Desespigue todas las plantas para evitar que se vuelvan a usar. Repita la mezcla de polen y la polinización dos veces más.</p> <p>En la cosecha, seleccione un mínimo de 20 mazorcas de cada familia. Forme una familia compuesta y balanceada utilizando todas las mazorcas seleccionadas de cada familia BC_2F_2 para que representen a la BC_3F_1.</p>
8) Principal	Avanzar a la BC_3F_2	<p>Sembrar 5 surcos (85 a 130 plantas) de cada familia compuesta y balanceada BC_3F_1.</p> <p>Sembrar 5 surcos (85 a 130 plantas) del progenitor recurrente (N) de cada lado para poder hacer la comparación fenotípica.</p>	<p>Seleccione las plantas con resistencia a enfermedades y otras características agronómicas. Autopolinice todas las plantas seleccionadas en cada familia BC_3F_1 para avanzarlas a la BC_3F_2. Compare las características agronómicas de cada familia con las del progenitor recurrente, y autopolinice las mejores familias que resulten similares.</p> <p>En la cosecha, seleccione las mejores 30 mazorcas resistentes a la pudrición en cada familia BC_3F_1; desgrane cada mazorca en un sobre separado. Cada mazorca BC_3F_2 debe ser examinada en la mesa de luz; seleccionar sólo aquellas con una alta frecuencia de la modificación 2. Las mazorcas sin granos modificados deben ser descartadas.</p>

^a Se puede formar la BC_3F_1 en esta etapa cruzando la BC_2F_1 con el progenitor recurrente. Luego se forma la BC_3F_2 y se utiliza como el producto final de la conversión. El mejorador puede decidir hacer una tercera retrocruza, dependiendo de si, para esta etapa, se han recuperado en grado suficiente las características del progenitor recurrente.

Cuadro 10. continúa...

Temporada ideal	Objetivos	Materiales que deben sembrarse	Instrucciones
			Tomar una muestra de 20 granos de cada mazorca BC ₃ F ₂ (seleccionada por poseer la modificación 2) y enviarla al laboratorio para el análisis del contenido de triptófano y proteína en el endospermo.
9) Menor	Avanzar a la BC ₃ F ₃	Sembrar cada familia BC ₃ F ₂ seleccionada mazorca por surco (~30 surcos). Intercalar 3 surcos del progenitor recurrente (N) entre cada 10 familias para la comparación fenotípica.	Seleccionar sólo aquellas familias con alto contenido de proteína y triptófano. Autopolinizar las mejores 8 plantas de la BC ₃ F ₂ para avanzarla a la BC ₃ F ₃ . En la cosecha, seleccionar las mazorcas resistentes a la pudrición. Compare cada BC ₃ F ₂ agrónomicamente con el progenitor recurrente (N) y seleccione la mejor familia que también tenga un alto contenido de proteína y triptófano.
10) Principal	Formar cruces de prueba	Sembrar las familias BC ₃ F ₃ seleccionadas y la línea normal.	Cruzar una línea normal y otra convertida a QPM con un probador apropiado del grupo heterótico opuesto.
11 y 12)	Ensayo de rendimiento	Cruces de prueba.	Compare el desempeño de la línea normal con la de la QPM en 3 a 5 ambientes a fin de confirmar que tienen un desempeño semejante.

Cuadro 10a. Costos aproximados de convertir una VPL a QPM.

Costos aproximados	Línea pura donadora		VPL donadora	
	Surcos	Surcos	Muestras	Muestras
Número total de surcos o muestras de laboratorio	216	235	120	120
Costo por surco o muestra (en \$ EUA)	6	6	4.7	4.7
Costo total (en \$ EUA)	1296	1410	654	654
Costo total de convertir una línea (en \$ EUA)	1950	2064		

El costo del análisis de triptófano es de EUA \$2.20 por preparar la muestra, más EUA \$2.50 por el análisis. El costo del análisis del contenido de proteína es de EUA \$3.30. Un valor más confiable de la calidad de proteína es utilizar el % de triptófano en la proteína total (en vez del % del peso de la harina), pero esto hace que la conversión sea más costosa.

La conversión toma 4.5 años (en ambientes donde se pueden realizar dos ciclos por año), pero pueden reducirse a 4 si se elimina el ciclo 6 y se hace una retrocruza directa de la BC2F₁ a la BC3F₁; sin embargo, en este caso es posible que se pierdan la modificación de la dureza del endospermo y la calidad de proteína.

Cuadro 11. Conversión de una línea de maíz normal a QPM.

Temporada ideal	Objetivos	Materiales que hay que sembrar	Instrucciones
1) Menor	Formar la F_1 (BC_0F_1)	<p>Si se usa una línea pura como donador: Sembrar 1 surco (17 a 26 plantas) de cada uno de los progenitores: donador QPM (Q) y progenitor recurrente (N).</p> <p>(Si no se cuenta con un buen donador, sembrar de 3 a 5 posibles progenitores donadores.)</p>	<p>Hacer una mezcla con el polen de las plantas del progenitor recurrente (N) y polinizar todas plantas del donador (Q) para formar la F_1. Cosechar y seleccionar por lo menos 2 ó 3 mazorcas F_1 limpias (sin pudrición). De las mazorcas seleccionadas, hacer una mezcla con la semilla F_1 de cada familia.</p> <p>(Si se tienen muchos progenitores donadores, formar de 3 a 5 F_1 de cada uno. Cosechar y seleccionar por lo menos 2 ó 3 mazorcas F_1 limpias de cada familia. Por separado, hacer una mezcla con la semilla F_1 de cada familia.)</p>
	Formar la F_1 (BC_0F_1)	<p>Si se usa un donador que es VPL: Sembrar 1 surco (17 a 26 plantas) del progenitor recurrente (N). Sembrar 20 surcos (un mínimo de 250 plantas) del donador QPM (Q) VPL.</p> <p>(Si no se cuenta con un buen donador, sembrar de 3 a 5 posibles progenitores donadores.)</p>	<p>Hacer una mezcla con el polen de 75 plantas del progenitor VPL y polinizar 5 plantas del progenitor recurrente (N) para formar la F_1. Desespigar las plantas una vez hecha la mezcla de polen. Repetir la mezcla de polen y la polinización dos veces más. Usar por lo menos 200 plantas del progenitor VPL. Cosechar y seleccionar un mínimo de 20 mazorcas F_1 limpias (sin pudrición). De las mazorcas seleccionadas, hacer una mezcla con la semilla F_1 de cada familia.</p> <p>(Si se tienen muchos progenitores donadores, formar de 3 a 5 F_1 de cada uno. Cosechar y seleccionar por lo menos 20 mazorcas F_1 limpias de cada familia. Por separado, hacer una mezcla con la semilla F_1 de cada familia.)</p>
2) Principal	Avanzar a la F_2 (BC_0F_2)	<p>Si se usa una línea pura como donador: Sembrar 1 surco (17 a 26 plantas) de la mezcla de la F_1 (o, si hay entre 3 y 5 familias F_1, sembrar 1 surco de cada una).</p> <p>Si se usa un donador que es VPL: Sembrar 15 surcos (255 a 390 plantas) de la mezcla de la F_1 (o, si hay entre 3 y 5 familias F_1, sembrar 10 a 15 surcos de cada una).</p>	<p>Seleccionar plantas sanas, resistentes a enfermedades, y con otras características agronómicas deseables. Autopolinizar todas las plantas F_1 seleccionadas para avanzarlas a la F_2. Polinizar por lo menos 12 plantas.</p> <p>En la cosecha, seleccionar por lo menos 10 mazorcas sanas; hacer una mezcla con la semilla F_2 (~5000) y guardar la semilla restante para que represente la población F_2.</p> <p>Seleccionar plantas sanas, resistentes a enfermedades, y con otras características agronómicas deseables. Autopolinizar todas las plantas F_1 seleccionadas para avanzarlas a la F_2. Polinizar un mínimo de 100 plantas.</p> <p>En la cosecha, seleccionar un mínimo de 30 mazorcas sanas; hacer una mezcla de semilla F_2 (~5000) y guardar la semilla restante para que represente la población F_2.</p> <p>En la mesa de luz, seleccionar la escala de modificación 3 (se puede escoger la 2 si no se tiene una cantidad suficiente de semilla para la escala 3). Por lo tanto, ~80% de la semilla será rechazada con la escala 1 (~75% de maíz normal 0202 ó 0202 y ~5% de maíz 0202 completamente modificado y, por ende, no distinguible del otro) y otro ~10% de maíz 0202 opaco o mal modificado (escala de 4 a 5). En promedio, sólo ~10% de la semilla sobrevivirá a esta selección (dependiendo del germoplasma).</p> <p>Si se utilizó más de un donador QPM, enviar una muestra de 20 semillas (seleccionadas por poseer la modificación 3) de cada familia F_2 al laboratorio para el análisis de triptófano en grano entero que facilitará la selección en la misma familia. Dicho análisis tarda 1 mes. Eliminar todas las familias F_2 con niveles de triptófano por debajo del 0.075%.</p>

Cuadro 11. continúa....

Temporada ideal	Objetivos	Materiales que hay que sembrar	Instrucciones
3) Menor	Formar la BC ₁ F ₁	<p>Sembrar 5 surcos (85 a 130 plantas) de la familia o2o2 F₂ seleccionada que tiene el mayor contenido de triptófano. Sembrar sólo 1 semilla por golpe.</p> <p>Sembrar 2 surcos (34 a 52 plantas) del progenitor recurrente (N) de cada lado para hacer la comparación fenotípica.</p>	<p>Seleccionar, dentro de una misma familia, las plantas cuyas características fenotípicas son semejantes a las del progenitor recurrente (selección de la base genética según el fenotipo). Hacer una mezcla con el polen de 34 a 52 plantas del progenitor recurrente N y polinizar las plantas F₂ seleccionadas para formar la BC₁F₁.</p> <p>En la cosecha, seleccionar 20 mazorcas sanas. Formar una familia compuesta y balanceada, y guardar la semilla restante para que represente la BC₁F₁.</p>
4) Principal	Avanzar a la BC ₁ F ₂	Sembrar 5 surcos (85 a 130 plantas) de la familia BC ₁ F ₁ compuesta y balanceada.	<p>Seleccionar plantas vigorosas, resistentes a enfermedades y que tienen otras características agronómicas deseables. Autopolinizar todas las plantas seleccionadas para avanzarlas a la BC₁F₂. Polinizar por lo menos 75 plantas a fin de incrementar la frecuencia de los modificadores.</p> <p>En la cosecha, seleccionar un mínimo de 30 mazorcas resistentes a la pudrición; desgranar cada mazorca en un sobre por separado. Cada mazorca BC₁F₂ debe ser examinada en la mesa de luz a fin de seleccionar aquéllas con granos modificados grado 2 y 3. Seleccionar por lo menos 20 mazorcas que tienen una mayor frecuencia de granos con buena modificación.</p> <p>Tomar una muestra de 20 granos de cada mazorca BC₁F₂ (seleccionada por poseer la modificación 2 ó 3) y enviarla al laboratorio para el análisis de triptófano en grano entero.</p>
5) Menor	Formar la BC ₂ F ₁	<p>Sembrar cada familia BC₁F₂ seleccionada mazorca por surco (~20 surcos). Sembrar sólo 1 semilla por golpe.</p> <p>Sembrar 2 surcos (34 a 52 plantas) del progenitor recurrente (N) de cada lado para hacer la comparación fenotípica.</p>	<p>Eliminar todos los surcos con niveles de triptófano por debajo del 0.075%, dejando de 2 a 4 familias. A continuación, seleccionar entre las familias las plantas que son resistentes a enfermedades y tienen características agronómicas deseables y un fenotipo semejante al del progenitor recurrente (selección de la base genética según el fenotipo).</p> <p>Hacer una mezcla con el polen de 34 a 52 plantas del progenitor recurrente (N) y polinizar todas las plantas seleccionadas de los surcos de la familia BC₁F₂ para formar la BC₂F₁. Una vez recogido el polen de una planta, hay que desespigarla para evitar que se vuelva a usar.</p> <p>En la cosecha, seleccionar un mínimo de 10 mazorcas superiores resistentes a la pudrición de una familia BC₁F₂. Formar una familia compuesta y balanceada con el mismo número de granos de las mazorcas seleccionadas de cada familia, para que represente a la BC₂F₁.</p>

Cuadro 11. continúa...

Temporada ideal	Objetivos	Materiales que hay que sembrar	Instrucciones
6) Principal	Avanzar a la $BC_2F_2^a$	Sembrar 5 surcos (85 a 130 plantas) de la familia BC_2F_1 compuesta y balanceada.	<p>Seleccionar plantas vigorosas resistentes a enfermedades y que tienen otras características agronómicas deseables. Autopolinizar todas las plantas seleccionadas para avanzarlas a la BC_2F_2. Polinizar por lo menos 75 plantas a fin de incrementar la frecuencia de los modificadores.</p> <p>En la cosecha, seleccionar un mínimo de 30 mazorcas resistentes a la pudrición; desgranar cada mazorca en un sobre por separado. Cada mazorca BC_2F_2 debe ser examinada en la mesa de luz para seleccionar aquéllas con granos modificados de grado 2. Seleccionar por lo menos 20 mazorcas que tienen una mayor frecuencia de granos con buena modificación.</p> <p>Tomar una muestra de 20 granos de cada mazorca BC_2F_2 (seleccionada por presentar la modificación 2) y enviarla al laboratorio para el análisis de triptófano en grano entero.</p>
7) Menor	Formar la BC_3F_1	<p>Sembrar cada familia BC_2F_2 seleccionada mazorca por surco (~20 surcos). Sembrar sólo 1 semilla por golpe.</p> <p>Sembrar 2 surcos (34 a 52 plantas) del progenitor recurrente (N) de cada lado para hacer la comparación fenotípica.</p>	<p>Primero, seleccionar las familias con base en el análisis de triptófano y eliminar todas las familias con niveles por debajo de 0.075 %, dejando de 2 a 4 familias. A continuación, seleccionar entre las familias y dentro de éstas las plantas resistentes al acame y las enfermedades que tienen características fenotípicas semejantes a las del progenitor recurrente (selección de la base genética según el fenotipo).</p> <p>Hacer una mezcla con el polen de 34 a 52 plantas del progenitor recurrente (N) y polinizar todas las plantas seleccionadas de los surcos de la familia BC_2F_2 para formar la BC_3F_1. Desespigar todas las plantas utilizadas para evitar que se vuelvan a usar. Comparar, desde el punto de vista agronómico, cada familia BC_2F_2 con el progenitor recurrente y polinizar sólo las mejores familias que se parecen al progenitor recurrente.</p> <p>En la cosecha, seleccionar por lo menos 10 mazorcas de cada familia. Formar una familia compuesta y balanceada con todas las mazorcas seleccionadas de cada familia BC_2F_2 para que represente la BC_3F_1.</p>
8) Principal	Avanzar a la BC_3F_2	<p>Sembrar 5 surcos (85 a 130 plantas) de cada familia BC_3F_1 compuesta y balanceada.</p> <p>Sembrar 2 surcos (34 a 52 plantas) del progenitor recurrente (N) de cada lado para hacer la comparación fenotípica.</p>	<p>Seleccionar plantas resistentes a enfermedades y que tienen otras características agronómicas deseables. Autopolinizar todas las plantas seleccionadas en cada familia BC_3F_1 para avanzarlas a la BC_3F_2. Comparar, desde el punto de vista agronómico, cada familia con el progenitor recurrente y autopolinizar las familias que son similares al progenitor recurrente.</p> <p>En la cosecha, seleccionar las 20 mazorcas superiores y resistentes a la pudrición de cada familia BC_3F_1; desgranar cada mazorca en un sobre por separado. Cada mazorca BC_3F_2 debe ser examinada sobre la mesa de luz a fin de seleccionar sólo aquéllas con una alta frecuencia de granos con modificación 2. Las mazorcas sin granos modificados deben ser descartadas.</p>

^a Se puede formar la BC_3F_1 en esta etapa cruzando la BC_2F_1 con el progenitor recurrente. Luego se forma la BC_3F_2 y se utiliza como el producto final de la conversión. El mejorador puede decidir hacer una tercera retrocruza, dependiendo de si, para esta etapa, se han recuperado en grado suficiente las características del progenitor recurrente.

Cuadro 11. continúa....

Temporada ideal	Objetivos	Materiales que hay que sembrar	Instrucciones
			Tomar una muestra de 20 granos de cada mazorca BC_3F_2 (seleccionada por poseer la modificación 2) y enviarla al laboratorio para el análisis del contenido de proteína y triptófano en el endospermo.
9) Menor	Avanzar a la BC_3F_3	Sembrar cada familia BC_3F_2 seleccionada mazorca por surco (~20 surcos). Intercalar 1 surco del progenitor recurrente (N) por cada 10 familias para hacer la comparación fenotípica.	Seleccionar sólo las familias con alto contenido de proteína y triptófano. Autopolinizar las 8 mejores plantas BC_3F_2 para avanzarlas a la BC_3F_3 . En la cosecha, seleccionar las mazorcas resistentes a la pudrición. Comparar cada familia BC_3F_2 , desde el punto de vista agronómico, con el progenitor recurrente (N) y seleccionar la mejor familia que también presenta un alto contenido de proteína y triptófano.
10) Principal	Formar las cruces de prueba	Sembrar las familias BC_3F_3 seleccionadas y la línea normal.	Cruzar una línea normal y una línea convertida a QPM con un probador apropiado del grupo heterótico opuesto.
11 & 12)	Ensayo de rendimiento	Cruzas de prueba.	Comparar el desempeño de la línea normal con el de la línea QPM en 3 a 5 ambientes para confirmar un comportamiento semejante.

Cuadro 11a. Costos aproximados de convertir una línea de maíz normal a QPM.

Costos aproximados	Línea pura donadora		VPL donadora	
	Surcos	Muestras	Surcos	Muestras
Número total de surcos o muestras de laboratorio	117	64	234	74
Costo por surco o muestra (en \$ EUA)	6	4.7	6	4.7
Costo total (en \$ EUA)	702	360	1404	408
Costo total de convertir una línea (en \$ EUA)	1062		1812	

El costo del análisis de triptófano es de EUA \$2.20 por preparar la muestra, más EUA \$2.50 por la determinación. El costo del análisis del triptófano es de EUA \$2.20 por preparar cada muestra, más EUA \$2.50 por la determinación. La determinación del contenido de proteína es de EUA \$3.30. Para un valor más confiable de la calidad de proteína, se puede utilizar el % de triptófano en la proteína total (en vez del % del peso de la harina), pero esto agrega EUA \$211.00 al costo de la conversión.

La conversión toma 4.5 años (en ambientes donde se pueden realizar dos ciclos por año), pero pueden reducirse a 4 si se elimina el ciclo 6 y se hace una retrocruza directa de la BC_2F_1 a la BC_3F_1 ; sin embargo, en este caso es posible que se pierdan la modificación de la dureza del endospermo y la calidad de proteína.

Cuadro 12. Reciclaje de VPL y líneas de maíz normal utilizando donadores QPM (primer esquema).

Ciclo	Objetivos	Materiales que hay que sembrar	Instrucciones
1	Formar la F ₁	Sembrar 17 a 26 plantas de la línea no QPM o 300 plantas de la VPL no QPM. Sembrar 400 a 500 plantas de cada donador VPL QPM o 50 plantas de la línea donadora. Se recomienda usar de 3 a 4 donadores (o por lo menos 2).	<p>VPL donadora: Hacer una mezcla con el polen de por lo menos 70 a 80 plantas (hacer una selección ligera) de la VPL QPM y polinizar 5 plantas de cada una de las líneas no QPM o 75 plantas de una VPL no QPM. Desespigar de las plantas utilizadas para hacer la mezcla de polen para que no vuelvan a ser utilizadas.</p> <p>Repetir el procedimiento arriba descrito en por lo menos dos fechas más. Un total de por lo menos 200 plantas de la VPL QPM debe incluirse en la mezcla de polen; 12 plantas de la línea no QPM o 200 plantas de la VPL no QPM deben ser polinizadas. Seleccionar mazorcas resistentes a la pudrición. Hacer una familia compuesta y balanceada para formar la F₁.</p> <p>Línea pura donadora: Hacer una mezcla con el polen de por lo menos 5 plantas (hacer una selección ligera) de cada línea QPM y polinizar 5 plantas de cada una de las líneas no QPM o polinizar 75 plantas de la VPL no QPM. Desespigar de las plantas utilizadas para hacer la mezcla de polen para que no vuelvan a usarse.</p> <p>Repetir el procedimiento arriba descrito en por lo menos 2 fechas más. Un total de por lo menos 12 plantas de la línea QPM debe ser incluido en la mezcla de polen y por lo menos 12 plantas de la línea no QPM o 200 plantas de la VPL no QPM deben ser polinizadas. Seleccionar mazorcas resistentes a la pudrición. Hacer una familia compuesta y balanceada para formar la F₁.</p>
2	Formar la F ₂ (S ₁) ^a	Sembrar 17 a 26 plantas (si sólo se cruzaron líneas puras) o 170 a 260 plantas (si hubo una VPL en la cruce) de la mezcla balanceada F ₁ (formada con cantidades iguales de semilla de cada mazorca F ₁ cosechada en el ciclo 1).	Seleccionar plantas por su buena reacción a las enfermedades y otras características agronómicas. Autopolinizar por lo menos 12 plantas seleccionadas. En la cosecha, seleccionar las mejores mazorcas.
3	Formar la S ₁ (S ₂)	Desgranar cada mazorca F ₂ por separado y examinar los granos en la mesa de luz; seleccionar y sembrar sólo granos con la modificación 3 (en una escala del 1 al 5). Sembrar 1 surco de cada mazorca cosechada.	Seleccionar las mejores líneas (el 20% superior) por su reacción a las enfermedades y su fenotipo. Polinizar las 5 mejores plantas de cada línea seleccionada. Guardar 2 ó 3 mazorcas de cada línea seleccionada.
4	Formar la S ₂ (S ₃)	Desgranar cada mazorca S ₁ (S ₂) por separado y examinar los granos en la mesa de luz; seleccionar y sembrar sólo granos con modificación 2 ó 3 (en una escala del 1 al 5). Sembrar 1 surco de cada mazorca cosechada.	<p>Seleccionar las mejores líneas (el 20% superior) por su reacción a las enfermedades y su fenotipo. Polinizar las 5 mejores plantas de cada línea seleccionada. Guardar 2 ó 3 mazorcas de cada línea seleccionada.</p> <p>Tomar una muestra de 20 granos de cada mazorca y enviarla a analizar para establecer su contenido de proteína y triptófano en grano entero. Eliminar las mazorcas de mala calidad.</p>
		Sembrar otro juego de líneas que fueron examinadas en la mesa de luz.	Cruzarlas con el probador; si se conoce el grupo heterótico, cruzarlas con el probador del grupo heterótico opuesto; si no, cruzarlas con los probadores de dos grupos que son heteróticos entre sí (por ejemplo, A y B).

^a El nombre en paréntesis es otro nombre de la misma generación, que se usa con frecuencia.

Cuadro 12. continúa....

Ciclo	Objetivos	Materiales que hay que sembrar	Instrucciones
5	Formar la S_3 (S_4)	Desgranar cada mazorca S_2 (S_3) por separado y examinar los granos en la mesa de luz; seleccionar y sembrar sólo granos con modificación 2 ó 3 (en una escala del 1 al 5). Sembrar 1 surco de cada mazorca cosechada.	Seleccionar las mejores líneas (el 20% superior) por su reacción a las enfermedades y su fenotipo. Polinizar las 5 mejores plantas de cada línea seleccionada. Guardar 2 ó 3 mazorcas de cada línea seleccionada.
	Evaluar las cruzas de prueba	Sembrar las cruzas de prueba.	Evaluar las cruzas de prueba en 4 a 6 ambientes, asegurándose de que dichos ambientes representen las localidades-objetivo.
6	Formar la S_4 (S_5)	Desgranar las mazorcas todas juntas; sembrar sólo aquellas líneas con buena calidad de proteína y capacidad combinatoria adecuada; examinar los granos en la mesa de luz; sembrar sólo los granos con modificación 2 (en una escala del 1 al 5). Sembrar otro juego de las líneas seleccionadas.	Incrementar, mediante la autopolinización, la semilla de las líneas seleccionadas. Cruzar con otro germoplasma elite (ya sean líneas o cruzas simples, dependiendo del producto final que se desea obtener). Enviar, por segunda vez, 20 granos de las líneas seleccionadas para el análisis de triptófano y proteína en grano entero. Eliminar las familias con mala calidad de proteína.
7	Formar la S_5 (S_6)	Sembrar una mezcla de las líneas del ciclo 6. Sembrar las cruzas de prueba.	Autopolinizar y avanzar sólo aquellas líneas con buena calidad de proteína. Evaluar los híbridos en numerosas localidades, asegurándose de incluir los ambientes-objetivo.
8	Formar la S_6 (S_7)	Sembrar una mezcla de las líneas con buena capacidad combinatoria, con base en la prueba del ciclo 7. Sembrar por lo menos 10 surcos de las líneas seleccionadas. Este es el primer aumento grande de líneas elite. Sembrar un segundo juego de las líneas seleccionadas. Sembrar las cruzas.	Autopolinizar y avanzar las líneas. Enviar los mejores híbridos del ciclo 7 para el análisis de triptófano y proteína, preferiblemente con base en el endospermo. Cruzar con otro germoplasma elite para generar más híbridos experimentales. Continuar las evaluaciones como en el ciclo 7.

Cuadro 13. Reciclaje de VPL y líneas de maíz normal utilizando donadores QPM (segundo esquema).

Ciclo	Objetivos	Materiales que hay que sembrar	Instrucciones
1	Formar la F ₁	Sembrar 17 a 26 plantas de la línea no QPM o 300 plantas de la VPL no QPM. Sembrar 400 a 500 plantas de cada VPL donadora de QPM o 50 plantas de la línea donadora. Se recomienda usar de 3 a 4 donadores (o por lo menos 2).	<p>VPL donadora: Hacer una mezcla con el polen de por lo menos 70 a 80 plantas (realizar una selección ligera) de la VPL QPM y polinizar 5 plantas de cada línea no QPM o 75 plantas de la VPL no QPM. Eliminar las espigas de las plantas utilizadas para hacer la mezcla de polen para que no vuelvan a ser usadas.</p> <p>Repetir el procedimiento descrito en por lo menos 2 fechas más. Un total de por lo menos 200 plantas de la VPL QPM debe incluirse en la mezcla de polen; 12 plantas de la línea no QPM o 200 plantas de la VPL no QPM deben ser polinizadas. Seleccionar mazorcas resistentes a la pudrición. Hacer una familia compuesta y balanceada para formar la F₁.</p> <p>Línea pura donadora: Hacer una mezcla con el polen de un mínimo de 5 plantas (realizar una selección ligera) de cada línea QPM y polinizar 5 plantas de cada línea no QPM o 75 plantas de la VPL no QPM. Eliminar las espigas de las plantas utilizadas para hacer la mezcla de polen para evitar que se vuelvan a usar.</p> <p>Repetir el procedimiento descrito en por lo menos 2 fechas más. Un total de por lo menos 12 plantas de la línea QPM debe incluirse en la mezcla de polen y un mínimo de 12 plantas de la línea no QPM o 200 plantas de la VPL no QPM deben ser polinizadas. Seleccionar las mazorcas resistentes a la pudrición. Hacer una familia compuesta y balanceada para formar la F₁.</p>
2	Formar la F ₂ (S ₁) ^a	Sembrar 17 a 26 plantas (si sólo se cruzaron líneas puras) o 170 a 260 plantas (si se usó una VPL en la cruce) de la mezcla balanceada F ₁ (formada usando cantidades iguales de la semilla de cada mazorca F ₁ cosechada en el ciclo 1).	Seleccionar las plantas con buena reacción a enfermedades y otras características agronómicas. Autopolinizar por lo menos 12 plantas seleccionadas. En la cosecha, seleccionar las mejores mazorcas.
3	Formar la S ₁ (S ₂)	Desgranar cada mazorca F ₂ por separado y examinar los granos en la mesa de luz; seleccionar y guardar sólo granos con modificación 3 (en una escala del 1 al 5). Sembrar 1 surco de cada mazorca cosechada.	Seleccionar las mejores líneas (el 20% superior) por su reacción a las enfermedades y su fenotipo. Polinizar las 5 mejores plantas de cada línea seleccionada. Guardar 2 ó 3 mazorcas de cada línea seleccionada.
4	Formar la S ₂ (S ₃)	Desgranar cada mazorca S ₁ (S ₂) por separado y examinar los granos en la mesa de luz; seleccionar y guardar sólo granos con modificación 2 ó 3 (en una escala del 1 al 5). Sembrar 1 surco de cada mazorca cosechada.	Seleccionar las mejores líneas (el 20% superior) por su reacción a las enfermedades y su fenotipo. Polinizar las 5 mejores plantas de cada línea seleccionada. Guardar 2 ó 3 mazorcas de cada línea seleccionada.
5	Formar la S ₃ (S ₄)	Desgranar cada mazorca S ₂ (S ₃) por separado y examinar los granos en la mesa de luz; guardar y sembrar sólo granos con modificación 2 ó 3 (en una escala del 1 al 5). Sembrar 1 surco de cada mazorca cosechada. Sembrar un segundo juego de líneas que fueron seleccionadas en la mesa de luz.	<p>Seleccionar las mejores líneas (el 20% superior) por su reacción a las enfermedades y su fenotipo. Polinizar las 5 mejores plantas de cada línea seleccionada. Guardar 2 ó 3 mazorcas de cada línea seleccionada.</p> <p>Tomar una muestra de 20 granos de cada mazorca y enviar al laboratorio para el análisis del contenido de proteína y triptófano en grano entero. Eliminar las mazorcas de mala calidad.</p> <p>Cruzar con el probador. Si se conoce el grupo heterótico, cruzar con el probador del grupo opuesto; si no, cruzar con los probadores de dos grupos heteróticos entre sí (por ejemplo, A y B).</p>

^a El nombre en paréntesis es otro nombre de la misma generación, que se usa con frecuencia.

Cuadro 13. continúa...

Ciclo	Objetivos	Materiales que hay que sembrar	Instrucciones
6	Formar la S_4 (S_3)	Desgranar cada mazorca por separado, y examinar los granos en la mesa de luz; guardar y sembrar sólo granos con modificación 2 (en una escala del 1 al 5). Sembrar 1 surco de cada mazorca cosechada. Sembrar sólo aquellas progenies cuyo progenitor tiene buena calidad de proteína. Sembrar cruzas de prueba.	Seleccionar las mejores líneas (el 20% superior) por su reacción a las enfermedades y su fenotipo. Polinizar las 5 mejores plantas de cada línea seleccionada. Guardar 2 ó 3 mazorcas de cada línea seleccionada. Evaluar las cruzas de prueba en 4 a 6 ambientes asegurándose que éstos representen las localidades-objetivo.
7	Formar la S_4 (S_5)	Desgranar las mazorcas todas juntas; sembrar sólo aquellas líneas con buena calidad de proteína y buena aptitud combinatoria; examinar los granos en la mesa de luz; sembrar sólo granos con modificación 2 en una escala del 1 al 5. Sembrar otro juego de las líneas seleccionadas.	Incrementar, mediante la autopolinización, la semilla de las líneas seleccionadas. Cruzar con otro germoplasma elite (ya sean líneas o cruzas simples, dependiendo del producto final que se desee obtener). Enviar 20 granos de las líneas seleccionadas para ser sometidos a un segundo análisis del contenido de triptófano y proteína en grano entero.
8	Formar la S_5 (S_6)	Sembrar una mezcla de las líneas del ciclo 6. Sembrar cruzas.	Autopolinizar y avanzar sólo aquellas líneas con buena calidad de proteína. Evaluar los híbridos en numerosas localidades, asegurándose que éstas representen los ambientes-objetivo.
9	Formar la S_6 (S_7)	Sembrar una mezcla de las líneas con buena aptitud combinatoria, con base en los ensayos del ciclo 7. Sembrar por lo menos 10 surcos de las líneas seleccionadas. Este es el primer incremento grande de las líneas elite. Sembrar un segundo juego de las líneas seleccionadas. Sembrar las cruzas.	Autopolinizar y avanzar las líneas. Enviar los mejores híbridos del ciclo 7 para el análisis de triptófano y proteína, preferiblemente con base en el endospermo. Cruzar con otro germoplasma elite a fin de generar más híbridos experimentales. Continuar con las pruebas, como se hizo en el ciclo 7.

4.5.1 Reciclaje de QPM elite con QPM elite

El procedimiento utilizado para reciclar QPM elite con QPM elite es muy parecido al reciclaje de VPL y líneas no QPM con donadores QPM. Este método tiene la ventaja de que el alelo *o2* está fijo, incluso en las generaciones segregantes. Es necesario tener en cuenta todos los principios de la selección planteados en este manual y realizar una selección minuciosa para lograr una buena modificación. No obstante, este

método sólo se puede aplicar cuando el programa genotécnico tiene una cantidad suficiente de germoplasma QPM elite. El protocolo que se utiliza es muy similar a los descritos en los Cuadros 12 y 13. El único cambio que se recomienda hacer es empezar a seleccionar la modificación tipo 2 ó 3 (en vez de seleccionar sólo el tipo 3) en la F2 y seleccionar el tipo 2 en las generaciones subsecuentes.

5. Producción de semilla

La producción de semilla QPM no es distinta de la producción de semilla normal. En ambas es necesario apearse a normas estrictas que aseguran la reproducción de semilla de alta calidad que conserve el tipo de la variedad. Existen varios manuales (por ejemplo, Beck, 1999) que brindan una descripción detallada de la producción de semilla de maíz y que el lector que desea hacer una revisión profunda de dichos procedimientos debe consultar. En las Secciones 5.1, 5.2 (ver a continuación) y 7.1 de este manual se presentan algunas recomendaciones específicas para incrementar semilla QPM. El único requerimiento adicional de la producción de semilla QPM, es que los incrementos deben enviarse al laboratorio para el análisis del contenido de proteína y triptófano con el fin de asegurar que los valores correspondientes sobrepasan el mínimo requerido.

5.1 Producción de semilla del mejorador de las VPL

Con objeto de garantizar la calidad de proteína y la modificación del endospermo de la semilla de variedades de polinización libre (VPL) QPM, se recomienda producir la semilla del mejorador en bloques aislados de medios hermanos.

Ciclo 1:

- Sembrar de 300 a 500 plantas representativas en aislamiento, en un campo de producción de semilla del mejorador.
- En la cosecha, desgranar cada mazorca por separado.

Ciclo 2:

- Siembre cada mazorca en un solo surco hembra.
- Haga una mezcla con cantidades iguales del grano de cada mazorca para sembrarlas en surcos macho (la única fuente de polen).
- Sembrar tres surcos hembra por cada surco macho en un bloque aislado de medios hermanos. Desespigar los surcos hembra.
- Realice una selección ligera rechazando todos los surcos que se apartan de la descripción de la variedad. No obstante, asegúrese de no rechazar más del 20% de los surcos hembra.

- En la cosecha, seleccione los mejores surcos, y las mejores plantas en esos surcos, que sean las más representativas de la variedad en cuestión, a fin de generar semilla para el siguiente ciclo de producción de semilla.
- Seleccione 1 ó 2 mazorcas de los surcos representativos para sembrar los 300 a 500 surcos hembra del siguiente ciclo de producción.
- Lleve a cabo los análisis de laboratorio de las muestras de semilla de las mazorcas seleccionadas. Utilice sólo aquellas mazorcas que tienen niveles aceptables de proteína y triptófano para hacer la mezcla de semilla que se utilizará como fuente de polen. Rechazar los surcos hembra con calidad de proteína inaceptablemente baja. Nótese que, para ahorrar tiempo y dinero, los análisis de laboratorio pueden efectuarse cada tercer ciclo de producción de semilla del mejorador.

Ciclo 3:

- Sembrar el tercer ciclo de producción de semilla como se sembró el ciclo 2.
- *Contar y apartar la semilla que se sembrará en los surcos hembra y almacenar la semilla restante de cada hembra. Hacer una mezcla con el resto de la semilla y la que quedó de los surcos macho, a fin de formar la semilla del mejorador para los productores de semilla.*

En caso de sospechar que una variedad ha perdido su calidad de proteína:

- Siembre un mínimo de 10 surcos de semilla del mejorador de la línea pura en cuestión y autopolinice de 3 a 5 mazorcas en cada surco.
- En la cosecha, seleccione sólo aquellas mazorcas que muestren segregación de la modificación del endospermo (tipos de modificación del 2 al 5); rechace las mazorcas que parecen normales (modificación 1).
- Desgranar cada mazorca por separado.
- Utilizar la mesa de luz para seleccionar las semillas que muestren la modificación 2 ó 3 para que representen la mazorca correspondiente.
- Enviar muestras de las semillas al laboratorio para su análisis.
- Reconstituir la semilla del mejorador utilizando las mazorcas seleccionadas por su buena calidad de proteína.

5.2 Producción de semilla básica de las VPL

Cada vez que completan dos ciclos de producción de semilla básica, los productores de semilla básica deben utilizar un lote de semilla del mejorador fresca para producir su semilla. Además, es preciso que mantengan la calidad de sus bloques de semilla básica enviando regularmente muestras mezcladas representativas para el análisis de calidad de proteína. Esto no sólo asegurará que los clientes productores de semilla y, finalmente, los agricultores y los consumidores, recibirán los beneficios de la calidad de proteína, sino que también ayudará a los productores de semilla básica a cumplir con las normas de calidad requeridas según la variedad de que se trate.

6. Cómo beneficia el QPM a los agricultores y las comunidades

El gene *o2* es recesivo y la condición homocigota recesiva, *o2o2*, es un requisito para que el maíz presente altos contenidos de lisina y triptófano. Cuando una variedad QPM se poliniza con polen normal (que no es QPM), esto de inmediato hace que el grano producido no sea QPM —es decir, los granos de una mazorca QPM que fueron fecundados por polen de maíz normal (no QPM) no serán QPM. Esto es semejante a lo que ocurre cuando maíz de endospermo amarillo se siembra cerca de maíz de endospermo blanco. En la cosecha, el grado de contaminación del endospermo blanco es evidente de inmediato, gracias al efecto de xenia en el color del endospermo y porque el color amarillo es dominante sobre el blanco. Es muy probable que un campo de producción de grano de una variedad QPM esté rodeado de parcelas sembradas con variedades que no son QPM. Esto podría afectar negativamente al agricultor que desee:

- mejorar su nutrición consumiendo maíz con calidad de proteína o
- guardar semilla QPM para sembrarla en el siguiente ciclo de cultivo.

Otra dificultad es que, en apariencia, las variedades QPM son iguales a las que no lo son. La mayoría de los mercados en el mundo en desarrollo no se especializan en la venta de QPM. Dado que no es posible distinguir a ojo un montón de grano QPM de uno que no lo es, no se le puede poner un sobreprecio al grano QPM, a menos que se efectúe un análisis de calidad. Esto representa otra dificultad para:

- el productor, especialmente aquel que busca obtener mayores utilidades con la venta de grano QPM con base exclusivamente en su mejor calidad nutricional y
- el consumidor bien informado que desea comprar grano QPM.

Una tercera dificultad estriba en el hecho que los agricultores suelen sembrar el maíz en suelos poco fértiles (especialmente, suelos con escasez de nitrógeno), ya sea porque no tienen los recursos para comprar fertilizantes nitrogenados o porque no los pueden conseguir. Además, de acuerdo con ciertos informes, la modificación del endospermo al parecer se deteriora cuando los cultivos son sometidos a sequía. Esto ha llevado a muchos escépticos a preguntarse:

- si el QPM sembrado en condiciones de sequía o en suelos con un nivel inferior al óptimo de nutrimentos, de todas maneras tiene buena calidad de proteína o
- si el QPM puede perder su calidad, incluso cuando se le siembra en condiciones óptimas y no es contaminado con polen que no es QPM.

Estos argumentos han sido expuestos en debates en que se cuestiona si el QPM en realidad beneficia a su grupo-objetivo (es decir, a los agricultores de escasos recursos y a la gente que no puede costearse una dieta rica en proteína), ya sea por el hecho de incrementar sus utilidades o de mejorar su nutrición. Estas críticas son abordadas en las siguientes subsecciones.

6.1 Contaminación del QPM sembrado en campos de agricultores

- a) ¿Qué beneficios nutricionales obtiene el agricultor si su campo está rodeado por variedades que no son QPM? En el peor de los casos, se pueden plantear los siguientes argumentos a favor de la producción de QPM:
 - Si se siembra una hilera de QPM junto a una variedad que no lo es, el 50% del grano producido de todas maneras tendrá un alto contenido de lisina y triptófano, debido a que el polen que no es QPM compite en forma más o menos pareja con el polen QPM para polinizar la variedad QPM.
 - Cuando una parcela de QPM está rodeada por una variedad que no lo es, la proporción de polen normal a polen QPM, que llega a polinizar el maíz QPM, es de 4:1, y el productor puede esperar que por lo menos un 25% de su grano será QPM.
 - En una situación aún peor, cuando la proporción de polen normal a polen QPM es mayor, una pequeña parte del grano cosechado será QPM y beneficiará (aunque no mucho) la nutrición del agricultor y su familia. La proporción grano QPM:grano normal aumenta hacia el centro de la parcela. A medida que la gente vaya conociendo el QPM, y a medida que los agricultores y comunidades enteras empiecen a sembrar variedades QPM, los beneficios nutricionales seguramente aumentarán.

De hecho, se han efectuado varios estudios que abordan directamente estas inquietudes, cuyos resultados presentan un panorama aún más favorable. En un estudio de la contaminación del QPM realizado en Ghana (Ahenkora et al., 1999; Twumasi-Afriyie et al., 1996b), se sembró una parcela de un tercio de hectárea (aproximadamente) con Obatanpa, una variedad QPM de grano blanco, y se le rodeó completamente con una franja de 5 metros de ancho de una variedad normal de grano amarillo y la misma madurez. Los resultados de este experimento muestran que el 11% de todo el grano cosechado estaba contaminado al máximo. La contaminación máxima ocurrió dentro de los primeros 6 metros de la parcela QPM; a partir de ese punto, disminuyó de forma rápida hasta llegar al centro de la misma, situado a 30 metros de la variedad normal, donde casi no había contaminación. La dirección del viento también resultó importante, ya que la máxima contaminación se presentó en el QPM que estaba expuesto al viento.

Los resultados del estudio mostraron claramente que el grado de contaminación depende de:

- la proximidad del maíz normal al QPM;
- la sincronización de la floración de las variedades QPM con la de las normales;
- que el viento sople en dirección del QPM durante la polinización y
- el grado de competitividad del polen normal que se deposita en los estigmas del QPM.

Por lo tanto, en términos prácticos, el hecho de sembrar QPM junto a una parcela sembrada con maíz normal no significa que toda la cosecha será de grano normal; más bien, esto producirá niveles de contaminación entre 0 y 11%.

Cuando se analizaron en el laboratorio y en estudios de alimentación en ratas, mezclas físicas con proporciones distintas de grano QPM y grano normal, se encontró que la contaminación causaba que se perdieran los beneficios del QPM sólo si éste se mezclaba con más de 20% de grano normal (Ahenkora et al., 1999); éste es un nivel mayor de contaminación que el observado en campo (contaminación máxima: 11%).

Los estudios antes citados sugieren que los agricultores no pierden todo el beneficio del QPM bajo condiciones de cultivo normales, aunque haya parcelas de maíz normal en la cercanía.

b) ¿Qué debe hacer un agricultor que desea guardar semilla de su producción para sembrarla en el próximo ciclo? Este es un problema incluso para los agricultores que siembran una variedad mejorada que no es QPM entre variedades locales no mejoradas. Los estudios antes citados claramente sugieren que:

- en el caso de las VPL, los agricultores deben seleccionar la semilla que crece en el centro de sus parcelas, lejos de las posibles fuentes de contaminación;
- después de tres ciclos de cultivo, los agricultores deben comprar semilla fresca con el fin de renovar la pureza de la variedad; y
- estas recomendaciones deberían formar parte de los mensajes de extensión agrícola dirigidos no sólo a los productores de QPM, sino también a todos los productores de VPL, a fin de que aprovechen todos los beneficios de estos materiales mejorados.

6.2 Adopción y comercialización del QPM

- c) ¿Deben los agricultores esperar recibir un sobreprecio por su grano QPM?
- Los agricultores no deben esperar recibir un sobreprecio por su grano QPM en un mercado no especializado. Cualquier variedad QPM que el agricultor siembre tiene que poder competir, desde un punto de vista agronómico, con un testigo normal (es decir, tiene que rendir igual o más que las variedades normales). Por lo tanto, la venta de grano QPM genera mayores ganancias sólo si la variedad rinde más, ya que el beneficio nutricional permanece oculto. En la Figura 21 se muestra que es posible generar variedades QPM que rinden más que las variedades normales. Por lo tanto, ésta debe ser la primera estrategia de todos los programas genotécnicos que trabajan para zonas que no cuentan con mercados especializados. Sin embargo, hay zonas donde las organizaciones de asistencia alimentaria prefieren el maíz QPM al maíz normal; ahí los agricultores por lo menos tienen un mercado más seguro para su producto, aunque quizá no obtengan un sobreprecio.

d) Las siguientes estrategias se aplicaron de manera eficaz en Ghana a principios de la década de los 1990 (Twumasi-Afriyie et al., 1996a) a fin de asegurar que los compradores de maíz QPM y otros usuarios comerciales recibieran todo el beneficio de su calidad. Las siguientes estrategias fomentan la adopción del QPM, en especial en países donde éste apenas se empieza a sembrar:

- Sería conveniente escoger ciertas comunidades donde sólo se cultivará QPM (la variedad que prefieran).
- Aquellos productores de alimentos comerciales para consumo humano y animal que deseen utilizar maíz QPM, deben tratar exclusivamente con intermediarios que estén de acuerdo en entregarles maíz QPM de la calidad que requieren.
- Los intermediarios que comercializan QPM deben estar vinculados con comunidades que cultivan maíz QPM exclusivamente.

En general, se ha observado que una vez que, con base en su propia experiencia o en los mensajes de los servicios de extensión, los agricultores identifican el QPM como su tipo de maíz preferido, siempre guardan suficiente grano QPM para el consumo familiar y venden, más bien, los otros tipos de maíz que no prefieren.

6.3 Estabilidad de la calidad del QPM cultivado en suelos infértiles

e) Varios estudios han demostrado que el QPM cultivado en condiciones de escasez de nitrógeno tiene una menor cantidad de proteína. No obstante, la calidad de la proteína (es decir, los niveles de lisina y triptófano) no se ve afectada. En otras palabras, el QPM sigue siendo QPM aunque se cultive en suelos con poco nitrógeno. Otros estudios han encontrado que la calidad de la proteína también se mantiene cuando el QPM se cultiva en condiciones de sequía.

6.4 Estabilidad de la calidad del QPM no contaminado por maíz normal

f) En conclusión, se puede afirmar que el QPM no pierde su calidad de proteína a menos que sea contaminado por maíz normal.

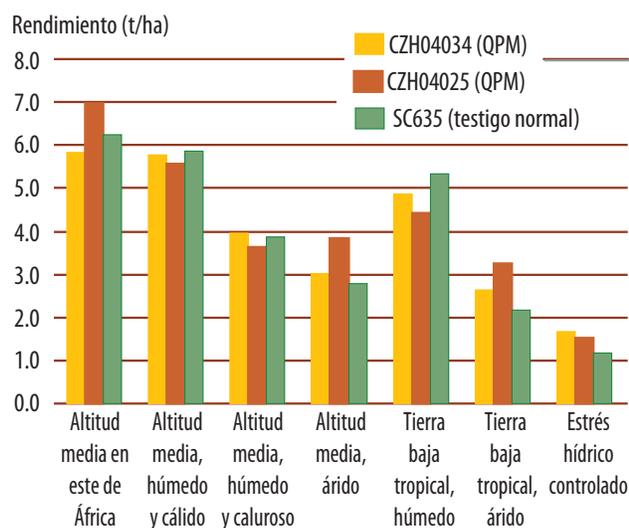


Figura 21. Comparación del comportamiento de dos híbridos QPM con un testigo comercial normal en 25 localidades del este y el sur de África, 2005.

7. Normas de la calidad de proteína

Cuadro 14. Criterios y normas de selección.

				Esquema 1	Esquema genotécnico	Esquema 2
Generación a sembrar		Seleccionar en mesa de luz cada ciclo; usar escala de		Análisis de laboratorio (siempre usar la mesa de luz para determinar la modificación adecuada y luego enviar al laboratorio)		Análisis de laboratorio (siempre usar mesa de luz para determinar la modificación adecuada y luego enviar al laboratorio)
Denominación	Ciclo	número	modificación:	Cruzas de prueba		Cruzas de prueba
A	B					
S1	F2	3	3			
↓	↓			Cruzar con el probador; si conoce el grupo heterótico, cruzar con probador del grupo opuesto; si no, cruzar con probadores A y B.	El primer análisis de triptófano en líneas puras.	
S2	S1	4	2 a 3			
↓	↓			Avanzar y probar sólo las líneas que muestran buena calidad.		Primer análisis de triptófano.
S3	S2	5	2 a 3			
↓	↓			Cruzar con otro germoplasma elite (ya sean líneas o cruzas simples, dependiendo de qué producto final se quiera lograr).	Segundo análisis de triptófano de las líneas puras.	Avanzar y probar sólo las líneas que muestren buena calidad.
S4	S3	6	2			
↓	↓			Avanzar y probar sólo las líneas que muestren buena calidad y se comportan bien en el primer ensayo.	Analizar el contenido de triptófano y proteína de los mejores híbridos que han sido vueltos a hacer para ensayarlos ampliamente (también incluir los progenitores).	Cruzar con otro germoplasma elite (ya sean líneas o cruzas simples, dependiendo del producto final que se quiera lograr) o volver a realizar los mejores híbridos de la prueba anterior para ensayos amplios.
S5	S4	7	2			
↓	↓			Cruzar con otro germoplasma elite (al menos 3 líneas o cruzas simples, dependiendo del producto final que se quiera lograr).		Analizar el contenido de triptófano y proteína de los mejores híbridos que se han vuelto a hacer para ensayarlos ampliamente (también incluir los progenitores).
S6	S5	8	2			
↓	↓			Ensayo de generación avanzada.	Determinar nivel de triptófano en la semilla híbrida.	Cruzar con otro germoplasma elite (al menos 3 líneas o cruzas simples, dependiendo del producto final que se quiera lograr) o volver a realizar los mejores híbridos de la prueba anterior.
S _n	S6	9	2			

7.1 continúa...

Generación a sembrar		Seleccionar en mesa de luz cada ciclo; usar escala de modificación:		Esquema 1		Esquema genotécnico		Esquema 2	
Denominación	Ciclo número			Análisis de laboratorio (siempre usar la mesa de luz para determinar la modificación adecuada y luego enviar al laboratorio)		Análisis de laboratorio (siempre usar mesa de luz para determinar la modificación adecuada y luego enviar al laboratorio)			
A	B			Cruzas de prueba		Cruzas de prueba			
↓	↓					Prueba de generación avanzada.		Analizar el nivel de triptófano de la semilla híbrida.	
Sn	Sn	10	2	<p>No incrementar las líneas puras muchas veces (más bien, incrementar en grandes lotes). En cada incremento, incluir al menos 10 surcos (para producir 10 kg de semilla por incremento). Seleccionar (per se) el mejor surco de los 10, para que sea la reserva del mejorador a largo plazo.^a Mezcle la semilla restante y envíela al laboratorio junto con la semilla del mejorador. Usar la mezcla de semilla para hacer los incrementos adicionales. Analizar el nivel de triptófano de cada incremento.</p>		<p>No incrementar las líneas puras muchas veces (más bien, incrementar en grandes lotes). En cada incremento, incluir al menos 10 surcos (para producir 10 kg de semilla por incremento). Seleccionar (per se) el mejor surco de los 10, para que sea la reserva del mejorador a largo plazo. Mezcle la semilla restante y envíela al laboratorio junto con la semilla del mejorador. Usar la mezcla de semilla para hacer los incrementos adicionales. Analizar el nivel de triptófano de cada incremento.</p>			
VPL e híbridos Sn	VPL e híbridos Sn			Analizar el contenido de triptófano y proteína del híbrido y los progenitores puros. Tomar 5 a 10 muestras de las VPL para el análisis.		Analizar el contenido de triptófano y proteína del híbrido y los progenitores endógamos. Tomar 5 a 10 muestras de las VPL para el análisis.			

^a La pureza de las líneas elite se puede comprobar sembrando de 100 a 200 plantas y dejándolas crecer hasta el nivel de la rodilla. El nivel de contaminación puede determinarse con este método.

7.1 Preparación de las muestras para el análisis de laboratorio

Codifique las muestras (por ejemplo, Entrada 1, Entrada 2, etc.) que serán enviadas al laboratorio de manera que la genealogía o el nombre de la muestra no influya en la persona que realiza el análisis.

Enviar 20 granos de las líneas puras y los híbridos, y 50 de las VPL.

Enviar las muestras en 2 ó 3 repeticiones (se recomienda enviar 5 repeticiones de las VPL).

Siempre incluir un testigo normal y uno de QPM ya conocido.

Niveles básicos en los resultados de laboratorio

	Niveles mínimos	
	Grano entero	Endospermo
Triptófano en la muestra	0.075%	0.070%
Proteína	8% ^a	8% ^a
Índice de calidad ^b	0.8	0.7

^a Un nivel de proteína mayor al 8% es deseable, pero hay que asegurarse que el índice esté por arriba del mínimo.

^b Triptófano en la muestra/proteína en la muestra.

8. Métodos nuevos

Durante la conversión de líneas normales utilizando retrocruzas, se requiere una generación autopolinizada entre cada retrocruza para recuperar el alelo *o2* recesivo antes de seleccionar la dureza del endospermo y los loci modificadores de los aminoácidos. Por lo tanto, se necesitan siete ciclos para completar la conversión a QPM y obtener semilla BC3, en comparación con los cuatro ciclos (Krivanek y Vivek, 2006) que usualmente se requieren para mejorar, por ejemplo, la resistencia a enfermedades de una línea normal. Una posible solución a este problema sería utilizar marcadores moleculares para identificar el gene *o2*, tema del presente capítulo.

8.1 Selección con la ayuda de marcadores moleculares (MAS)

8.1.1 Marcadores moleculares del gene *opaco-2*⁵

En años recientes, ha surgido la posibilidad de aplicar selección con la ayuda de marcadores moleculares (MAS, sus siglas en inglés) para acelerar la selección del alelo *opaco-2* en el mejoramiento del QPM. Existen tres marcadores (SSR) disponibles al público para este propósito: phi57, phi112 y umc 1066, (J.M. Ribaut, comunicación personal), cuyas secuencias se encuentran en la base de datos de maíz (<http://www.agron.missouri.edu/ssr.html>) y se pueden pedir a cualquier empresa que sintetice oligos (por ejemplo, Research Genetics: info@resgen.com). Estos tres marcadores se encuentran dentro del gene *opaco-2*, lo cual significa que existe una correlación muy alta entre los datos de los marcadores y la expresión fenotípica.

El gene *opaco-2* tiene alrededor de 4000 bases de ADN, incluidos los intrones y los exones, y la diferencia entre un alelo mutante del *opaco-2* y uno "normal" puede variar de 50 bases hasta sólo 2 ó 3. Tales diferencias en la composición del ADN se localizan en distintas partes de la secuencia de genes. Los tres marcadores PCR amplifican hasta 300 bases en tres lugares distintos y, dependiendo de

la posición de la diferencia en el ADN entre los dos alelos de una cruce dada, es posible que se detecte un polimorfismo.

Para utilizar los marcadores moleculares para encontrar el *o2o2* en una familia o población segregante, es indispensable contar con un polimorfismo para uno de los tres SSR disponibles, es decir, una diferencia entre el tamaño (longitud) del fragmento de ADN del donador (QPM) y el receptor (progenitor recurrente). En la actualidad, se lleva a cabo en el CIMMYT la selección del *opaco-2* con ayuda de marcadores en cruces entre dos líneas puras; por lo tanto, necesitamos contar con un polimorfismo entre dos alelos, uno de cada línea. En una cruce dada, es esencial que los marcadores se corran, primero, en los dos progenitores, a fin de confirmar los polimorfismos (diferencias de tamaño) en los alelos marcadores. A veces, los dos progenitores comparten los mismos alelos marcadores y, en esos casos, es necesario probar uno de los dos marcadores restantes.

En el caso de una VPL, que es una mezcla de genotipos, puede haber en la población entre 3 y 10 alelos en el locus del marcador, porque no está fijo. Por lo tanto, la probabilidad de que un solo alelo de una línea QPM sea diferente de los numerosos alelos presentes en una VPL, es menor que la probabilidad de encontrar un polimorfismo entre las líneas. En el primer caso, se compara un alelo con un promedio de seis alelos; en el segundo, un alelo es comparado con otro. Esto significa que es posible que más de un marcador SSR tenga que ser evaluado para definir un "haplotipo" (o, en otras palabras, los alelos específicamente diferentes en tres marcadores distintos) característico del progenitor QPM.

Uno de los marcadores, phi112, es dominante e identifica genotipos que no portan un alelo *o2* recesivo, lo cual significa que identificará genotipos normales (*O2O2*) y heterocigotos (*O2o2*). En consecuencia, el mejorador podría suponer que los otros genotipos son del tipo homocigoto recesivo (*o2o2*) deseado. No obstante, en distintas genealogías

⁵ Gran parte de esta sección fue redactada a partir de las comunicaciones personales (por correo electrónico) entre J.M. Ribaut (Centro de Biotecnología Aplicada del CIMMYT en México) y Kevin Pixley (CIMMYT, México), y de las comunicaciones personales con Kevin Pixley y D.J. Skinner (Centro de Biotecnología Aplicada del CIMMYT en México).

del germoplasma de maíz del CIMMYT, algunas líneas *o2o2* también presentan una banda con este marcador. Por lo tanto, cuando se utilizan marcadores para distinguir genotipos *o2o2* de los *O2o2* y *O2O2*, el progenitor donador y el receptor (ya sea una línea o una VPL) deben ser claramente definidos mediante la caracterización de genotipo con base en marcadores, antes de realizar la selección, y posiblemente haya que usar numerosos marcadores SSR para seleccionar las progenies *o2o2* en la familia segregante subsecuente.

8.1.2 Limitaciones en el uso de marcadores moleculares en el mejoramiento genético

La ventaja de MAS es que se usa tejido foliar de las plántulas para extraer el ADN y efectuar la prueba; por consiguiente, es posible completar la selección de los genotipos deseados antes de la floración y después sólo polinizar las plantas seleccionadas. Aunque en el CIMMYT se ha aplicado MAS con el genotipo *o2o2* y se le ha comparado con otros métodos (Dreher et al., 2003), MAS aplicado en el genotipo QPM presenta actualmente dos problemas: la efectividad y el costo (Krivanek et al., 2007).

Como se mencionó anteriormente, uno de los tres marcadores existentes es dominante y no amplifica el alelo *opaco-2*. Por consiguiente, este marcador es adecuado para identificar los alelos mutantes homocigotos del *opaco-2* que se requieren para el QPM. El marcador no distingue entre los genotipos con alelos normales heterocigotos y los que tienen alelos normales homocigotos, debido a que en ambos casos, el ADN se amplifica y se produce una banda. Con base en la experiencia en el CIMMYT, este marcador funciona con la mayoría de las líneas QPM tropicales; sin embargo, también se han encontrado unas cuantas líneas QPM que presentan una banda con este marcador. Esto significa que puede haber más de un alelo del *opaco-2* presente en el germoplasma del CIMMYT, ya que las líneas que se utilizaron en esas pocas cruzas eran QPM.

Se llevó a cabo MAS para seleccionar el alelo *o2* en un estudio dirigido a acelerar la conversión de genotipos con endospermo normal al genotipo *o2o2* mediante el retrocruzamiento (Babu et al., 2005) y, al parecer, éste fue un uso apropiado de dicha técnica.

Sin embargo, si no se seleccionan al mismo tiempo los modificadores de aminoácidos, la calidad de proteína puede disminuir considerablemente, aun en materiales con el *o2o2*. En el estudio de Babu et al. (2005), se encontró que el contenido de triptófano como porcentaje del contenido total de proteína disminuyó del 1.05% en la línea donadora QPM al 0.78 ó 0.85% en las familias BC_2F_2 . Esta reducción de la calidad de proteína cuando no se seleccionan los modificadores de aminoácidos, se ha observado también en el programa de mejoramiento de QPM del CIMMYT, lo cual no es sorprendente, considerando la gran variación de niveles de lisina en genotipos *o2o2* que provienen de genealogías distintas (Moro et al., 1996). También se ha encontrado que se pierde la modificación de la dureza del endospermo en líneas derivadas del retrocruzamiento directo que han sido evaluadas en el CIMMYT. Para que la aplicación de MAS al QPM sea plenamente eficaz (es decir, que su uso reduzca el tiempo que tarda el fitomejoramiento y permita la selección en ambientes no objetivo, etc.), es necesario identificar una serie de marcadores eficaces vinculados a los loci que modifican tanto los niveles de aminoácidos como la dureza del endospermo (Krivanek y Vivek, 2006). Asimismo, es probable que se requiera combinar la selección de otras características con la selección de QPM para que MAS pueda competir en cuanto a los costos con los métodos tradicionales.

En la actualidad, es posible sembrar cualquier semilla de maíz en el campo, autopolinizarla, y determinar su genotipo y sus características de semilla (tales como las del QPM) a un costo de EUA\$ 0.24 por planta (suponiendo 25 plantas y un costo total de \$6 por surco). Actualmente, los costos de caracterizar el genotipo con base en marcadores moleculares son considerablemente mayores: entre EUA\$ 0.50 y 2.50 por planta. No obstante, si se logra la meta de seleccionar numerosas características a la vez, los costos totales de utilizar MAS estarán más de acuerdo con los de los métodos tradicionales de selección.

Es preciso tener en mente que no existen marcadores para la modificación del endospermo y que, por lo tanto, ésta tiene que ser seleccionada en la mesa de luz.

9. Conclusión

El fitomejoramiento es un procedimiento continuo que no termina nunca, y transcurre un lapso de tiempo considerable entre el inicio de un proyecto y la obtención del producto final. En un programa genotécnico adecuado, siempre hay germoplasma en distintas etapas de desarrollo (desde los inicios del mejoramiento, F2, S1...hasta los productos finales que están siendo ensayados y su semilla incrementada) en cada ciclo. Cualquier interrupción de esta cadena (por ejemplo, si no se inicia un nuevo ciclo de mejoramiento en una temporada dada) puede ocasionar que en el futuro haya un ciclo en que no se entregue un producto final. Por eso, “lo peor que se puede hacer en el fitomejoramiento es no hacer nada”.

No existe ningún método genotécnico que sea absolutamente correcto o absolutamente equivocado. Lo fundamental es que el método escogido aumente al máximo las probabilidades de generar una buena variedad *con los recursos disponibles*.

El fitomejoramiento es más bien un arte que una ciencia. Un buen entendimiento de la ciencia de la fitotecnia y la genética, y su correcta aplicación, contribuyen a aumentar las probabilidades de lograr el éxito. No obstante, cabe señalar que existen varios ejemplos notables de mejoradores con una preparación técnica mínima que lograron grandes avances aplicando las habilidades que aprendieron gracias a la experiencia práctica.

“El éxito de un programa genotécnico depende de cuánto material se descarta.”

Anónimo

10. Referencias bibliográficas

- Ahenkora, K., S. Twumasi-Afriyie, P.Y.K. Sallah y K. Obeng-Antwi. 1999. Protein nutritional quality and consumer acceptability of tropical Ghanaian quality protein maize. *Food and Nutrition Bulletin* 20:354-360. Universidad de las Naciones Unidas.
- Akuamo-Boateng, A. 2002. Quality Protein Maize: Infant Feeding Trials in Ghana. Servicio de Salud de Ghana, Ashanti, Ghana.
- AOAC. 1980. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 13ava edición, p. 15.
- Babu, R., S.K. Nair, A. Kumar, S. Venkatesh, J.C. Sekhar, N.N. Singh, G. Srinivasan y H.S. Gupta. 2005. Two-generation marker-aided backcrossing for rapid conversion of normal maize lines to quality protein maize (QPM). *Theoretical and Applied Genetics* 111:888-897.
- Bänziger, M., G.O. Edmeades, D. Beck y M. Bellon. 2000. Breeding for Drought and N Stress Tolerance in Maize: From Theory to Practice. México, D.F.: CIMMYT.
- Beck, D. 1999. Management of maize seed production fields. En: *Maize Seed Production Manual*. Nairobi, Kenia: CIMMYT.
- Bjarnason, M. y S.K. Vasal. 1992. Breeding of quality protein maize (QPM). *Plant Breeding Review* 9:181-216.
- Bressani, R. 1992. Nutritional value of high-lysine maize in humans. En: E.T. Mertz (ed.). *Quality Protein Maize*. Asociación Americana de Química de Cereales, St. Paul, MN, EUA.
- Burgoon, K.G., J.A. Hansen, D.A. Knabe y A.J. Bockholt. 1992. Nutritional value of quality protein maize for starter and finisher swine. *Journal of Animal Science* 70:811-817.
- Crow, J.F. y J. Kermicle. 2002. Oliver Nelson and quality protein maize. *Genetics* 160:819.
- Dreher, K., M. Khairallah, J.M. Ribaut y M. Morris. 2003. Money matters (I): Costs of field and laboratory procedures associated with conventional and marker-assisted maize breeding at CIMMYT. *Molecular Breeding* 11:221-234.
- Gibbon, B.C. y B.A. Larkins. 2005. Molecular genetic approaches to developing quality protein maize. *Trends in Genetics* 21:227-233.
- Hernández, H.H. y L.S. Bates. 1969. A modified method for rapid triptophan analysis in maize. *CIMMYT Research Bulletin* no. 13. México, D.F.: CIMMYT.
- Huang, S., A. Frizzi, C. Florida, D. Kruger y M. Luethy. 2006. High lysine and high triptophan transgenic maize resulting from the reduction of both 19- and 22-kD alpha-zeins. *Plant Molecular Biology* 61:525-535.
- Krivanek, A. y B. Vivek. 2006. Science behind breeding QPM. México, D.F.: CIMMYT.
- Krivanek, A.F., H.D. Groote, N.S. Gunaratna, A.O. Diallo y D. Friesen. 2007. Breeding and Disseminating Quality Protein Maize (QPM) for Africa. En revisión para publicarse en el *African Journal of Biotechnology*.
- Millward, D. y J.P.W. Rivers. 1989. The need for indispensable amino acids: The concept of the anabolic drive. *Diabetes Metabolism Review* 5:191-212.
- Moro, G.L., J.E. Habben, B.R. Hamaker y B.A. Larkins. 1996. Characterization of the variability in lysine content for normal and opaque-2 maize endosperm. *Crop Science* 36:1651-1659.
- Nkonge, C. y M. Balance. 1982. A sensitive colorimetric procedure for nitrogen determination in Micro-Kjeldahl digests. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 30:416-420.
- Nurit, E., A. Tiessen, A. Krivanek, K. Pixley y N. Palacios-Rojas. 2007. An alternative colorimetric method for triptophan determination in maize kernels. (En preparación.)
- Opienska-Blauth, J., M. Charenzinsky y H. Berbec. 1963. A new rapid method of determining triptophan. *Rep. Analytical Biochemistry* 6:69.
- Orman, B. y R. Schumann. 1991. Comparison of near-infrared spectroscopy calibration methods for the prediction of protein, oil, and starch in maize grain. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 39:883-886.
- Piombo, G. y Y. Lozano. 1980. Automated procedure for routine analysis of triptophan in cereals and legumes. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 28:489-496.
- Prasanna, B.M., S.K. Vasal, B. Kassahun y N.N. Singh. 2001. Quality protein maize. *Current Science* 81:1308-1319.
- Scott, P., S. Bhatnagar y J. Betrán. 2004. Triptophan and methionine levels in quality protein maize breeding germplasm. *Maydica* 49:303-311.
- Tsai, C.Y., L.W. Hansel y O.E. Nelson. 1972. A colorimetric method of screening maize seeds for lysine content. *Cereal Chemistry* 49:572-579.
- Twumasi-Afriyie, S., B.D. Dzah y K. Ahenkora. 1996a. Why QPM moved in Ghana. Pp. 28-31 en: J. K. Ransom et al. (eds.). *Quinta Conferencia de Maíz en el Este y Sur de África*, Arusha, Tanzania.
- Twumasi-Afriyie, S., K. Ahenkora, P.Y.K. Sallah, M. Frempong y A. Agyemang. 1996b. Effect of extraneous pollen from normal maize in adjoining fields on the nutritional quality of quality protein maize. 12avo Simposio Sudafricano sobre el Mejoramiento de Maíz, Pietermaritzburg, República Sudafricana.
- Vasal, S.K., H. Cordova, D.L. Beck y G.O. Edmeades. 1997. Choices among breeding procedures and strategies for developing stress tolerant maize germplasm at CIMMYT. Pp. 336-347 en: Edmeades, G.O., Bänziger, M., Michelson, H.R. y Peña-Valdivia, C.B. (eds.). *Developing Drought and Low N-Tolerant Maize*. Memorias de un simposio, 25 a 29 de marzo, 1996. México, D.F.: CIMMYT.
- Vietmeyer, N.D. 2000. A drama in three long acts: The story behind the story of the development of quality-protein maize. *Diversity* 16:29-32.
- Villegas, E., E. Ortega y R. Bauer. 1984. Métodos químicos usados en el CIMMYT para determinar la calidad de proteína de los cereales. México, D.F.: CIMMYT.
- Villegas, E., S.K. Vasal y M. Bjarnason. 1992. Quality protein maize - What is it and how was it developed. Pp. 27-48 en: E.T. Mertz, ed. *Quality Protein Maize*. Asociación Americana de Química de Cereales, St. Paul, MN, EUA.
- Wallace, J.C., M.A. Lopes, E. Paiva y B.A. Larkins. 1990. New methods for extraction and quantitation of zeins reveal a high content of gamma-zein in modified opaque-2 maize. *Plant Physiology* 92:191-196.

11. Apéndice

11.1 Lo que el QPM puede contribuir a la nutrición humana⁶

En esta sección se presenta una breve reseña de obras publicadas que tratan de los beneficios que aporta el QPM a la nutrición humana. Resulta vasta y complicada la literatura sobre la importancia de las distintas formas de la desnutrición humana, y las mejores maneras de remediarlas, y preguntas aparentemente sencillas con frecuencia son difíciles de responder debido a la relación que existe entre la pobreza, las distintas formas de desnutrición, otros problemas de salud y la enorme variación de la dieta humana. Sin embargo, como se anota a continuación, existe un acervo significativo de pruebas científicas que confirma que la aportación del QPM a la nutrición humana es significativa y útil.

11.1.1 El valor biológico del QPM

El valor biológico de la proteína se estima con base en la proporción promedio de la proteína absorbida que el cuerpo retiene y destina a su mantenimiento y crecimiento. El valor biológico está estrechamente ligado a la calidad de proteína, que, en el caso del maíz, está limitada en gran parte por las bajas concentraciones de los aminoácidos lisina y triptófano. El QPM contiene el *opaco-2*, mutante de un solo gene que altera la composición proteínica de la porción del endospermo del grano y que casi duplica las concentraciones de lisina y triptófano. En por lo menos cuatro estudios en niños y cuatro en adultos, se encontró que los participantes que consumieron QPM retuvieron una cantidad significativamente mayor de nitrógeno que aquellos que consumieron maíz normal (Bressani, 1991), lo cual indica que la proteína del QPM es más “biodisponible” (NRC, 1988). El valor biológico de la proteína del QPM es alrededor del 80%, el de la leche se sitúa cerca del 90% y el del maíz normal es alrededor del 45% (FAO, 1992).

Los expertos llegaron a la conclusión de que:

“Son contundentes los datos que demuestran la superioridad nutricional del QPM sobre el maíz normal en la nutrición humana” (Bressani, 1991).

“Las pruebas surgidas de estudios tanto en niños como en adultos claramente indican la superioridad del maíz opaco-2 al maíz normal” (FAO, 1992).

11.1.2 El vínculo entre la situación económica, la calidad de la dieta, la proteína y la desnutrición por falta de lisina

El vínculo entre la situación económica y la calidad de la dieta es intuitivo y está bien documentado. Las comparaciones entre el producto interno bruto (PIB) per cápita y las hojas del balance de alimentos indican que existe una asociación entre una mejor situación económica y el consumo de un mayor número de calorías, más proteína, más proteína animal, menos proteína proveniente de cereales y mucho más lisina (Pellet y Ghosh, 2004; Young y Pellet, 1990). La proteína animal tiene un mayor valor biológico que la proveniente de cereales; entre el 60 y el 70% de la proteína que los habitantes de los países ricos consumen es de origen animal y menos del 20% proviene de los cereales. Esta proporción suele ser a la inversa en los países de escasos recursos.

Se ha argumentado que una dieta mejorada y más diversa constituye una mejor solución a la desnutrición que los cereales con alto contenido de lisina, como el QPM. Sin embargo, la dieta de los consumidores pobres en regiones donde el maíz es el alimento básico no necesariamente está mejorando. En Bangladesh, por ejemplo, los precios de los granos básicos han disminuido en un 40%, en tanto que los del pescado, la carne y los alimentos vegetales no básicos han incrementado entre 75 y 100% en los últimos 30 años. La gente de pocos recursos que obtiene la mayor parte de la proteína que consume a partir de los cereales, no tiene los medios para comprar carne y leguminosas y, por lo tanto, corre un riesgo más elevado de padecer deficiencia de lisina.

Los expertos llegaron a la conclusión de que:

“El QPM puede brindar una red de seguridad parcial a los consumidores pobres cuando, por razones económicas, sociales o ambientales, éstos tienden a consumir una mayor cantidad de cereales básicos” (Rahmanifar y Hamaker, 1999).

⁶ Boletín generado para crear conciencia de los beneficios del QPM para los seres humanos. Kevin Pixley y Marianne Banziger, 2006, com. pers.

11.1.3 Desnutrición proteínica en países donde el maíz es el alimento básico

El consumo per cápita de maíz es particularmente alto en el este y sur de África y en América Central; sin embargo, también es el alimento básico de la gente pobre que vive en varios países de África occidental, Asia y América del Sur. En decenios recientes, los nutriólogos han debatido y modificado los requerimientos de proteína y lisina que se recomienda incluir en una alimentación saludable. Con base en las recomendaciones emitidas por la FAO y la OMS en 1991, y también en las revisiones de éstas que se publicarán dentro de poco, se estima que "...es posible que una proporción significativa de los habitantes de África estén en riesgo de presentar deficiencia de lisina" (Pellet y Ghosh, 2004). Es importante señalar que se establecen recomendaciones alimentarias con base en las necesidades de personas sanas, pero los requerimientos de proteína pueden variar según el caso. Por ejemplo, son bastante mayores en niños que necesitan crecer para alcanzar la estatura normal o que se están recuperando de infecciones que son usuales en comunidades pobres (Chupad et al., 2003; Rahmanifar y Hamaker, 1999).

El consumo de maíz per cápita en Malawi (casi 150 kg al año) se sitúa entre los más altos en el mundo. Se informó en un estudio reciente que, en Malawi, del 70 al 83% de niños pobres de 2 a 5 años de edad presentan baja estatura; otro estudio de 12 meses de duración encontró que el diagnóstico más frecuente en el 11% de todos los niños ingresados en los hospitales en la ciudad de Blantyre localizada en el sur de Malawi, fue la desnutrición (Brewster et al., 1997). El principal tratamiento para estos

niños desnutridos era la leche, pero cuando se interrumpieron los suministros de leche en polvo, los hospitales tuvieron que buscar otras soluciones alimentarias. Aunque en este estudio no se utilizó el QPM, éste fue citado como "otra opción" para reemplazar la leche en la alimentación de niños en recuperación; también se le citó porque podría contribuir a reducir la desnutrición, en el caso de que el QPM fuera a reponer el maíz normal como alimento básico de Malawi.

Estudios recientemente efectuados en China y Pakistán demostraron que cuando las dietas basadas en cereales (en este caso, el trigo) son enriquecidas con lisina, esto acelera el crecimiento de los niños y mejora varios otros indicadores de buena salud en niños y adultos, lo cual confirma que el enriquecer este tipo de dietas con lisina sigue siendo beneficioso para algunas poblaciones (Hussain et al., 2004; Pellet y Ghosh, 2004; Zhao et al., 2004). De igual manera, estudios recientes en niños, realizados en Ghana y México, han documentado mayor crecimiento y mejor salud en niños que consumen QPM en vez de maíz normal (Akuamo-Boateng, 2002; Morales-Guerra, 2002).

Los expertos llegaron a la conclusión de que:

"Las ventajas nutricionales del QPM, comparadas con las del maíz normal, son de tal magnitud que deben aprovecharse en beneficio de los niños en países de escasos recursos donde se consume maíz" (Graham et al., 1989).

"...al parecer existen razones de peso para continuar la investigación dirigida a incrementar la producción de leguminosas y de cereales con alto contenido de lisina, y también para aumentar el volumen y mejorar la eficiencia de la producción de alimentos que contienen proteína animal" (Young y Pellet, 1990).

11.1.4 Referencias bibliográficas

- Akuamo-Boateng, A. 2002. Quality protein maize infant feeding trials in Ghana. Servicio de Salud de Ghana. Ashanti, Ghana.
- Bressani, R. 1991. Protein quality of high-lysine maize for humans. *Cereal Foods World* 36:806-811.
- Brewster, D.R., M.J. Manary, I.S. Menzies, R.L. Henry y E.V. O'Loughlin. 1997. Comparison of milk and maize-based diets in kwashiorkor. *Arch. Dis. in Childhood* 76:242-248.
- Chupad, A.V., M.M. Regan, D. Nazareth, S. Nagaraj, J. Gnanou y V.R. Young. 2003. Intestinal parasites increase the dietary lysine requirements in chronically undernourished Indian men. *Am. J. Clin. Nutr.* 78:1145-51.
- FAO. 1992. Maize in human nutrition. FAO, Rome.
- Graham, G.G., J. Lembcke, E. Lancho y E. Morales. 1989. Quality protein maize: Digestibility and utilization by recovering malnourished infants. *Pediatrics* 83:416-421.
- Hussain, T., S. Abbas, M.A. Khan y N.S. Scrimshaw. 2004. Lysine fortification of wheat flour improves selected indices of the nutritional status of predominantly cereal-eating families in Pakistan. *Food and Nutr. Bull.* 25:114-122.
- Morales-Guerra, M. 2002. Efecto del consumo de maíz de alta calidad proteínica en niño(a)s de familias indígenas de las regiones Mazateca y Mixe del Estado de Oaxaca. Tesis de doctorado, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Edo. de Mexico.
- National Research Council. 1988. Quality Protein Maize. National Academy Press, Washington, D.C.
- Pellett, P.L. y S. Ghosh. 2004. Lysine fortification: Past, present y future. *Food and Nutr. Bull.* 25:107-113.
- Rahmanifar, A. y B.R. Hamaker. 1999. Potential nutritional contribution of quality protein maize: A close-up on children in poor communities. *Ecol. of Food and Nutr.* 38:165-182.
- Young, V.R. y P.L. Pellett. 1990. Current concepts concerning indispensable amino acid needs in adults and their implications for international nutrition. *Food and Nutr. Bull.* 12: No. 4. (<http://www.unu.edu/unupress/food/8F124e/8F124E00.htm>).
- Zhao, W., F. Zhai, D. Zhang, Y. An, Y. Liu, Y. He, K. Ge y N.S. Scrimshaw. 2004. Lysine-fortified wheat flour improves the nutritional and immunological status of wheat-eating families in northern China. *Food and Nutr. Bull.* 25:123-129.

Para mayor información:

Por favor dirija sus preguntas a Marianne Bänziger (m.banziger@cgiar.org) o Kevin Pixley (k.pixley@cgiar.org), Programa de Maíz, CIMMYT.

11.2 Protocolos de laboratorio

Los protocolos presentados a continuación son los que se aplican en el Laboratorio de Nutrición Vegetal y Suelos (SPAL) del CIMMYT. Sin embargo, ahora se están actualizando las metodologías, incluyendo la modificación del método colorimétrico para el análisis de triptófano con base en la reacción Hopkins-Cole (Nurit et al., 2007, en preparación) y el uso de la reflectancia cercana al infrarrojo para estudiar la composición de proteínas y aminoácidos (Orman y Schumann, 1991). La mayor ventaja del método modificado es que elimina la necesidad de utilizar el ácido acético, una sustancia química que, para muchos laboratorios, ha resultado muy difícil de obtener con la calidad requerida (pureza). Otros factores que han motivado la actualización del método modificado son: acelerar la obtención de resultados, mejorar la sensibilidad del análisis y reducir los costos del mismo. Los interesados en conocer en detalle los resultados de las metodologías actualizadas pueden comunicarse con el SPAL del CIMMYT (n.palacios@cgiar.org).

11.2.1 Determinación de nitrógeno

La determinación de nitrógeno se basa en un método colorimétrico en el cual el color verde esmeralda se forma por la reacción del salicilato y el hipoclorito con el amoníaco.

11.2.1.1 La determinación de nitrógeno con el método del Autoanalizador II de Technicon

Digestión de las muestras:

1. Pesar 40 mg de la muestra molida. Incluir dos muestras testigo.
2. Colocar la muestra en el fondo de un tubo de digestión de 75 ml.
3. Incluir uno o dos tubos con blancos (vacíos, sin muestra) para la digestión.
4. A cada tubo, agregar 2.0 g de la mezcla catalizadora y 2.5 ml de H₂SO₄ concentrado. Dejarlo hasta que cese la reacción.
5. Digerir durante 90 min bajo la campana de extracción en un bloque de digestión pre-calentado a 380 °C.

Análisis de las muestras:

6. Sacar la rejilla de tubos del bloque de digestión; dejarlos enfriar a temperatura ambiente y luego agregar 75 ml de agua destilada para evitar la formación de cristales. Asegurarse que la solución de digestión esté totalmente clara, no turbia.
7. Cerrar bien los tubos con una tapa de hule (goma) y mezclar invirtiéndolos varias veces.
8. Transferir 2 ml de la solución a los frascos del Technicon y colocar las muestras en el Autoanalizador Technicon.
9. Establecer la línea base ajustando, mediante la bomba, el flujo de cada uno de los cuatro reactivos: las mezclas de reactivos 1, 3 y 4, y el hipoclorito de sodio.
10. Ajustar el graficador a 0% utilizando los blancos.
11. Correr los cuatro tubos con blancos y volver a revisar la línea base de 0%.
12. Correr cuatro tubos con 20 µg N/ml de solución estándar y poner el pico a 70% en el graficador.
13. Correr las muestras testigo y las desconocidas.

Preparación de la solución estándar:

1. Preparar 100 µg/ml de una solución de sulfato de amonio y agua destilada.
2. Cada vez que se analizan muestras, hacer una solución de sulfato de amonio 20 µg/ml utilizando los blancos.

Cálculo del porcentaje de nitrógeno:

- 20 µg N/ml se ajusta al 70% en el graficador, de modo que:
1% en el graficador = 0.2857 µg N/ml de digestión
µg N/ml de digestión = % lectura del graficador x 0.2857 µg N/ml
- o
µg N en 75 ml de digestión = % lectura del graficador x 0.2857 µ x 75

Factor de cálculo = $\frac{20 \mu\text{gN/ml} \times \text{Volumen digerido} \times 100\%}{\text{Escala establecida} \times 1000}$

$$\% \text{ N} = \frac{2.1427 \times \text{lectura del graficador}}{\text{Peso de la muestra (mg)}}$$

Recomendaciones especiales:

1. Se puede usar jabón para lavar los tubos de digestión, pero hay que asegurarse de quitar todo el residuo con agua deionizada.
2. Si fuera necesario, las muestras digeridas se pueden almacenar a temperatura ambiente, protegidas del aire, durante un máximo de 7 días antes de analizarlas. Sin embargo, es mejor analizar las muestras digeridas lo antes posible.
3. Limpiar los frascos del Technicon lavándolos 3 ó 4 veces sólo con agua deionizada. No utilizar jabón.
4. Siempre se incluyen por lo menos dos controles (normal y QPM) en cada juego de 34 muestras que se analiza.
5. Calibrar el Technicon cada vez que se van a realizar mediciones.

Apéndice: Cuadro 1. Reactivos utilizados en la determinación de nitrógeno con el Autoanalizador Technicon.

Reactivo/mezcla	Reactivos específicos	Preparación	Recomendaciones especiales
Sulfato de amonio (100 µg/ml)		Pesar 1.179 g y disolver en 250 ml de agua destilada.	Almacenar a 4 °C durante un mes, como máximo. Guardar en un recipiente protegido de la luz.
Ácido sulfúrico (grado analítico, al 98%)			Almacenar a temperatura ambiente en un recipiente protegido de la luz.
Mezcla catalizadora	Sulfato de potasio Selenio	Mezclar muy bien 1 kg de K ₂ SO ₄ con 5 g de selenio.	Manejar con sumo cuidado; el selenio es muy peligroso. Almacenar a temperatura ambiente.
Mezcla de reactivos 1	Cloruro de sodio Ácido sulfúrico Brij 35 purificado	Disolver 200 g de cloruro de sodio, 15 ml de ácido sulfúrico y 2 ml de Brij 35. Agregar agua destilada hasta obtener un volumen de 2 L.	Almacenar a temperatura ambiente.
Mezcla de reactivos 2	Fosfato de sodio dibásico anhidro Hidróxido de sodio	Disolver 71 g de fosfato de sodio dibásico anhidro y 20 g de hidróxido de sodio. Agregar agua destilada hasta obtener un volumen de 1 L.	Almacenar a temperatura ambiente.
Tartrato de potasio 880 mM	Potasio L- tartrato tetra-hidratado	Disolver 200 g de tartrato de potasio en 1 L de agua destilada.	Almacenar a temperatura ambiente.
Hidróxido de sodio 5 M	Hidróxido de sodio	Disolver 200 g de hidróxido de sodio en 1 L de agua destilada.	Almacenar a temperatura ambiente.
Mezcla de reactivos 3	Mezcla de reactivos 2 Potasio L-tartrato tetra-hidratado 880mM Hidróxido de sodio 5 M Brij 35	Mezclar 400 ml de la mezcla de reactivos 2, 500 ml de tartrato de potasio 880 mM, 500 ml de hidróxido de sodio 5 M y 1 ml de Brij 35. Agregar agua destilada hasta obtener un volumen de 2 L.	Almacenar a temperatura ambiente en la oscuridad durante 15 días, como máximo.
Mezcla de reactivos 4	Salicilato de sodio (al 99.5%) Nitroprusiato de sodio Brij 35	Disolver 300 g de salicilato de sodio (al 99.5%) y 600 mg de nitroprusiato de sodio. Agregar 2 ml de Brij 35 y agregar agua destilada hasta obtener un volumen de 2 L.	Almacenar a temperatura ambiente en la oscuridad.
Hipoclorito de sodio	Hipoclorito de sodio	Usar 6 ml de hipoclorito de sodio y agregar agua destilada hasta obtener un volumen de 100 ml.	Almacenar a temperatura ambiente en la oscuridad.
Sulfato de amonio (100 µg/ml)	Sulfato de amonio	Disolver 10 mg de sulfato de amonio en 100 ml de agua destilada.	Almacenar a 4 °C. Permanece estable durante un mes.

Apéndice: Cuadro 2. Problemas que pueden surgir en la determinación de nitrógeno con el Autoanalizador Technicon, y sus posibles soluciones.

Problema	Posibles soluciones
Línea base demasiado alta o variable	Revisar que todos los reactivos estén siendo bombeados en el sistema. Si se preparó un nuevo reactivo, asegurarse que se hizo correctamente. Preparar nuevos reactivos.
Cambios en los valores de las muestras testigo	Pesar las muestras con precisión. Asegurarse que las muestras fueron digeridas por completo. Asegurarse que la mezcla de reactivos 3 no se oxidó. Si está oxidada, preparar una mezcla nueva. Verificar la calidad de los reactivos. Preparar otros.
Solución de digestión turbia	Asegurarse que la muestra se encuentre en el fondo del tubo. Asegurarse que la mezcla catalizadora se encuentre en el fondo del tubo. Al añadir el ácido sulfúrico, hacerlo con cuidado. Tratar de que el ácido resbale suavemente por la pared del tubo.
Manchas negras o amarillas en la solución de digestión	Revisar la temperatura del bloque de digestión. Revisar que los pozos del bloque de digestión estén limpios. Agregar 20 min al tiempo de digestión.

11.2.1.2 Determinación de nitrógeno con el método Micro-Kjeldahl

(AOAC, 1980)

Este procedimiento es preciso, pero toma mucho tiempo y, por lo tanto, no se recomienda para los programas genotécnicos que necesitan analizar muchas muestras en poco tiempo.

Digestión de las muestras:

1. Pesar 40 mg de la muestra molida. Incluir dos muestras testigo.
2. Colocar la muestra en el fondo de un tubo de digestión de 75 ml.
3. Incluir uno o dos tubos como blancos (vacíos, sin muestra) para la digestión.
4. Agregar 2.0 g de la mezcla catalizadora y 2.5 ml de H₂SO₄ concentrado a cada tubo. Dejarlos hasta que la reacción se detenga.
5. Digerir durante 90 min bajo una campana de extracción en un bloque de digestión precalentado a 380 °C.

Destilación y titulación de las muestras:

1. Agregar 20 ml de agua destilada para disolver cualquier cristal que se haya formado.
2. Transferir esta solución al sistema de destilación; lavar el tubo de digestión 5 ó 6 veces con 2 ml de agua destilada.
3. Agregar 6 ml de ácido bórico al 4% y 4 gotas de la solución indicadora a un matraz Erlenmeyer de 125 ml y colocarlo bajo el condensador. Asegurarse que la terminal del condensador esté metida en la solución.
4. Agregar 10 ml de hidróxido de sodio al 50% al sistema de destilación y destilar a 80-90 °C.
5. Destilar hasta obtener entre 50 y 75 ml.
6. Titular con ácido clorhídrico 0.02 N, hasta obtener el cambio de color a violeta.
7. Efectuar la determinación de los blancos, los testigos y las muestras.

Cálculo del porcentaje de nitrógeno:

% de nitrógeno =

$$\frac{\left(\begin{array}{l} \text{(Volumen de HCl} \\ \text{usado para} \\ \text{titulación de} \\ \text{la muestra (ml)} \end{array} - \begin{array}{l} \text{(Volumen de HCl} \\ \text{usado para} \\ \text{la titulación} \\ \text{de blancos)} \end{array} \right) \times \text{normalidad de HCl}}{\text{Peso de la muestra (mg)}} \times \frac{14.0067}{1000} \times 100$$

Apéndice: Cuadro 3. Reactivos utilizados en la determinación de nitrógeno con el método Micro-Kjeldahl.

Reactivo/mezcla	Reactivos específicos	Preparación	Recomendaciones especiales
Ácido sulfúrico (grado analítico, al 98%)			Almacenar a temperatura ambiente en un recipiente protegido de la luz.
Mezcla catalizadora	Sulfato de potasio Selenio	Mezclar 1 kg de K ₂ SO ₄ muy bien con 5 g de selenio.	Manejar con sumo cuidado; el selenio es muy peligroso. Almacenar a temperatura ambiente.
Solución de ácido bórico al 4%		Disolver ácido bórico al 4% en 100 ml de la solución.	Almacenar a temperatura ambiente.
Solución de rojo de metilo	Rojo de metilo (pH 4.2-6.2) Etanol absoluto	Disolver 20 mg de rojo de metilo en 10 ml de etanol.	Preparar cada vez que se requiere el reactivo indicador.
Solución de verde de bromocresol	Verde de bromocresol (pH 3.6-5.4) Etanol absoluto	Disolver 100 mg de verde de bromocresol en 50 ml de etanol.	Preparar cada vez que se requiere el reactivo indicador.
Reactivo indicador		Mezclar 10 ml de la solución de rojo de metilo y 50 ml de la solución de verde de bromocresol.	Preparar en una botella protegida de la luz. Almacenar a 4 °C durante un máximo de 3 meses.
Ácido clorhídrico 0.02 N	Ácido clorhídrico	Disolver 1.65 ml de HCl en 1 L de agua. Debe revisarse y verificarse la normalidad de cada preparación.	Almacenar a temperatura ambiente.

11.2.2 Determinación de proteína

El método Kjeldahl se ha utilizado ampliamente en la estimación del contenido proteínico de los cereales debido a que: (1) permite cuantificar el nitrógeno en muestras solubles o insolubles; (2) el nitrógeno en las muestras de cereales se deriva principalmente de la proteína; y (3) la composición de aminoácidos de la proteína del endospermo es tan constante que permite fijar la razón nitrógeno:proteína de un cereal (Nkonge y Balance, 1982). Se puede estimar la proteína a partir del valor de nitrógeno; en el caso del maíz, se calcula como sigue:

$$\% \text{ de proteína} = \% \text{ de nitrógeno} \times 6.25 \quad (\text{factor de conversión del maíz})$$

11.2.3 Determinación de triptófano

(Villegas et al., 1984)

Se han estudiado extensamente varios métodos analíticos para determinar el contenido de triptófano en las áreas de la cromatografía con intercambio de iones (Huang et al., 2006), la espectrofotometría (Piombo y Lozano, 1980) y la microbiología (Scott et al., 2004). Todos han resultado ser complicados, laboriosos y, por lo tanto, inadecuados para analizar grandes cantidades de muestras. Desde hace varios años, en el laboratorio del CIMMYT se ha utilizado, por su sencillez y reproducibilidad, el método colorimétrico de Opienska-Blauth et al. (1963), modificado por Hernández y Bates (1969). Dicho protocolo se describe enseguida.

Apéndice: Cuadro 4. Problemas que pueden surgir en la determinación de nitrógeno con el método Micro-Kjeldahl, y sus posibles soluciones.

Problema	Posibles soluciones
La destilación toma demasiado tiempo	Incrementar la temperatura, teniendo cuidado de que no hierva.
Cambios en los valores de las muestras testigo	Pesar las muestras con precisión. Asegurarse que las muestras fueron digeridas por completo. Asegurarse que la mezcla de reactivos 3 no esté oxidada. Si lo está, preparar otra mezcla. Verificar la calidad de los reactivos. Preparar más reactivos.
Solución de digestión turbia	Asegurarse que la muestra se encuentre en el fondo del tubo.

Principio:

Este protocolo se basa en la reacción Hopkins-Cole, en la que 1 molécula de ácido glioxílico y 2 de triptófano forman un compuesto con color y una absorbancia máxima a 560 nm.

Este método depende básicamente de la cantidad de ácido glioxílico que está presente, como impureza, en el ácido acético. Por esta razón, hay que probar varios lotes del ácido hasta identificar uno que produzca valores constantes de densidad óptica (DO) para la curva de calibración (como los presentados enseguida) y hasta que los valores de las muestras testigo (que son de maíz normal o de QPM) son como deben ser. Esta limitación de tener que probar diferentes lotes de ácido acético es la principal razón por la cual en el CIMMYT se está evaluando otro método de determinación de triptófano (Nurit et al., 2007, en preparación). Para mayores detalles, comunicarse con Natalia Palacios (n.palacios@cgiar.org).

Muestreo y molienda:

1. Tomar una muestra al azar de 20 a 30 semillas que son representativas del material.
2. Asegurarse que todas las muestras de semilla tengan un contenido de humedad similar.
3. Si las semillas han sido tratadas, lavarlas minuciosamente con agua de la llave y luego enjuagarlas con agua destilada. Dejar que se sequen.
4. Moler finamente cada muestra. Si es posible, utilizar un molino tipo ciclónico con una malla de 0.5 mm.

Desgrasado:

5. Colocar cada muestra en un sobre de papel filtro comercial (tamaño: 10 x 11 cm, por ejemplo).
6. Desgrasar las muestras con aproximadamente 300 ml de hexano por matraz de globo en un extractor continuo de tipo Soxhlet durante cuatro horas.
7. Secar las muestras al aire y asegurarse que todo el hexano se ha evaporado.

Digestión:

8. Para cada muestra, pesar 80 mg de polvo desgrasado en un tubo cónico de 15 ml.
9. Agregar 3 ml de la solución de papaína.
10. Siempre incluir por lo menos 2 blancos, 4 testigos (con una concentración conocida de triptófano: 2 QPM y 2 normales) y la curva de calibración (ver los detalles enseguida).
11. Cerrar los tubos para evitar que haya evaporación durante la incubación.
12. Agitar las muestras muy bien en el Vortex y colocarlas en una estufa a 65 °C durante 16 horas (toda la noche). Si fuera posible, agítelas dos veces más, una hora después de colocarlas

en la estufa y una hora antes de que termine el período de incubación (16 horas).

13. Retirar los tubos de la estufa y dejarlos enfriar a temperatura ambiente.
14. Agitar los tubos en el Vortex justo antes de centrifugarlos a 3600 g durante 10 min. Asegurarse que el sobrenadante no contenga partículas de las muestras; en caso de que las tenga, volver a centrifugar los tubos.

Reacción colorimétrica:

15. Retirar el hidrolizado de la estufa; agitarlo y dejarlo enfriar a temperatura ambiente.
16. Centrifugar a 2,500 rpm durante 5 min.

Apéndice: Cuadro 5. Reactivos utilizados en la determinación de triptófano.

Reactivo/mezcla	Reactivos específicos	Preparación	Recomendaciones especiales
Solución de acetato: 0.165 M NaH ₃ CCOOH	Acetato de sodio	Pesar 13.6 g de acetato de sodio por 1 L de agua destilada. Ajustar el pH a 7.0 con NaOH.	Mantener en reserva a 4 °C. Se mantiene estable durante varias semanas.
Solución de papaína 4 mg/ml	Papaína (extracto crudo: 2.5 unidades/mg)	Pesar 40 mg de papaína por cada 10 ml de solución. Siempre preparar una mayor cantidad de solución fresca de la que se necesita (3 ml por cada muestra). Disolver la papaína en la solución de acetato de sodio a temperatura ambiente.	Preparar antes de cada uso. Asegurarse que el amortiguador de fosfato esté a temperatura ambiente. Asegurarse que el polvo de papaína esté completamente disuelto.
Reactivo A	Cloruro férrico hexahidratado Ácido acético glacial	Disolver 270 mg de FeCl ₃ -6H ₂ O en 1 L de ácido acético puro.	En cada botella de ácido acético, hay que probar el desarrollo de color en presencia del triptófano, ya que a veces el ácido acético que no tiene aldehído no produce suficiente ácido glioxílico para reaccionar con el triptófano y desarrollar color.
Reactivo B: Ácido sulfúrico 30 N	Ácido sulfúrico (analítico)	Colocar una botella sobre hielo. Mezclar al mismo tiempo 833.3 ml de ácido sulfúrico (al 98%) y 166.7 ml de agua destilada para preparar una solución de H ₂ SO ₄ 30 N. Agregar agua destilada hasta obtener el volumen final.	Mantener en solución concentrada a temperatura ambiente; se mantiene estable durante varias semanas.
Reactivo C	Reactivos A y B	Preparar una mezcla de volúmenes iguales de los reactivos A and B por lo menos una hora antes de usarla.	
Triptófano 100 µg/ml	DL-Triptófano	Preparar una solución concentrada de 100 µg/ml de triptófano en acetato de sodio 0.1 M con el pH ajustado a 7.	Preparar cada semana y almacenar a 4 °C.

17. Transferir 1 ml del hidrolizado a otro tubo.
18. Agregar 4 ml del reactivo C haciéndolo resbalar suavemente por la pared interna del tubo.
19. Agitar muy bien en el Vortex e incubar a $63 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 15 min para que se desarrolle el color.
20. Retirar las muestras de la estufa y dejarlas secar a temperatura ambiente.
21. Leer la absorbancia a 560 nm en un espectrofotómetro.

Recomendaciones especiales:

- a) Es importante desgrasar la harina de maíz para mejorar la precisión y la reproducibilidad de los resultados. Cuando no se desgrasan las muestras, un 0.8% menos, en promedio, del triptófano es detectado con este protocolo.
- b) Asegurarse que no haya partículas de las muestras adheridas a la pared del tubo o flotando en el sobrenadante después de centrifugar las muestras (paso 14). Si hay partículas adheridas, agitar la muestra una vez más en el Vortex y centrifugarla durante 15 min.
- c) Como en todos los métodos analíticos, esta reacción es muy sensible a la precisión del pipeteado. Asegurarse que las pipetas o los dispensadores estén correctamente calibrados.
- d) Siempre incluir una curva de calibración por cada juego de muestras que se analiza en un día.
- e) Siempre medir el blanco del mismo lote de papaína. La papaína es una proteína que contiene grandes cantidades de triptófano (cada molécula de papaína contiene 7 unidades de triptófano). Es necesario restar esta cantidad al hacer los cálculos correspondientes a cada muestra.

Apéndice: Cuadro 6. preparación de una curva de calibración de triptófano.

Tubo no.	Sol. conc: 100 μg trp/ml (ml)	Acetato de sodio 0.1 M, pH 7.0 (ml)	Volumen total (ml)	Concentración μg trp/ml
1	0.0	10.0	10.0	0.0
2	1.0	9.0	10.0	10.0
3	1.5	8.5	10.0	15.0
4	2.0	8.0	10.0	20.0
5	2.5	7.5	10.0	25.0
6	3.0	7.0	10.0	30.0

Curva de calibración:

1. Preparar una solución concentrada de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de triptófano en acetato de sodio 0.1 M con pH 7 (preparar cada semana y almacenar a 4°C).
2. En tubos cónicos de 15 ml, preparar diariamente diluciones de 0, 10, 20, 15 y 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (en acetato de sodio 0.1 M con pH 7). Agitar muy bien en el Vortex antes de usarlas.
3. Producir una reacción colorimétrica (pasos 16 a 20) utilizando 1 ml de las diluciones.

Curva de calibración para el triptófano:

Desarrollar una curva de calibración utilizando cantidades conocidas de triptófano, desde 0 a 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Graficar las lecturas de absorbancia a 560 nm como una función de la concentración y calcular la pendiente (y) de la curva de calibración. Nótese que con la pendiente se usa la unidad $\text{DO}^*\text{ml}/\mu\text{g}$.

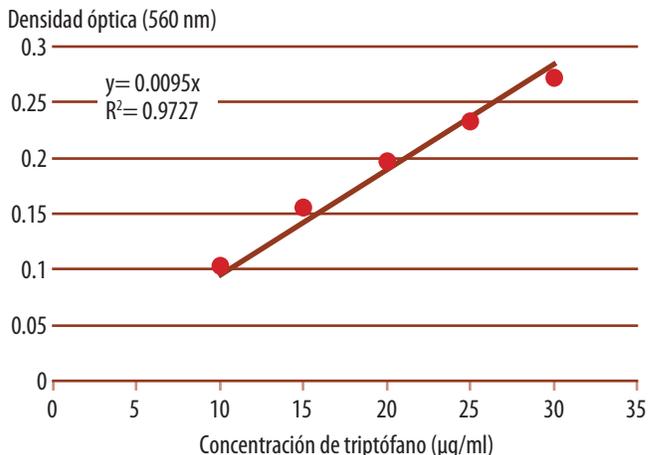
Cálculo del porcentaje de triptófano:

La cantidad de triptófano (trp) en cada muestra se estima utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ trp} = \frac{\text{DO}_{560 \text{ nm}}}{\text{pendiente}} \times \frac{\text{volumen hidrolizado}}{\text{peso de la muestra}} \times 100\%$$

Ejemplo:

$$\% \text{ trp } (\mu\text{g}/\mu\text{g}) = \frac{0.5}{0.0095 \frac{\text{DO}}{\mu\text{g}/\text{ml}}} \times \frac{3 \text{ ml}}{80000 \mu\text{g}} \times 100\%$$



Apéndice: Figura 1. Ejemplo de una curva de calibración para el triptófano.

Sin embargo, esta cantidad incluye el triptófano presente en la muestra, más el presente en la papaína. Para calcular el contenido de triptófano en el material biológico (polvo de grano desgrasado), restar el valor de la papaína.

Por lo tanto, el porcentaje de triptófano debe calcularse a partir del valor de absorbancia corregido:

$$\% \text{ trp} = \text{DO}_{560 \text{ nm corregido}} \times \text{Factor}$$

En el que:

$$\text{DO}_{560 \text{ nm corregido}} = \text{DO}_{560 \text{ nm muestra}} - \text{DO}_{560 \text{ nm promedio de los blancos de papaína}}$$

$$\text{Factor} = \frac{0.00375}{\text{pendiente}}$$

$$\text{Nótese que: } \frac{3 \text{ ml}}{80000 \mu\text{g}} = 0.00375$$

En general, una muestra con más de 0.070% de triptófano es considerada QPM. No obstante, esta condición depende también del contenido de proteína y, por lo tanto, del valor del índice de calidad (% trp/proteína).

Apéndice: Cuadro 7. Problemas que pueden surgir en la determinación de triptófano, y sus posibles soluciones.

Problema	Posibles soluciones
No hay desarrollo de color en la reacción	<ol style="list-style-type: none"> 1. Agregar acético anhidro del 2 al 4% al ácido acético. 2. Probar otro lote de ácido acético.
Cambios en los valores de la curva del factor/Mediciones DO de la curva de calibración del triptófano	<ol style="list-style-type: none"> 1. Verificar la calidad de la curva de calibración del triptófano. 2. Probar otro lote de ácido acético. 3. Asegurarse que el ácido sulfúrico es 30N. 4. Verificar la calidad de todos los reactivos. Preparar más reactivos. 5. Asegurarse que todas las cantidades de reactivos han sido medidas con precisión.
La DO de los blancos de papaína es demasiado baja	<ol style="list-style-type: none"> 1. Verificar que la cantidad de papaína sea la correcta. 2. Usar otro lote de papaína.
La DO de los blancos de papaína es demasiado alta	<ol style="list-style-type: none"> 1. Asegurarse que la cantidad de papaína sea la correcta. 2. Usar otro lote de papaína. 3. Probar otro lote de ácido acético. 4. Agregar anhidro acético del 2 al 4% al ácido acético.
Valores bajos para las muestras testigo	<ol style="list-style-type: none"> 1. Asegurarse que la digestión de muestras sea correcta: <ol style="list-style-type: none"> a) Asegurarse que no haya partículas en las paredes del tubo después de la digestión de muestras. Si esto ocurre, agitar la muestra en el Vortex y centrifugar una vez más durante 15 min. b) Verificar que la incubación se efectuó a 65 °C durante 16 h. 2. Verificar la calidad y cantidad de los reactivos utilizados. 3. Verificar la calidad de la curva de calibración del triptófano: <ol style="list-style-type: none"> a) Asegurarse que la solución concentrada de triptófano esté bien disuelta antes de hacer las diluciones. b) Mezclar bien la solución concentrada de triptófano antes de hacer las diluciones. c) Preparar más solución concentrada de triptófano.
Las mediciones de la DO entre repeticiones varían demasiado	<ol style="list-style-type: none"> 1. Verificar la precisión con que se pesaron las muestras. 2. Asegurarse que las repeticiones sean analizadas de la misma manera, utilizando el mismo lote de reactivos. 3. Asegurarse que las muestras estén a temperatura ambiente antes de hacer las lecturas. 4. Calibrar el espectrofotómetro a "cero" otra vez y asegurar que esté estable antes de hacer las lecturas de las muestras.
La papaína no se disuelve	Asegurarse que la solución de acetato esté a temperatura ambiente.

11.2.4 Referencias bibliográficas

- AOAC. 1980. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 13ava edición, pp 15.
- Hernández, H.H. y L.S. Bates. 1969. A modified method for rapid triptophan analysis in maize. CIMMYT Research Bulletin no. 13. México, D.F.: CIMMYT.
- Huang, S., A. Frizzi, C. Florida, D. Kruger y M. Luethy. 2006. High lysine and high triptophan transgenic maize resulting from the reduction of both 19- and 22-kD alpha-zeins. *Plant Molecular Biology* 61:525-535.
- Nkonge, C. y M. Balance. 1982. A sensitive colorimetric procedure for nitrogen determination in Micro-Kjeldahl digests. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 30:416-420.
- Nurit, E., A. Tiessen, A. Krivanek, K. Pixley y N. Palacios-Rojas. 2007. An alternative colorimetric method for triptophan determination in maize kernels. (En preparación.)
- Opienska-Blauth, J., M. Charenzinsky y H. Berbec. 1963. A new rapid method of determining triptophan. *Rep. Analytical Biochemistry* 6:69.
- Orman, B. y R. Schumann. 1991. Comparison of near-infrared spectroscopy calibration methods for the prediction of protein, oil, and starch in maize grain. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 39:883-886.
- Piombo, G. y Y. Lozano. 1980. Automated procedure for routine analysis of triptophan in cereals and legumes. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 28:489-496.
- Scott, P., S. Bhatnagar y J. Betrán. 2004. Triptophan and methionine levels in quality protein maize breeding germplasm. *Maydica* 49:303-311.
- Villegas, E., E. Ortega y R. Bauer. 1984. Métodos químicos usados en el CIMMYT para determinar la calidad de proteína de los cereales. México, D.F.: CIMMYT.

11.3 Donadores QPM disponibles en el CIMMYT.

Donador QPM	Grupo heterótico	Fuente	Tipo de grano	Adaptación
CML144	B	P62	Cristalino blanco	Tierra tropical baja
CML147	B	P63	Dentado blanco	Tierra tropical baja
CML150	A	G24 QPM	Dentado blanco	Tierra tropical baja
CML176	B	P63/P67	Dentado blanco / Cristalino	Tierra tropical baja
CML491	A	P62	Cristalino blanco	Tierra tropical baja
CML492	B	P62	Cristalino blanco	Tierra tropical baja
CML502	AB	P63/P67	Dentado blanco / Cristalino	Tierra tropical baja
CML503	B	P63/P67	Dentado blanco / Cristalino	Tierra tropical baja
CLQ-6315	BA	P63	Dentado blanco	Tierra tropical baja
CLQ-6316	B	P63	Dentado blanco	Tierra tropical baja
CLQ-RCWQ83	AB	P63/G24 QPM	Dentado blanco	Tierra tropical baja
CML511	B	CML176	Semi-cristalino blanco	Altura media

ISBN: 978-970-648-164-1