

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA ECOTEC**  
**FACULTAD DE INGENIERÍAS**

**TÍTULO DEL TRABAJO:**

“SELECCIÓN DE VARIEDADES CRIOLLAS DE MAÍZ (*Zea mays*) PARA EL DESARROLLO DE UNA VARIEDAD MEJORADA CON ALTO CONTENIDO DE PROTEÍNAS”.

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:**

GESTIÓN DE LOS PROCESOS PRODUCTIVOS AGRÍCOLAS

**MODALIDAD DE TITULACIÓN:**

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

**CARRERA:**

INGENIERÍA AGRÓNOMA

**TÍTULO A OBTENER:**

INGENIERO AGRÓNOMO

**AUTOR:**

EDUARDO ANDRES ORELLANA RIVERA

**TUTORES:**

DRA. IRIS PÉREZ ALMEIDA  
DR. CÉSAR ALCÁCER SANTOS

SAMBORONDÓN – ECUADOR

2023

*A mi Madre y a mi Abuela por enseñarme el valor de la vida.*

*A la Dra. Iris Almeida, por su dedicación y constante guía en este proceso.*

*Al semillero de investigación; por su compañerismo y solidaridad.*

**UNIDAD DE INTEGRACIÓN CURRICULAR  
CERTIFICADO DE APROBACIÓN DEL TUTOR METODOLÓGICO Y CIENTÍFICO PARA LA  
PRESENTACIÓN DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR**

Samborondón, 30 de noviembre de 2023

Magíster  
**Erika Asencio**  
**Decano(a) de la Facultad**  
**Facultad de Ingenierías**  
Universidad Tecnológica ECOTEC

De mis consideraciones:

Por medio de la presente comunico a usted que el trabajo de integración curricular TITULADO: "SELECCIÓN DE VARIEDADES CRIOLLAS DE MAÍZ (*Zea mays*) PARA EL DESARROLLO DE UNA VARIEDAD MEJORADA CON ALTO CONTENIDO DE PROTEÍNAS" según su modalidad PROYECTO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR; fue revisado, siendo su contenido original en su totalidad, así como el cumplimiento de los requerimientos establecidos en la guía para su elaboración, Por lo que se autoriza al estudiante: **EDUARDO ANDRES ORELLANA RIVERA**, para que proceda con la presentación oral del mismo.

**ATENTAMENTE,**

CESAR| Firmado  
ALCACER| digitalmente por  
|SANTOS CESAR|ALCACER|  
SANTOS  
Fecha: 2023.12.01  
19:01:45 +01'00'

**Cesar Alcacer Santos, PhD.**  
**Tutor Metodológico**



Firmado electrónicamente por:  
**IRIS BETZAIDA PEREZ  
ALMEIDA**

**Iris Betzaida Pérez Almeida, PhD.**  
**Tutora Científica**

**UNIDAD DE INTEGRACIÓN CURRICULAR  
CERTIFICADO DEL PORCENTAJE DE COINCIDENCIAS  
DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR**

---

Habiendo sido revisado el trabajo de integración curricular TITULADO: “SELECCIÓN DE VARIEDADES CRIOLLAS DE MAÍZ (*Zea mays*) PARA EL DESARROLLO DE UNA VARIEDAD MEJORADA CON ALTO CONTENIDO DE PROTEÍNAS” según su modalidad PROYECTO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR elaborado por EDUARDO ANDRES ORELLANA RIVERA fue remitido al sistema de coincidencias en todo su contenido el mismo que presentó un porcentaje de coincidencias del (%)\_\_ mismo que cumple con el valor aceptado para su presentación que es inferior o igual al 10% sobre el total de hojas del Trabajo de integración curricular. Se puede verificar el informe en el siguiente link: (copiar y pegar el https del resultado). Adicional se adjunta print de pantalla de dicho resultado.

**ATENTAMENTE,**

CESAR|  
ALCACER|  
|SANTOS

Firmado digitalmente por  
CESAR|ALCACER|  
SANTOS  
Fecha: 2023.12.01  
19:01:45 +01'00'

**Cesar Alcacer Santos, PhD.**  
**Tutor Metodológico**



Firmado electrónicamente por:  
**IRIS BETZAIDA PEREZ  
ALMEIDA**

**Iris Betzaida Pérez Almeida, PhD.**  
**Tutora Científica**



## 1.RESUMEN

Los marcadores moleculares microsatélites se usan en procesos de selección asistida y han sido muy importantes para realizar mejoramiento genético; en este trabajo se identificó mediante una evaluación metodológica la eficacia de tres marcadores moleculares ( $\phi 057$ ,  $umc1066$ , y  $\phi 112$ ) ligados al gen  $opaco-2$ . Para desarrollar esta evaluación metodológica se planteó realizar un análisis morfológico, molecular y asociativo a ocho variedades de maíz criollo las cuales pueden poseer el gen en estado homocigoto recesivo ( $o2/o2$ ) y ser aptas para entrar a un programa de mejoramiento QPM. El método se basó en el trabajo de laboratorio realizado con protocolos previamente estudiado y establecidos; se llevaron a cabo procesos de evaluación visual de un carácter morfológico; en hojas jóvenes se realizó la extracción, cuantificación y amplificación de ADN; su visualización se realizó en geles de agarosa (Metaphore) basados en la PCR de las muestras; el análisis y comprobación de datos moleculares se realizó usando un programa científico (ImageJ). La evaluación visual evidenció la necesidad del análisis molecular para la selección de ecotipos, por otro lado, el análisis molecular permitió diferenciar entre el tamaño de los fragmentos que se utilizan para interpretar el estado de dominancia del gen. Al asociar ambos análisis se pudo decidir cuáles son las variedades aptas para mejoramiento QPM las cuales fueron: Bolon-Q, Chulpy-Q, Astilla Blanca-ST, Huamamsara-Pi y Astilla Amarilla-DH. Esta evaluación metodológica permitirá establecer un protocolo de selección asistida eficiente en maíces criollos para el desarrollo de una variedad mejorada con alto contenido de proteínas.

**Palabras claves:** Microsatélites, Maíces Criollos,  $Opaco-2$  ( $o2/o2$ ), Alto contenido de proteínas, Mejoramiento QPM.

## 1.1 ABSTRACT

Molecular markers, specifically microsatellites, are employed in assisted selection processes and have proven instrumental in genetic improvement. In this study, the efficacy of three molecular markers (phi057, umc1066, and phi112) linked to the opaque-2 gene was identified through a methodological evaluation. To conduct this evaluation, a morphological, molecular, and associative analysis was proposed for eight varieties of Creole maize, which may carry the gene in a homozygous recessive state ( $o2/o2$ ) and be suitable for inclusion in a Quality Protein Maize (QPM) improvement program. The methodology relied on laboratory work using previously studied and established protocols. Visual evaluation of a morphological trait was carried out, and DNA extraction, quantification, and amplification were performed on young leaves. The visualization occurred on agarose gels (Metaphore) based on PCR of the samples, while analysis and verification of molecular data were conducted using the scientific program ImageJ. Visual evaluation highlighted the necessity of molecular analysis for ecotype selection. Molecular analysis, on the other hand, allowed differentiation between fragment sizes used to interpret the dominance state of the gene. By combining both analyses, the identification of suitable varieties for QPM improvement was possible, including Bolon-Q, Chulpy-Q, Astilla Blanca-ST, Huamamsara-Pi, and Astilla Amarilla-DH. This methodological evaluation aims to establish an efficient protocol for assisted selection in Creole maize, facilitating the development of an improved variety with a high protein content.

**Keywords:** Microsatellites, Creole Maize, Opaque-2 ( $o2/o2$ ), High Protein Content, QPM Improvement.

## 2. ÍNDICE GENERAL

1.RESUMEN	2
DESARROLLO DEL PROYECTO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR	¡Error!
<b>Marcador no definido.</b>	
3. INTRODUCCIÓN	6
3.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	7
3.2 DESAFÍOS CIENTÍFICOS	8
3.2.1 HIPÓTESIS	8
3.3 JUSTIFICACIÓN	9
3.4 OBJETIVOS	10
3.4.1 GENERAL	10
3.4.2 ESPECÍFICOS	10
CAPÍTULO 1: MARCO TEÓRICO	17
4.1 ESTADO DEL ARTE	12
4.1.1 BASES DE LA GENÉTICA DEL MAÍZ Y EL GEN OPACO-2 (O2)	13
4.1.1.1 ALELO RECESIVO SIMPLE DEL GEN OPACO-2.	15
4.1.2 BASES DE LA SELECCIÓN ASISTIDA CON MARCADORES MOLECULARES (SAM)	20
4.1.3 MARCADORES MORFOLÓGICOS USANDO LA MESA DE LUZ	22
4.1.4 MARCADORES MICROSATÉLITES (SSR)	25
4.1.6 MAÍCES CON ALTA CALIDAD PROTEICA (QPM).	30
CAPÍTULO 2: METODOLOGÍA DEL PROCESO DE LA INVESTIGACIÓN	40
4.2 MARCO METODOLÓGICO	34
4.2.1 UBICACIÓN	34
4.2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	34
4.2.2.1 OBTENCION DE LAS MUESTRAS	34
4.2.3 EVALUACION CON MARCADOR MORFOLÓGICO	36
4.2.4 PROTOCOLO PARA IDENTIFICAR LA VARIABILIDAD GENÉTICA DEL LOCUS OPACO-2	36

4.2.4.1 OBTENCIÓN DE LOS MATERIALES	36
4.2.4.2 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO	37
4.2.4.3 CUANTIFICACIÓN DE ADN	38
4.2.4.4 AMPLIFICACIÓN POR PCR	38
4.2.4.5 VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN	40
4.2.4.6 ANÁLISIS DE DATOS MOLECULARES	40
4.2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO ASOCIATIVO	40
CAPÍTULO 3: ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN	49
5.1 RESULTADOS	43
5.2. EVALUACION CARÁCTER MORFOLÓGICO (GRADO DE OPACIDAD)	44
5.3 CUANTIFICACIÓN DE ADN	48
5.4 CALIDAD DEL ADN	49
5.5 EVALUACIÓN DE DATOS MOLECULARES.	50
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	58
6. DISCUSIONES Y CONCLUSIONES	52
REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA	59

## 2.1 ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ANATOMÍA DE LA SEMILLA DEL MAÍZ (PEDRAZA, 2021).	16
FIGURA 2. HERENCIA SIMPLE Y RECESIVA DEL GEN O2 (VIVEK,2008).	19
FIGURA 3. TRANSCRIPCIÓN DEL GEN O2 A PROTEÍNA REGULADORA OPACO-2. (ELABORADO POR EL AUTOR).	21
FIGURA 4. GRANOS DE MAÍZ QUE PORTAN EL GEN O2 COLOCADOS CON EL EMBRIÓN HACIA ABAJO EN LA MESA DE LUZ. (VIVEK, 2008).	27
FIGURA 5. GRANOS DE MAÍZ EN UNA MESA DE LUZ (IZQUIERDA) Y LAS CLASES DE MODIFICACIÓN EN SEMILLA F2 QUE DESCENDE DE MAÍZ NORMAL CRUZADO CON UN DONADOR QPM (KRIVANEK Y VIVEK, 2006).	28
FIGURA 6. POSICIÓN DE PHI112 CON RESPECTO AL GEN OPACO-2, COMPARADO DENTRO DEL GENOMA DE <i>ZEA MAYS</i> (NCBI, 2023).	32
FIGURA 7. CEBADORES SENTIDO Y ANTISENIDO EN PHI112 CON RESPECTO AL GEN OPACO-2, COMPARADO DENTRO DEL GENOMA DE <i>ZEA MAYS</i> (NCBI, 2023).	32
FIGURA 8. POSICIÓN DE PHI057 CON RESPECTO AL GEN OPACO-2, COMPARADO DENTRO DEL GENOMA DE <i>ZEA MAYS</i> (NCBI, 2023).	33
FIGURA 9. CEBADORES SENTIDO Y ANTISENIDO DE PHI057 CON RESPECTO AL GEN OPACO-2, COMPARADO DENTRO DEL GENOMA DE <i>ZEA MAYS</i> (NCBI, 2023).	33
FIGURA 10. POSICIÓN DE UMC1066 CON RESPECTO AL GEN OPACO-2, COMPARADO DENTRO DEL GENOMA DE <i>ZEA MAYS</i> (NCBI, 2023).	34
FIGURA 11. CEBADORES SENTIDO Y ANTISENIDO CON RESPECTO AL GEN OPACO-2, COMPARADO DENTRO DEL GENOMA DE <i>ZEA MAYS</i> (NCBI, 2023).	34
FIGURA 12. MAZORCAS Y GRANOS DE MAÍZ PORTADORES DEL ALELO OPACO 2 (O2): (A) MAZORCAS SEGREGANTES DE GRANO OPACO Y GRANO NORMAL; Y (B) VARIOS GRADOS DE OPACIDAD EN GRANOS QPM OBSERVADOS EN UNA MESA DE LUZ. (PALACIOS ROJAS, 2017)	38
FIGURA 13. DIAGRAMA DE FLUJO DE PROCESOS DE LA METODOLOGÍA UTILIZADA. (ELABORADO POR EL AUTOR).	42

FIGURA 14. SEMILLAS EVALUADAS EN UNA CÁMARA DE LUZ (ELABORADO POR EL AUTOR).

51

FIGURA 15. SELECCIÓN DE GRANOS EN MESA DE LUZ (ELABORADO POR EL AUTOR) 52

FIGURA 16. SEMILLAS DE MATERIALES SELECCIONADOS EN LA CÁMARA DE LUZ (ELABORADO POR EL AUTOR).

54

## 2.2 INDICE DE TABLAS

TABLA 1. COMPARACIÓN DEL VALOR PROTEICO DEL MAÍZ NORMAL Y DEL MAÍZ OPACO-O2 CON EL DE LA LECHE (BRESSANI ET AL., 1969B; VITERI ET AL., 1972).	20	26
TABLA 3. MARCADORES MOLECULARES, LISTA DE LOS LOCI EVALUADOS, LA UBICACIÓN CROMOSÓMICA (BIN), EL MOTIVO Y SECUENCIA DE LOS CEBADORES FLANQUEANTES (HECK, 2006)		27
TABLA 4. DISTRIBUCIÓN DE LA FRACCIÓN PROTEÍNICA EN MUESTRAS DE ENDOSPERMO NORMAL Y ENDOSPERMO SUAVE (O2). (BJARNASON Y VASAL, 1992)		32
TABLA 5. MATERIALES SELECCIONADOS (ELABORADO POR EL AUTOR).		36
TABLA 6. TABLA DE OPACIDAD MEDIA POR VARIEDAD (ELABORADO POR EL AUTOR).		46
TABLA 7. CONCENTRACIONES DE ADN OBTENIDAS POR EL MÉTODO BROAD RANGE DSDNA DEL INVITROGEN QUBIT 4 (ELABORADO POR EL AUTOR).		49
TABLA 8. CONTENIDO DE PROTEÍNAS DE LOS MATERIALES EVALUADOS		53

### 3. INTRODUCCIÓN

El maíz amarillo duro es un cereal ancestral y significativo a nivel global, destacando por su importancia en diversos países de América del Sur, donde se convierte en un cultivo de gran relevancia socioeconómica (Cardenas, 2021) . El maíz es un cereal el cual tiene una importancia muy considerable en la economía y sociedad ecuatoriana; en los últimos cinco años, ha habido un aumento en la producción y rendimiento del maíz, cultivado principalmente en la región costera del país (Caviedes, 2017). El maíz es altamente consumido en Ecuador como carbohidrato dentro de la dieta de la población, las variedades consumidas por las familias ecuatorianas son las criollas ya que cuentan con un mejor sabor y son aptas para la elaboración de recetas. Por otro lado, la mejora genética ha respondido a un sin número de necesidades ocasionadas por problemas de rendimiento de los rubros alimenticios que se cultivan. Con el advenimiento de la tecnología del ADN recombinante se han desarrollado los marcadores moleculares (MM), los cuales han demostrado ser de gran utilidad para la identificación y selección de genes deseables para realizar trabajos de mejora vegetal.

Es posible seleccionar el genotipo directamente en vez del fenotipo, por medio de la Selección Asistida por Marcadores (SAM) (Olmos, 2004). La SAM identifica una secuencia de ADN que se aproxima (ó codifica) al gen (o locus) de interés agronómico, y se usa como una herramienta dentro del proceso de selección; esto resulta independiente de la expresión del gen y del ambiente (Olmos, 2004). El objetivo de este trabajo se basa en identificar variedades de maíz criollo con el gen opaco-2 (o2) que puedan usarse para el mejoramiento de maíces con alto contenido de proteínas haciendo uso de marcadores moleculares SSR. Una variante genética relacionada con una mejor calidad de proteína en los granos de maíz es el alelo recesivo que se encuentra en el locus opaco-2 (o2, GRMZM2G015534), situado en el cromosoma 7 del maíz. Existen datos que señalan que el maíz que es homocigoto para la mutación recesiva o2 (opaco-2) presenta un contenido notablemente superior de lisina y triptófano en comparación con el maíz que es heterocigoto (O2o2) u homocigoto dominante (O2O2) para dicho locus (Heck, 2006).

Para el desarrollo de variedades con alto contenido de proteínas, inicialmente se debe identificar los genotipos que contengan este gen; por ello que los marcadores moleculares serán útiles para seleccionar los materiales apropiados. En una evaluación metodológica de alcance descriptivo se comprobó si los marcadores moleculares microsatélites (umc1066, phi112, y phi057) son eficientes en la identificación de la presencia del gen *opaco-2* (*o2/o2*) en variedades criollas de maíz; las variedades que son seleccionadas podrán ser usadas para el desarrollo de variedades de alto contenido de proteína. En vista de la relevancia que tiene el maíz en la dieta humana, tiene una importancia social el incrementar el uso de variedades poseedoras de características como estabilidad del rendimiento, calidad de proteína, y dureza del endospermo.

### **3.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El endospermo del maíz es altamente rico en proteína zeína, la cual es soluble en alcohol; este componente es rico en glutamina (21-26%), leucina (20%), prolina (10%) y alanina (10%), pero posee un bajo porcentaje de presencia de algunos aminoácidos esenciales, por ejemplo, lisina (2,0% en la proteína) y triptófano (0,4% en la proteína) (Heck, 2006). Una deficiencia de ambos aminoácidos esenciales conduce a una disminución en la absorción de proteínas en el cuerpo humano, lo que resulta en una mala nutrición. Los aminoácidos esenciales son cruciales para la síntesis de proteínas, y su insuficiencia en la dieta limita la capacidad del cuerpo para mantener una nutrición adecuada y funciones esenciales (Martínez, 2006). El maíz normal posee bajos niveles de estos aminoácidos que representan menos de la mitad de la dosis recomendada para una nutrición balanceada en los seres humanos.

Con la finalidad de resolver estos problemas nutricionales, una alternativa eficaz es la adopción de variedades de maíz con alto contenido de proteínas dentro de la dieta humana; tienen un mejor valor proteico en comparación a los maíces normales debido al alto contenido de lisina y triptófano.

La tecnología del ADN recombinante ha dado lugar a la aparición de marcadores moleculares, que se han revelado como herramientas de gran utilidad en la identificación y elección de genes deseables en la mejora de plantas. Es factible optar por seleccionar el genotipo en lugar del fenotipo, a través de lo que se conoce como Selección Asistida por Marcadores (SAM) (Olmos,2004). Esto posibilita efectuar una selección precoz de materiales, lo que conlleva un ahorro considerable tanto en tiempo como en recursos económicos.

En este trabajo de tesis, se tuvo como objetivo utilizar marcadores moleculares (morfológicos y microsatélites) para la detección del gen *opaco-2* (*o2*) en su estado homocigoto recesivo, que da la característica de alto contenido de proteínas. Los materiales en los que se presentó esta característica son útiles para el desarrollo de un programa de mejoramiento; con un enfoque a nuevas variedades con alto contenido de proteínas. Esta evaluación metodológica se realizó para conocer la eficacia de tres marcadores microsatélites (*umc1066*, *phi112*, y *phi057*) en la identificación del gen *opaco-2* (*o2*) utilizando ocho variedades criollas además de dos testigos.

## **3.2 DESAFÍOS CIENTÍFICOS**

### **3.2.1 HIPÓTESIS**

Los marcadores moleculares microsatélites (*umc1066*, *phi112*, y *phi057*) son eficientes en la identificación de la presencia del gen *opaco-2* (*o2*) en variedades criollas de maíz aptas para el desarrollo de variedades con alto contenido de proteínas.

### 3.3 JUSTIFICACIÓN

El maíz es sumamente cultivado en Ecuador, la superficie sembrada de maíz duro seco corresponde a 383,399 ha (INEC, 2019). Por otro lado, el 80% de la producción de maíz se utiliza como materia prima en la agroindustria para la producción de balanceado para animales (Baca, 2016). Durante las últimas dos décadas, ha habido un aumento constante en producción y rendimiento, a este fenómeno se atribuye al empleo de semillas híbridas certificadas (Zambrano, 2019). La desnutrición es una preocupación de salud pública que actualmente tiene una relevancia significativa en Ecuador (ENSANUT, 2018).

La dieta más común y prevalente en el país se basa en carbohidratos, como el maíz, mientras que el consumo de proteínas es insuficiente (Lucero, 2020). El desarrollo de variedades de maíz con un elevado contenido de proteínas se postula como una alternativa a esta problemática; el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIAP) en 2019 presentó la variedad INIAP 543-QPM la cual tiene alto contenido de proteínas y buen rendimiento.

Los marcadores moleculares son eficientes para identificar el genotipo de un organismo tempranamente sin necesidad de evaluar fenotípicamente a un individuo (Heck, 2006).

En este proyecto se usa un enfoque metodológico mixto donde se evalúa la eficacia de los marcadores moleculares (umc1066, phi112, y phi057) en la identificación del gen *opaque-2* de variedades de maíz criollo, y además, se evaluó un marcador morfológico para estimar cuáles son las variedades portadoras del gen *o2/o2*. Por último, se determinó si existe una asociación entre ambas metodologías.

### **3.4 OBJETIVOS**

#### **3.4.1 General**

- Identificar variedades de maíz criollo con el gen opaco-2 ( $o2/o2$ ) que puedan usarse para el mejoramiento de maíces con alto contenido de proteínas haciendo uso de marcadores moleculares.

#### **3.4.2 Específicos**

- Analizar con un marcador morfológico 10 variedades de maíz criollos para seleccionar materiales según el grado de vitrosidad de su endospermo.
- Caracterizar 10 variedades criollas de maíz utilizando los marcadores moleculares microsatélites phi057, umc1066, y phi112 para seleccionar materiales con presencia del gen opaco-2 ( $o2/o2$ ).
- Determinar si existe asociación entre ambas metodologías para seleccionar variedades de maíz con calidad proteica.

#### **4. DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN**

##### **CAPÍTULO 1: MARCO TEÓRICO**

#### 4.1 ESTADO DEL ARTE

La aparición de la tecnología de ADN recombinante ha facilitado el desarrollo de marcadores moleculares, que han sido valiosas herramientas para la identificación y selección de genes deseables con el objetivo de mejorar las plantas. Es posible elegir el genotipo directamente en lugar de basarse en el fenotipo mediante la Selección Asistida por Marcadores (SAM). Esta técnica localiza una secuencia de ADN cercana o relacionada con el gen agronómico de interés y la utiliza como una herramienta en el proceso de selección, sin depender de la expresión del gen ni de su comportamiento en el entorno.

La desnutrición es un factor incidente en la salud pública nacional, actualmente aproximadamente el 27% de los niños menores de dos años en el país sufren de desnutrición, y esta situación se agrava aún más en la población infantil indígena, con un alarmante 39% de desnutrición (ENSANUT, 2018). El patrón alimenticio más común y extendido en Ecuador se basa principalmente en carbohidratos, como el maíz, y lamentablemente, la ingesta de proteínas es insuficiente (Lucero, 2020).

Para abordar de manera efectiva estos desafíos nutricionales, una solución viable es la inclusión de variedades de maíz con alto contenido de proteínas, conocidas como QPM (por sus siglas en inglés), en la dieta humana. Estas variedades de maíz se caracterizan por tener un equilibrio adecuado de proteínas, gracias a su alto contenido de Lisina y Triptófano (Lucero, 2020). Se conocen numerosas mutaciones en el maíz que cambian el contenido y la composición de proteínas, una de las más conocidas es la mutación de *opaco-2* (*o2*). Produce una disminución muy marcada del contenido de zeína (50-70% del tipo salvaje) asociado con un aumento en las proporciones de lisina y triptófano en la semilla resultando en una mejora en la calidad nutricional (Henry, 2005).

La identificación del gen *opaco-2* (*o2/o2*) en estos materiales mediante labores de laboratorio usando marcadores moleculares, es esencial para determinar cuáles

son las variedades aptas para el desarrollo de una nueva variedad QPM. Dado el papel central del maíz en la alimentación humana y dentro de la economía social, es de suma importancia social promover el uso de variedades mejoradas que cuenten con características como estabilidad en el rendimiento, calidad de proteína y dureza del endospermo.

#### 4.1.1 Bases de la Genética del Maíz y el gen Opaco-2 (o2)

El maíz, al igual que otros cereales, es rico en carbohidratos, pero no proporciona un equilibrio adecuado de proteínas, vitaminas y minerales. Aunque es altamente energético, su contenido de proteínas es bajo y de calidad inferior debido a que su principal componente, las zeínas, que carecen de aminoácidos esenciales como la lisina y el triptófano (Mejía, 2003). En términos de su composición de aceite, el maíz contiene niveles bajos de ácidos grasos saturados, como el palmítico y el esteárico, en comparación con ácidos grasos insaturados como el oleico y el linoleico, que predominan en los lípidos del grano de maíz. En el caso del maíz convencional, aproximadamente el 50-60% de las proteínas de reserva son zeínas, las cuales carecen prácticamente de lisina y triptófano. Esto resulta en una calidad proteica inferior en comparación con otros cereales como arroz y trigo (Bhatnagar, 2004).

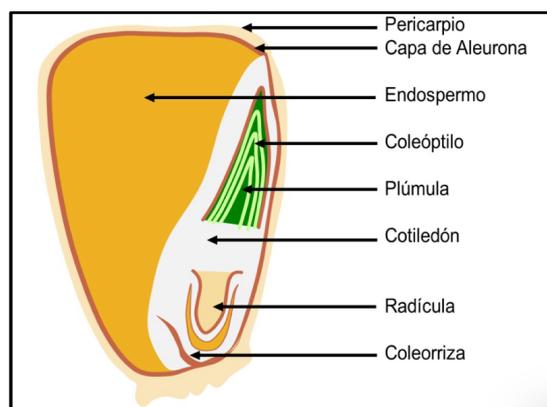


Figura 1. Anatomía de la semilla del maíz (Pedraza, 2021).

Después del descubrimiento del gen opaco-2, se identificaron genes "modificadores o2" que alteran el fenotipo de los mutantes o2 para darles una

aparición normal. Aunque estos genes demostraron ser genéticamente complejos, no lograron mejorar las características negativas del fenotipo opaco. Sin embargo, mediante la incorporación sistemática de genes modificadores de *o2* en el fondo genético de *o2* y monitoreando el contenido de lisina del grano, se desarrollaron variedades de maíz de alta calidad de proteína (QPM) (Larkins et al., 1995). La mejora del perfil proteico del maíz es esencial para comunidades que dependen en gran medida de este cereal como fuente de alimento. Se han identificado mutaciones naturales que aumentan los niveles de lisina y triptófano, lo que ha permitido iniciar programas de mejoramiento genético (Recendiz, 2005).

El balance adecuado de aminoácidos esenciales es crucial para la nutrición tanto animal como humana. La proteína del maíz opaco-2 tiene un valor nutritivo cercano al 90% del valor biológico de la leche desnatada en niños (Bressani, 1966). Dado que la lisina y el triptófano son aminoácidos limitantes en la dieta de humanos y animales no rumiantes, aumentar sus niveles es un objetivo importante en programas de mejora genética. La forma homocigota recesiva del gen opaco-2 es una de las más estudiadas en este contexto. En maíces cuya presencia del gen *o2* existía, el grado de vitrosidad aumentó, así como la síntesis de  $\gamma$ -zeína en el endospermo; ambas dosificaciones son dependientes y están directamente correlacionadas. Estos mismos factores genéticos son activos en otros mutantes de endospermo-suave como harinoso-2 (H2) y harinoso-2 opaco-2 (H2;o2) (Recendiz, 2005). Maffia et al. (1989) mostró las ventajas nutricionales de los maíces de alta calidad de proteína (QPM) en ratas, humanos y animales. Zeng et al. (1995), Ahenkora et al. (1995) y Martínez et al. (1996) efectuaron estudios que probaron los efectos positivos de la lisina que tienen los maíces modificados. Según Lopes y Larkins (1991), opaco-2 (*o2/o2*) es una mutación dentro de uno de los loci que regulan el gen de la transcripción, el cual controla el almacenaje de proteína en los granos de maíz (*Zea mays*).

El gen *o2/o2* logra producir la baja significativa de la prolamina del endospermo que se torna blanquecino y suave. Es importante conocer cuáles han sido los diversos aportes científicos acerca de este gen, y así lograr un impacto real en varios sectores. Actualmente la sociedad tiene una dieta muy pobre en proteínas y alta en

carbohidratos (ENSANUT, 2018). Existe un interés social acerca de cuáles son las ventajas de esta clase de maíces que tienen una gran variabilidad genética, y así mismo esto podría representar el desarrollo de variedades que podrían llegar a ser útiles dentro de un programa de mejoramiento. Resulta esencial desarrollar variedades de maíz con un contenido proteico mejorado para las comunidades que dependen en gran medida del maíz como su alimento principal (Vivek, 2008).

#### **4.1.1.1 Alelo recesivo simple del gen opaco-2.**

Este alelo desempeña un papel fundamental en el sistema genético que proporciona niveles elevados de lisina y triptófano en la proteína que se encuentra en el endospermo del maíz. La herencia del alelo  $o2$  sigue un patrón simple y recesivo. Es esencial que el alelo  $o2$  esté presente en un estado homocigoto recesivo ( $o2/o2$ ) para lograr maíz con un alto contenido de lisina y triptófano. Las proteínas más abundantes en el endospermo del grano, especialmente las alfa-zeínas, son deficientes en lisina y triptófano (Gibbon y Larkins, 2005). El gen  $o2/o2$  disminuye la producción de la fracción de alfa-zeína de la proteína. También, afecta uno de los loci reguladores de un gen de transcripción que controla la acumulación de proteínas en los granos de maíz (*Zea mays*); lo que resulta en una disminución notoria en la prolamina del endospermo, haciendo que este se vuelve blanquecino y suave (Heck, 2006). El locus Opaco-2 ( $O2$ ), situado en el cromosoma 7, codifica una proteína activadora de la transcripción que pertenece a la familia de proteínas con cremallera de leucina (Hartings et al., 1989; Maddaloni et al., 1996). Un alelo recesivo del locus Opaco-2 ( $O2$ ) ha demostrado estar asociado con una mayor calidad proteica en el grano de maíz. Los estudios previos indican que el maíz homocigoto para la mutación recesiva  $o2$  tiene niveles sustancialmente más altos de lisina y triptófano en comparación con el maíz heterocigoto ( $O2o2$ ) o homocigoto dominante ( $O2O2$ ) para dicho locus. Sin embargo, se ha observado que este aumento está fuertemente influenciado por el fondo genético (Wang y Larkins, 2001; Huang et al., 2006; Gutiérrez-Rojas et al., 2008; Vivek et al., 2008).

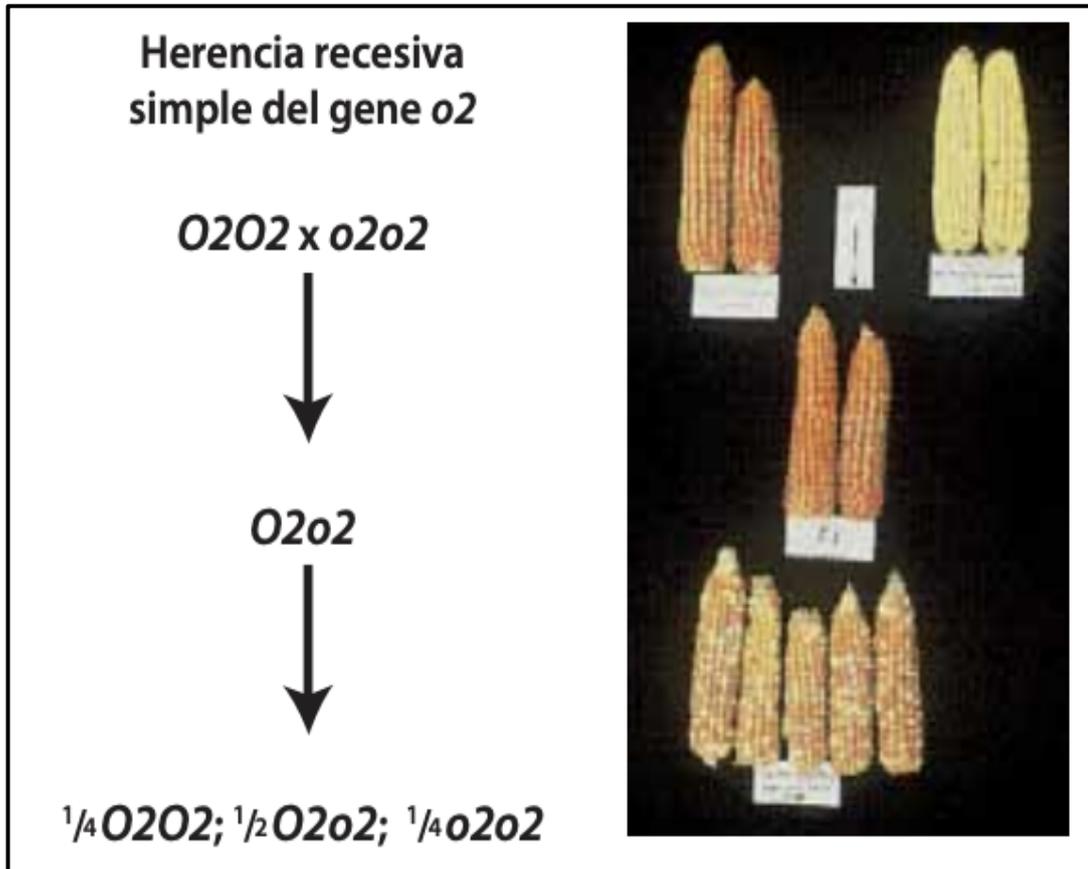


Figura 2. Herencia Simple y Recesiva del gen O2 (Vivek,2008).

Se demostró que el maíz homocigoto respecto a la mutación o2 (recesiva) tenía un contenido considerablemente mayor de lisina y triptófano 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 biológico de la proteína del maíz.

La proteína funcional O2 activa la transcripción de varios genes relacionados con el almacenamiento de proteínas en el endospermo. La mutación en el gen O2 se asocia con una reducción en la producción de la fracción de  $\alpha$ -zeínas y un aumento en la proporción de proteínas no zeínas en el endospermo, lo cual naturalmente contiene niveles más elevados de lisina y triptófano. (Recendiz, 2005) Se ha observado que la modificación del endospermo se relaciona con la presencia de dos genes gamma-zeína, ubicados cerca del centrómero del cromosoma 7.

Múltiples genes modificadores se cree que influyen en el cambio de dureza del grano, así como en el equilibrio de la calidad proteica. Aunque el maíz opaco-2 presenta ventajas nutricionales debido a su alto contenido de lisina y triptófano, también muestra desventajas como su endospermo suave, que lo hace más susceptible a plagas e insectos y que puede resultar en rendimientos más bajos. El gen opaco-2 es un factor transcripcional que tiene un amplio impacto en diversos aspectos de la biología celular y molecular del maíz, según lo revelado por análisis de proteínas, aminoácidos y transcriptoma (Hartings et al., 2011).

Este gen se encuentra ubicado en el brazo corto del cromosoma 7 del maíz y se hereda como un gen recesivo simple. La proteína codificada por el gen opaco-2 presenta un motivo de cremallera de leucina (bZIP) y se expresa principalmente en el endospermo del grano de maíz, con un motivo de unión al ADN que recuerda a los protooncogenes y factores transcripcionales de levadura (Hartings et al., 1989). Su secuencia, depositada en el GenBank como la secuencia X15544, se divide en seis exones y cinco intrones (Figura 3), y después del proceso de corte y empalme, resulta en una secuencia Opaque-2 con 1353 pares de bases y un total de 451 aminoácidos (Maddaloni et al., 1989).

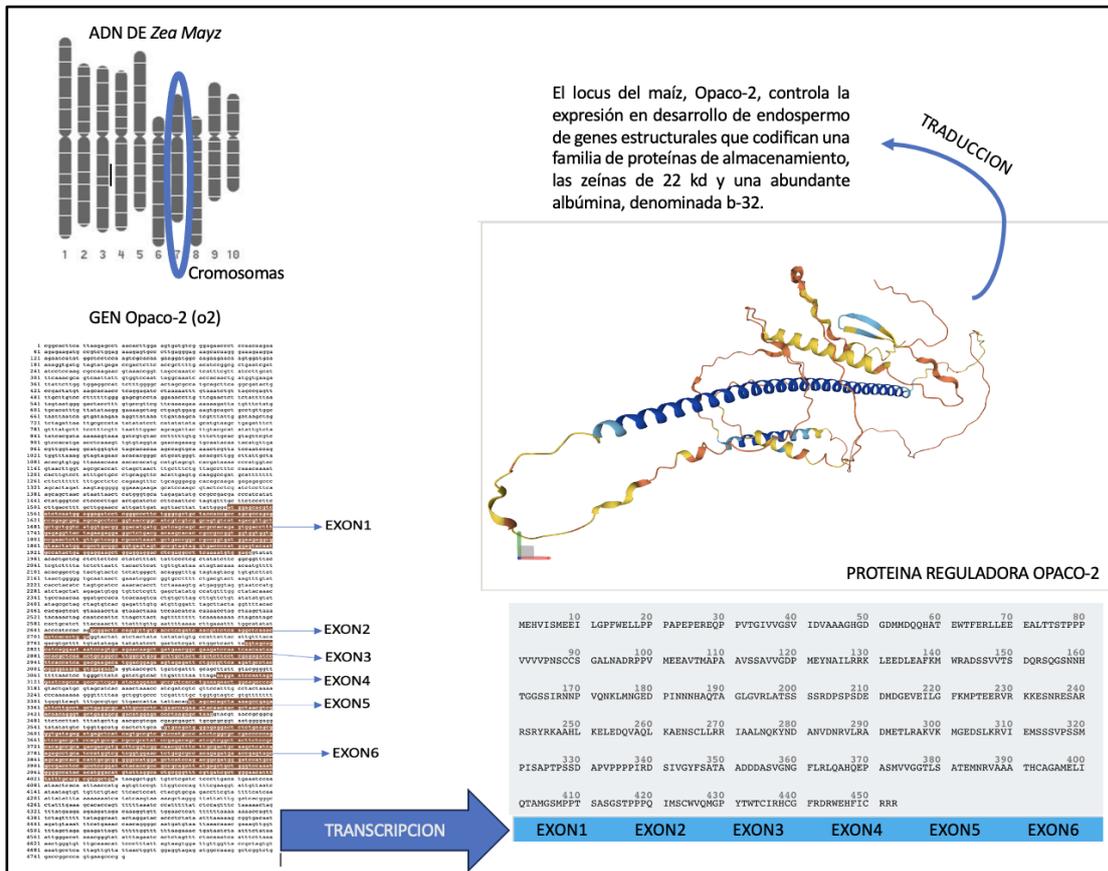


Figura 3. Transcripción del gen o2 a Proteína Reguladora Opaco-2. (Elaborado por el autor).

En particular, la proteína Opaco-2 regula selectivamente la expresión de genes de prolamina, específicamente los genes de  $\alpha$ -zeína de 22 kDa y  $\beta$ -zeína de 15 kDa, reduciendo su nivel de expresión y aumentando la producción de proteínas de almacenamiento de menor tamaño (Gibbon y Larkins, 2005).

También influye en la expresión de proteínas distintas de las zeínas, como el factor de elongación 1- $\alpha$  (ef1- $\alpha$ ), que se correlaciona con el contenido de lisina en el endospermo opaco (Habben et al., 1995). Esto sugiere que la reducción de la transcripción de  $\alpha$ -zeína de 22 kDa podría ser una estrategia efectiva para mejorar el equilibrio de aminoácidos en el maíz (Prassana et al., 2001).

Sin embargo, la cantidad de proteína en este 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; sin embargo, a nivel mundial, muy poca gente tiene los medios para comprar leche regularmente. Es importante conocer el hecho que el maíz homocigoto recesivo o2 tiene un valor de calidad equivalente al 90% del valor de la leche.

**Tabla 1.** Comparación del valor proteico del maíz normal y del maíz opaco-o2 con el de la leche (Bressani et al., 1969b; Viteri et al., 1972).

<i><b>TIPO DE MAÍZ</b></i>	<i><b>% DE LA CALIDAD DE LA LECHE</b></i>
Maiz Duro Amarillo	39
Maiz O2/O2	90
Leche De Vaca	100

La regulación de la opaco-2-prolamina se logra a través de la unión directa al ADN en un elemento de secuencia conservado de 7 pb denominado "caja de prolamina", que se encuentra en la región promotora de los genes de proteínas de almacenamiento de semillas. Además, la proteína opaco-2 tiene la capacidad de interactuar con factores de unión al ADN en genes de prolamina que carecen de esta caja de prolamina (Vicente-Carbajosa et al., 1997).

**Tabla 2.** Comparación de los porcentajes promedio de lisina y triptófano presentes en el maíz opaco-2 y el maíz normal (Bressani et al., 1969b; Viteri et al., 1972).

	<b>NORMAL</b>	<b>o2/o2</b>
	<b>gr/100 Proteína</b>	
Lisina	2,6	4,2
Triptófano	0,4	0,9

Además de su influencia en las proteínas de almacenamiento, la proteína opaco-2 también modula otras proteínas no relacionadas con el almacenamiento, como la proteína b-32 inactivadora de ribosomas tipo I, la isoforma citosólica del gen de la piruvato ortofosfato diquinasa (cyPPDK1), una proteína de choque térmico b-70 y enzimas relacionadas con la vía metabólica del aspartato, como la lisina-cetoglutarato reductasa, aspartato quinasa1 y aspartato quinasa2 (Wang et al., 2007).

En resumen, el gen opaco-2 es un regulador central en la biología del maíz, afectando la expresión génica, la síntesis de proteínas y varios procesos metabólicos en el endospermo del grano de maíz. Sin embargo, la introducción del gen opaco-2 en líneas élites de maíz es un proceso complejo y costoso debido a su naturaleza recesiva. (Heck, 2006). La forma homocigota recesiva de opaco-2 en el maíz tiene un impacto significativo en la calidad proteica del grano, con ventajas nutricionales, pero también desafíos en términos de características del grano y rendimiento. La investigación y el mejoramiento genético han buscado abordar estos aspectos para desarrollar variedades de maíz más nutritivas y resilientes.

#### 4.1.2 Bases de la selección asistida con marcadores moleculares (SAM)

En la actualidad, las técnicas para la identificación de genotipos han evolucionado significativamente, trascendiendo la mera observación de características visibles o el análisis de proteínas o isoenzimas. Se han desarrollado enfoques más precisos y confiables, como los marcadores moleculares. La selección asistida por marcadores moleculares, se refiere a cualquier contribución a la selección de genotipos mediante el uso de marcadores moleculares. Esta técnica se emplea para gestionar las combinaciones genéticas y para acumular genes deseables o segmentos cromosómicos en un genotipo específico. Permite inferir el valor genético, al menos en parte, a través de la presencia de marcadores en diferentes ubicaciones genéticas (Charcosset y Gallais, 2003).

Un marcador molecular se lo conoce como un fragmento específico de ADN el cual puede identificarse dentro del genoma. Estos marcadores están localizados en lugares específicos del genoma de los organismos y son usados para señalar la posición de un gen en particular (INIAP, 2011).

En este proyecto se realizará la identificación del gen *opaco-2* de poblaciones de medios hermanos  $F_2$  criollos con la finalidad de poder saber cuáles variedades criollas son aptas para su aprovechamiento en el desarrollo de una variedad QPM. Las variaciones genéticas son el resultado de diversos eventos de mutación que se manifiestan en los genomas comparados. Este evento resulta en la aparición de diferentes genotipos los cuales podrían llegar a tener un valor genético importante que si se desea aprovechar se deberán realizar estudios mediante marcadores moleculares para las etapas de selección. Los marcadores moleculares tienen diversas aplicaciones, como la evaluación de la diversidad genética, la construcción de mapas genéticos y la localización de loci que influyen en características cuantitativas o cualitativas. También se utilizan para estimar los efectos de estos loci en los programas de mejoramiento de plantas (Charcosset y Gallais, 2003).

Valadez y Kabl (2000) definen a los marcadores moleculares de ADN como secuencias genómicas que ocupan el mismo locus, pero difieren en su secuencia de bases nitrogenadas. Las variaciones en estos marcadores son consecuencia de mutaciones en los genomas comparados (De Vienne y Falque, 2003). (Charcosset y Gallais, 2003) explican que cualquier contribución al proceso de selección basada en el uso de marcadores moleculares se denomina "Selección asistida por marcadores moleculares". Esta técnica se utiliza para gestionar las recombinaciones y acumular genes beneficiosos o segmentos cromosómicos en un genotipo específico, permitiendo leer parcialmente el valor genotípico a través de múltiples localizadores. Los marcadores moleculares han superado las limitaciones de las metodologías tradicionales de genética mendeliana y se han convertido en herramientas esenciales para la identificación de genotipos con características deseables en los programas de mejoramiento de plantas. Estos marcadores permiten una selección más eficiente y precisa, acelerando el desarrollo de nuevas variedades de cultivos con rasgos beneficiosos (Recendiz, 2005).

La selección asistida por marcadores moleculares se justifica plenamente debido a que brinda una mayor seguridad en la identificación de genotipos que poseen alta calidad de proteína. La combinación de la selección visual mediante la lámpara en semillas F<sub>2</sub>, seguida de la selección asistida por marcadores moleculares en plantas F<sub>2</sub>, asegura la calidad en la elección de genotipos que llevan el gen *o2/o2*. La utilización conjunta de ambas metodologías es adecuada, aunque se deben considerar los costos asociados a los marcadores (Recendiz, 2005).

#### 4.1.3 Marcador Morfológico usando Mesa de Luz

Una mesa de luz es un dispositivo especialmente diseñado para diferenciar entre los tipos de maíz con endospermo duro y los genotipos suaves o2o2. Típicamente, consta de una caja hecha a medida con lados de madera y una tapa transparente de vidrio o plástico. En el interior de la caja, se encuentra una lámpara que contiene uno o dos focos fluorescentes u otros tipos de iluminación, los cuales se conectan a una fuente de electricidad. Para examinar las características de los granos de maíz, se colocan sobre la mesa y se enciende la luz (Vivek, 2008).

El tamaño de la mesa de luz puede variar, siendo el mínimo de 27.5 cm de largo, 15 cm de ancho y 7.5 cm de alto, mientras que el tamaño más común es de 72 cm de largo, 63 cm de ancho y 11 cm de alto, con una tapa de vidrio o plástico de 3 mm de espesor. La caja suele tener dos agujeros en lados opuestos para permitir la ventilación y evitar el sobrecalentamiento (Vivek, 2008). Para utilizar la mesa de luz, se conecta a una fuente de electricidad y se enciende. Los granos se colocan sobre el vidrio o plástico con el embrión hacia abajo para su observación.

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.

- Tipo 1: No es opaco
- Tipo 2: opaco al 25%
- Tipo 3: opaco al 50%
- Tipo 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. En la generación F2, se selecciona el puntaje de modificación 3 (Vivek, 2008).

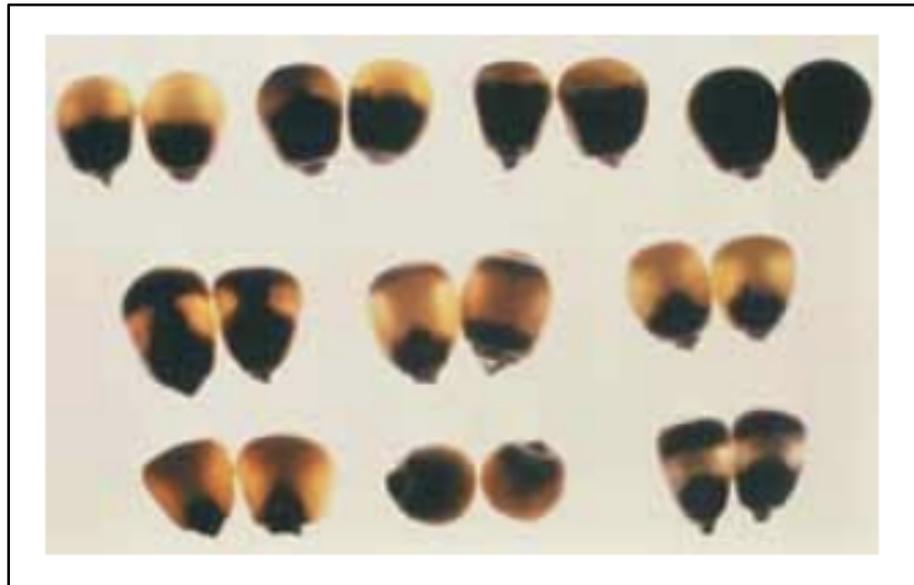


Figura 4. Granos de maíz que portan el gen  $o2$  colocados con el embrión hacia abajo en la mesa de luz. La opacidad de los granos varía, indicando distintos grados de modificación del endospermo (Vivek, 2008).

Es importante destacar que la opacidad en los granos no siempre avanza de manera uniforme desde la parte superior hasta la base debido a la influencia de varios genes modificadores que convierten el endospermo suave en duro. Identificar el genotipo  $o2o2$  en las primeras generaciones durante el desarrollo de líneas puras es esencial. El uso de una mesa de luz resulta fundamental para detectar los granos que llevan el gen  $o2o2$  en un estado homocigoto recesivo. Esto es preferible en comparación con el uso de marcadores moleculares o análisis de laboratorio, ya que es un método más rápido y económico, especialmente cuando se necesita seleccionar cientos o miles de genotipos de poblaciones segregantes. Es relevante tener en cuenta que el grado de modificación en la opacidad es en su mayoría independiente de la calidad de proteína, pero no completamente. Por lo tanto, la mesa de luz no puede reemplazar los análisis de laboratorio que se realizan en etapas posteriores del mejoramiento para confirmar el contenido de lisina y triptófano.

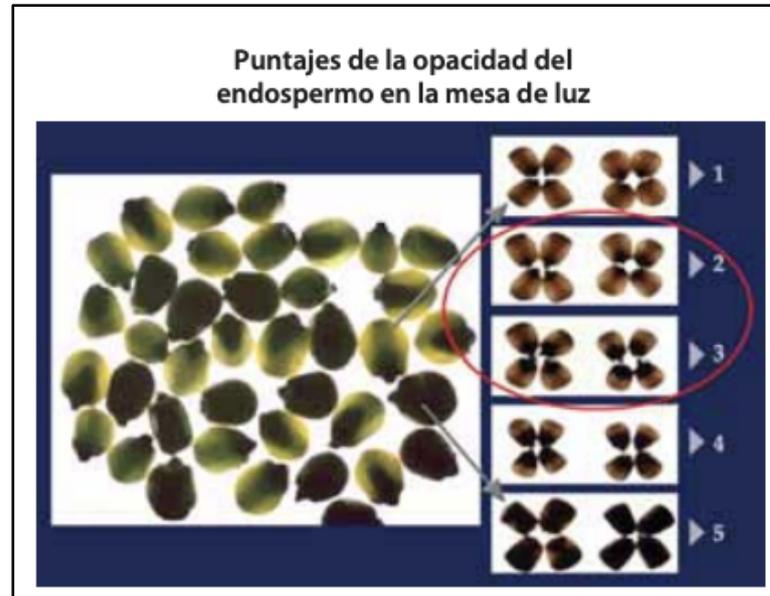


Figura 5. Granos de maíz en una mesa de luz (izquierda) y las clases de modificación en semilla  $F_2$  que desciende de maíz normal cruzado con un donador QPM (Krivanek y Vivek, 2006).

#### 4.1.4 Marcadores Microsatélites (SSR)

Los SSR pueden identificarse como secuencias pequeñas que se repiten en tándem, las cuales se denominan “motifs” de dos, tres o más nucleótidos, siendo los más comunes (A), (TC), (TAT), (GATA), etc., con una longitud variable que puede ir desde varias unidades hasta varias decenas de unidades. En las plantas superiores, se estima que hay aproximadamente un dinucleótido SSR cada 30 a 100 kb, con densidades similares para los trinucleótidos y trinucleótidos. La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es valiosa para identificar individualmente los SSR, generando marcadores específicos altamente variables en los loci, proporcionando marcadores específicos de locus que exhiben un alto grado de variabilidad genética (Heck, 2006).

Su polimorfismo se basa en el número de repeticiones de la secuencia motif ya que incide directamente en la talla de la secuencia, la cual es detectada mediante una PCR al usar cebadores que amplifican las secuencias colindantes (Tautz y Renz,

1984). Estas repeticiones tienden a expandirse mediante mecanismos específicos, como el desplazamiento de la polimerasa, lo que genera variaciones frecuentes en el número de repeticiones en el tándem de microsatélites. Debido a su distribución en todo el genoma, los SSRs son altamente polimórficos y se consideran una alternativa atractiva para caracteres de herencia simple, mejorando la eficiencia de selección y acelerando el desarrollo de nuevas variedades de cultivos (Heck, 2006).

Estos marcadores microsatélites actualmente son considerados como polimórficos y se entiende que cuentan con una amplia presencia dentro de las plantas (Ferreira y Grattapaglia, 1998), esto se puede traducir como una ventaja sobre otro tipo de marcadores moleculares ya que permite diferenciar con mayor precisión a individuos que se encuentren altamente emparentados. Además, son marcadores de un uso sencillo y son fácilmente reproducibles. Otra ventaja es que permiten hacer uso de cantidades menores de ADN de no tan alta calidad y aun así presentan alta precisión al momento de determinar los alelos (Weising et al., 2005).

El marcador microsatélite SSR, identificado como phi112, es ampliamente utilizado para la caracterización molecular y mejora del maíz. Este marcador presenta características específicas, como su secuencia en sentido 5' a 3', su ubicación en el cromosoma 7 y temperaturas de alineamiento específicas. (Heck, 2006). Actualmente, se disponen de tres marcadores SSRs (phi057, phi112 y umc1066) para estudiar y seleccionar el alelo recesivo opaco-2. Estos marcadores se encuentran dentro del locus Opaco-2, lo que sugiere una fuerte correlación entre las variantes de los marcadores y la expresión fenotípica del carácter (Dreher et al., 2003; Yang et al., 2004, Vivek et al., 2008; Ignjatovic-Micic et al., 2009).

**Tabla 3.** Marcadores moleculares, lista de los loci evaluados, la ubicación cromosómica (BIN), el motivo y secuencia de los cebadores flanqueantes (Heck, 2006).

<i>Marcador</i>	<i>Localización Cromosómica (Bin)</i>	<i>Posición Respecto al Locus Opaco-2</i>	<i>Motivo Repetido</i>	<i>Secuencia de los Cebadores</i>
<b>PHI112</b>	7.01	Después de la TATA box y región UTR 5 prima.	AG	TGCCCTGCACGTTACATTGAAGT* R:AGGAGTACGCTTGGATGCTCTTC**
<b>PHI057</b>	7.01	Exón 6	(GCC)4	CTCATCAGTGCCGTCGTCCAT* CAGTCGCAAGAAACCGTTGCC**
<b>UMC1066</b>	7.01	Arranca en el Codón de Inicio (Exon 1)	(GCCAGA)5	ATGGGAGCACGTCATCTCAATGG* AGCAGCAGCAACGTCTATGACACT**

**Nota:** \*Cebador sentido; \*\*Cebador antisentido.

El marcador phi112, ubicado en el locus Opaco-2, podría influir en la transcripción del gen, mientras que los marcadores umc1066 y phi057, situados en exones específicos, podrían afectar la estructura y actividad de la proteína O2 (Yang et al., 2004). Estas ubicaciones permiten analizar la variabilidad alélica en el germoplasma local en relación con el locus Opaco-2. Los tres marcadores SSR mencionados (phi057, phi112, umc1066) generan productos de amplificación con tamaños de alrededor de 140-160 pares de bases (pb).

Ninguno de estos marcadores exhibe diferencias de tamaño de fragmento de ADN que permitan distinguir entre el alelo recesivo opaco-2 y el alelo dominante Opaco-2. En consecuencia, estos marcadores no resultan útiles si los fragmentos de ADN amplificados de portadores de opaco-2 y Opaco-2 tienen el mismo tamaño (Chin et al., 1996).

Para realizar la SAM, es preferible utilizar marcadores codominantes, ya que son más informativos y útiles en comparación con los marcadores dominantes. Los marcadores codominantes permiten diferenciar de manera clara entre plantas homocigotas y heterocigotas, lo que facilita la identificación de los genotipos de interés en programas de mejora genética (Chin et al., 1996).

En las siguientes figuras se representa la ubicación cromosómica de los SSR utilizados (phi112, phi057, umc1066), en comparación a un genoma de maíz base llamado B73. Existen herramientas biotecnológicas que permiten comparar las secuencias de ADN genómico con nuestros primers a utilizar en la reacción de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) de la siguiente manera:

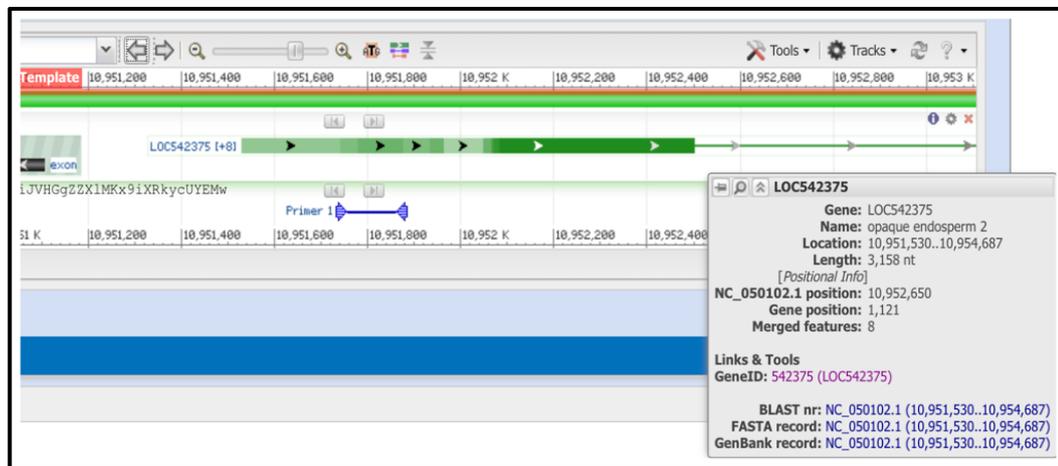


Figura 6. Posición de phi112 con respecto al gen Opaco-2, comparado dentro del genoma de Zea Mays (NCBI, 2023).

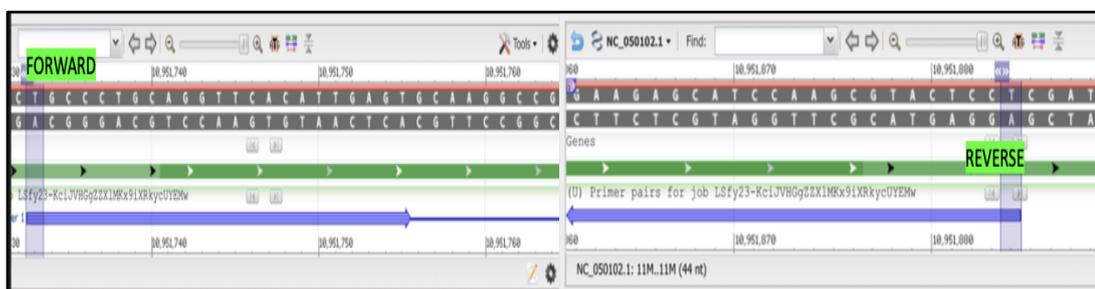


Figura 7. Cebadores sentido y antisentido en phi112 con respecto al gen opaco-2, comparado dentro del genoma de Zea Mays (NCBI, 2023).

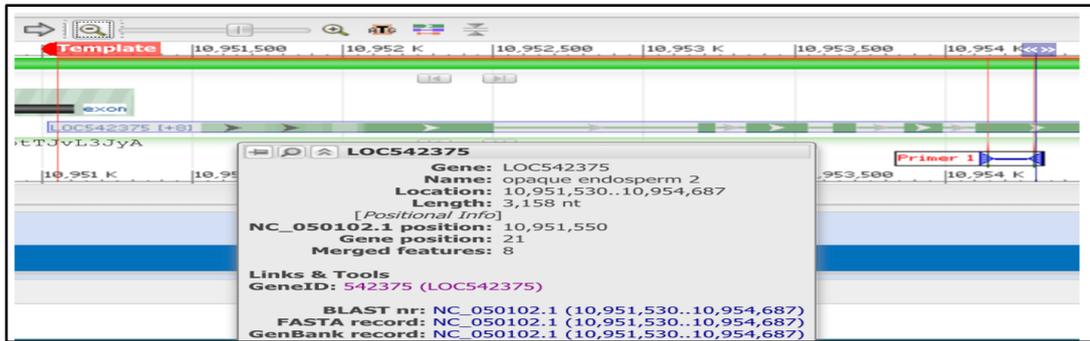


Figura 8. Posición de phi057 con respecto al gen Opaco-2, comparado dentro del genoma de Zea Mays (NCBI, 2023).

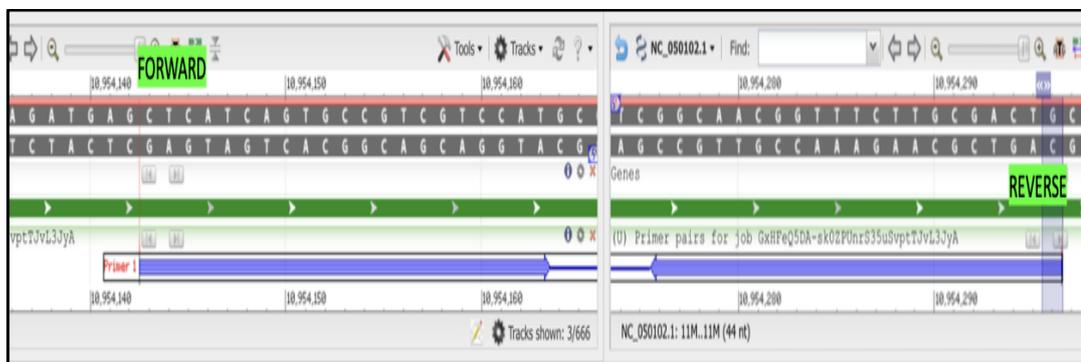


Figura 9. Cebadores sentido y antisentido de phi057 con respecto al gen opaco-2, comparado dentro del genoma de Zea Mays (NCBI, 2023).

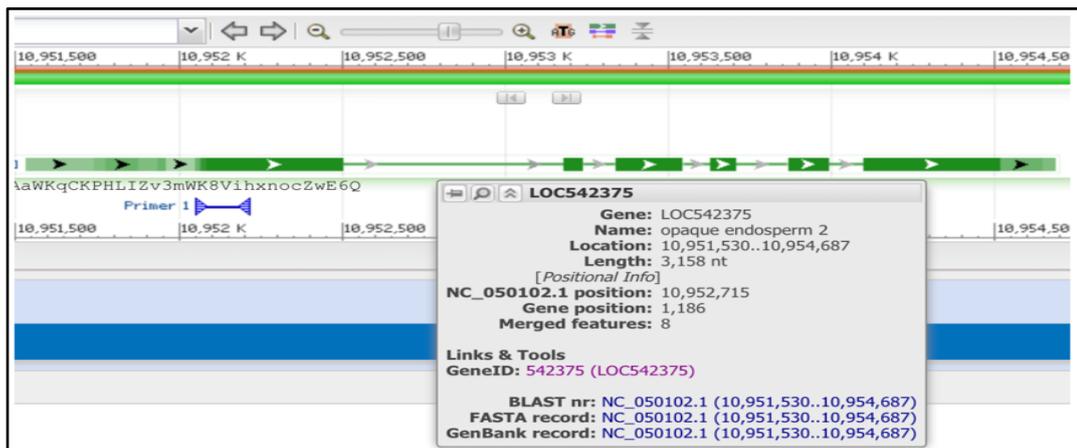


Figura 10. Posición de umc1066 con respecto al gen Opaco-2, comparado dentro del genoma de Zea Mays (NCBI, 2023).

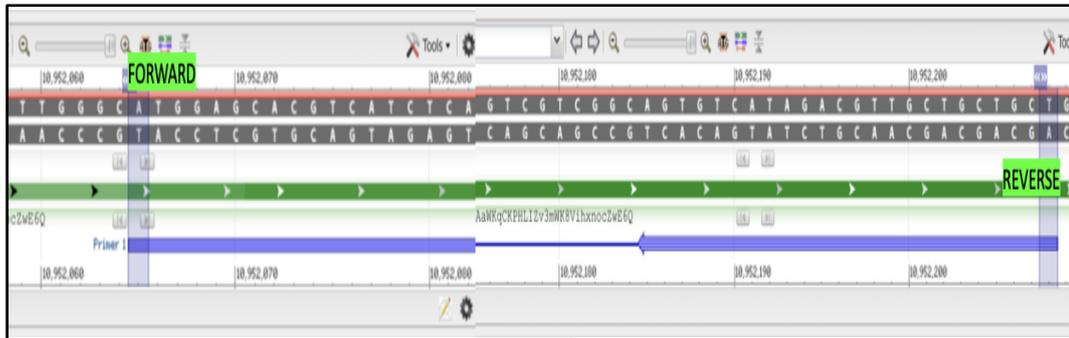


Figura 11. Cebadores sentido y antisentido de umc1066 con respecto al gen opaco-2, comparado dentro del genoma de Zea Mays (NCBI, 2023).

#### 4.1.6 Maíces con Alta Calidad Proteica (QPM).

El maíz QPM (Alta Calidad Proteica) es el resultado de unas tres décadas de investigación científica colaborativa entre el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) y el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Es importante destacar que el maíz QPM no es un organismo modificado genéticamente, sino que ha sido enriquecido de manera natural, y su proteína tiene una calidad similar a la de la leche. Este logro científico es de gran importancia y representa una valiosa contribución de México al mundo, habiendo sido honrado con el Premio Mundial de la Alimentación en el año 2000, otorgado a la doctora Evangelina Villegas, investigadora del CIMMYT, en conjunto con el doctor Surinder Vasal.

Los genotipos de maíz de alta calidad de proteína (QPM) son aquellos que han sido modificados para presentar un endospermo más duro mediante la introducción de mutantes del gen opaco-2 (*o2*) que contienen factores genéticos responsables de aumentar la síntesis de la proteína gamma-zeína con un peso molecular de 27 kDa. Es importante destacar que *o2/o2* es de origen natural y no implica ninguna modificación genética artificial en el organismo (no es un organismo genéticamente modificado u OGM). Esta mutación *o2*, cuando está presente en estado homocigótico, mejora la calidad de la proteína de maíz al aumentar su contenido de lisina y triptófano, pero no altera la cantidad total de proteína en el grano de maíz (Vivek, 2008). La

modificación del endospermo parece estar regida por un sistema genéticamente complejo, con su efecto principal en la producción de la proteína gamma-zeína. Existe una sugerencia de que la cantidad de esta proteína podría estar estrechamente relacionada con el aumento de la vitrosidad del grano en el maíz QPM. Estos maíces, gracias a la acción de genes modificadores, son reconocidos como de alta calidad de proteína o "QPM" (Recendiz, 2005).

**Tabla 4.** Distribución de la fracción proteínica en muestras de endospermo normal y endospermo suave (o2). (Bjarnason y Vasal, 1992).

<b>Fracción Proteica</b>	<b>Porcentaje de proteína total (g/100g de proteína)</b>	
	<b>Maíz Amarillo Duro</b>	<b>O2/O2</b>
<b>Albúminas, Globulinas, Nitrógeno Soluble.</b>	6,6	9,7
<b>Zeinas (Alfa, Beta, Delta, Gamma)</b>	48,7	17
<b>semejantes a la Zeina</b>	14	13,4
<b>semejantes a la glutenina</b>	9,2	17,2
<b>Glutelina</b>	17	34,5
<b>Residuo</b>	4,5	8,1

Durante más de tres décadas, se han acumulado evidencias que demuestran que los maíces con endospermo suave y duro que contienen la mutación homocigota recesiva del gen opaco-2 tienen un valor nutricional superior en comparación con los maíces normales. Con un valor nutricional hasta un 50% más alto que los maíces convencionales, no hay ninguna razón para que este tipo de maíz no pueda reemplazar al maíz normal como alimento para humanos y animales (Mertz, 1994).

En la actualidad, más de 22 países, incluyendo a Brasil, China, Ghana, Vietnam, Bolivia, Ecuador, Venezuela, India y Sudáfrica, han introducido híbridos y variedades sintéticas de maíz QPM. Además, se han llevado a cabo esfuerzos para promover

estos tipos de maíz en países como Perú, Bolivia, Ecuador y Senegal (Córdova, 2005). Hace aproximadamente 80 años, en la Universidad de Yale en Estados Unidos, L.B. Mendel descubrió la importancia nutricional de la lisina y el triptófano en la dieta de ratas. Cincuenta años después, en la Universidad de Purdue, se observó que el maíz opaco-2 presentaba niveles bajos de zeína y altos niveles de otras proteínas ricas en lisina y triptófano (Mertz, 1994).

Los efectos negativos adicionales del alelo recesivo  $o_2$  se manifiestan en el endospermo, haciendo que este sea suave y vulnerable a fisuras, ataques de hongos que causan pudrición en las mazorcas, y a infestaciones de gorgojos. Estos efectos secundarios no deseados son claramente perjudiciales. La suavidad del endospermo se traduce en un aspecto opaco que se puede observar utilizando una mesa de luz (Vivek, 2008).

Para mejorar el contenido de lisina y triptófano en el maíz, es necesario implementar un tercer sistema genético compuesto por modificadores menores que convierten el endospermo del fenotipo mutante, suave, opaco y harinoso, en uno duro y cristalino, similar al del maíz convencional. El término "maíz con calidad de proteína" (QPM) se utiliza en adelante para referirse al maíz que posee el gen  $o_2$  en un estado homocigoto recesivo ( $o_2o_2$ ), altos niveles de lisina y triptófano, y endospermo lo suficientemente duro para garantizar características aceptables en las mazorcas. El maíz QPM tiene una apariencia similar al maíz común y solo puede diferenciarse a través de análisis bioquímicos en el laboratorio (Vivek, 2008).

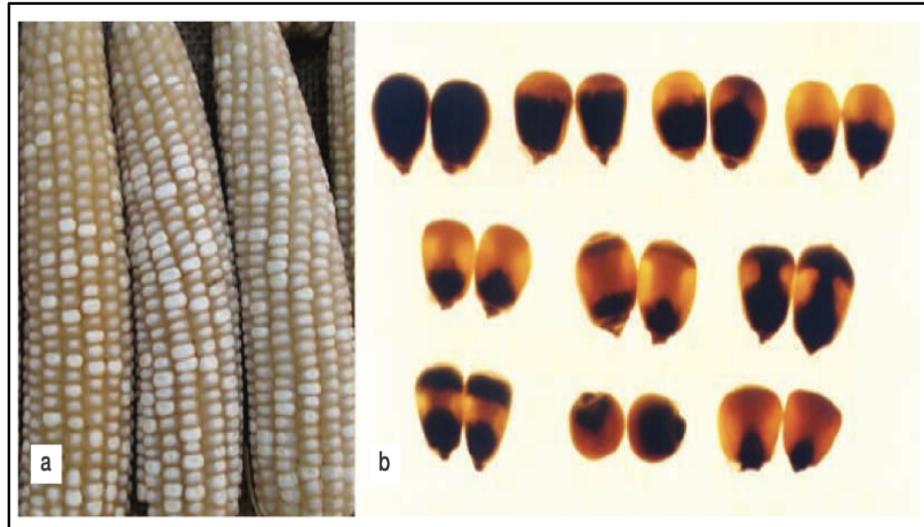


Figura 12. Mazorcas y granos de maíz portadores del alelo opaco 2 ( $o_2$ ): (a) mazorcas segregantes de grano opaco y grano normal; y (b) varios grados de opacidad en granos QPM observados en una mesa de luz. (Palacios Rojas, 2017)

## **CAPÍTULO 2: METODOLOGÍA DEL PROCESO DE LA INVESTIGACIÓN**

## **4.2 MARCO METODOLÓGICO**

Se llevó a cabo una evaluación metodológica con variables mixtas de alcance descriptivo y asociativo para identificar la presencia o ausencia del gen opaco-2; identificada como la secuencia X15544 depositada en el GenBank; este gen se divide en seis exones y cinco intrones, después del proceso de corte y empalme, resulta en una secuencia Opaco-2 con 1353 pares de bases (pb) y un total de 451 aminoácidos (Maddaloni et al., 1989).

### **4.2.1 UBICACIÓN**

La siguiente propuesta tecnológica se realizó en el laboratorio de Biología Molecular del Campus Samborondón de la Universidad Ecotec. El proceso de obtención de muestras se llevó a cabo en el Green Projects Lab, vivero de la institución.

### **4.2.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **4.2.2.1 Obtencion de las muestras**

Los materiales obtenidos son aptos para realizar la presente evaluación metodológica por su origen criollo, las variedades se describen en la siguiente tabla:

**Tabla 5.** Materiales seleccionados (Elaborado por el autor).

<i>Entrada</i>	<i>Variedad</i>	<i>Nombre código</i>	<i>Raza probable</i>	<i>Localidad origen</i>	<i>Provincia/pais</i>	<i>Localización geográfica/ altitud</i>
1	ASTILLA AMARILLA-DH	VC1	San Geronimo Huancavelicano	Los Ángeles de Cucharan	Daniel Hernandez/ Peru	12° 20' 7.24"S 74° / 3240 msnm.
2	CARHUAY-Q	VC2	San Geronimo Huancavelicano	Mantacra	Quishuar/ Peru	12° 14' 14.62" S 74° 45' 56.43"W / 2914 msnm.
3	BOLON-Q	VC3	Cusco	Anjara Pata	Quishuar/ Peru	12° 15' 27.39"S 74° 46' 36.01"W / 2910 msnm.
4	CHULLPI-Q	VC4	Chullpi	Yacutoclla	Quishuar/ Peru	12° 15' 27.39"S 74° 46' 36.01"W / 2950 msnm.
5	ALMIDON-ST	VC5	Cusco	Buenos Aires	Santiago de Tucuma/ Peru	12°18'32.04"S 74°53'33.97"W / 3150 msnm.
6	ASTILLA BLANCA-ST	VC6	San Geronimo Huancavelicano	Huayrapire	Santiago de Tucuma/ Peru	12°18'41.10" S 74° 53' 37.57" / 3110 msnm.
7	CARHUAY-PI	VC7	San Geronimo Huancavelicano	Muuyupata	Pichos/ Peru	12° 14' 16.45" S 74° 46' 36.18"W / 3245 msnm.
8	HUAMAMSARA-PI	VC8	San Geronimo Huancavelicano	Huasahuayoco	Pichos/ Peru	12° 13' 59.10"S 74° 56' 02.13"W / 3140 msnm.
9	CHOCLERO-101	VT1	Cusco Gigante	INIA Cajamarca	Cajamarca/ Peru	7° 9'41.79" S 78°27'43.20"W / 2667 msnm.
10	INIAP 543-QPM	VT2	Nutrichoclo	INIAP Ecuador	Ecuador	-
11	B73	VT3	-	Maize Genome Databank	-	-

#### **4.2.3 Evaluación con Marcador morfológico**

La evaluación visual se realizó utilizando una mesa de luz para observar como marcador morfológico el nivel de opacidad del endospermo de 20 semillas elegidas al azar por cada variedad. En el proceso de selección se evaluaron las semillas de 8 poblaciones segregantes de las variedades seleccionadas. Además, se tomaron en cuenta dos testigos, un QPM y un maíz criollo con características agronómicas favorables.

#### **4.2.4 Protocolo para identificar la variabilidad genética del locus Opaco-2**

##### **4.2.4.1 Obtención del tejido vegetal**

Para la obtención de material vegetal se tomó muestras de las hojas jóvenes de mínimo 15 plántulas por variedad de 8 ecotipos criollos y 3 testigos (1 Variedad QPM, 1 Maíz Criollo con características favorables y un organismo modelo del Maize Genome Databank, Tabla 5). Los materiales corresponden a variedades en libre polinización.

Su germinación se llevó a cabo dentro de 5-7 días, luego, se procedió a tomar las muestras con tijeras esterilizadas y en bolsas de papel numeradas se colocaron las hojas que fueron sometidas a un proceso de deshidratación utilizando sílica gel. Para que la extracción de ADN sea exitosa se deben usar muestras del mismo tamaño, para ello se utilizaron perforadoras metálicas de un orificio.

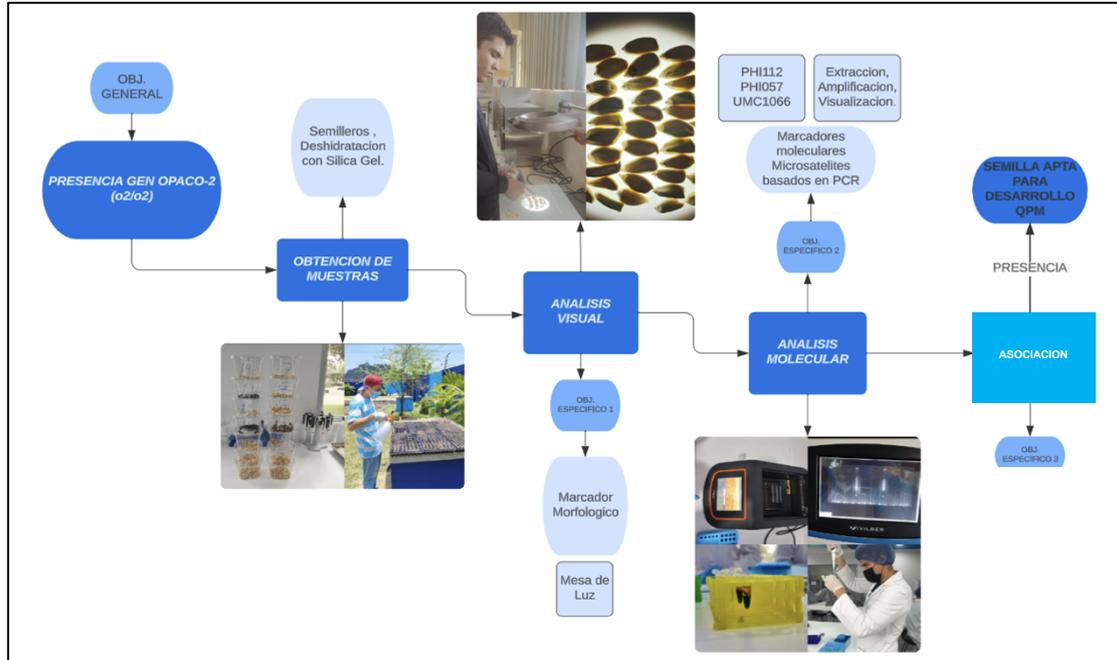


Figura 13. Diagrama de Flujo de Procesos de la Metodología Utilizada. (Elaborado por el autor).

#### 4.2.4.2 Extracción de ADN Genómico

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de material fresco de hojas jóvenes realizando un muestreo masal de la progenie por ecotipo. Para realizar el proceso de extracción del ADN se usó un procedimiento de extracción modificado, utilizando un tampón basado en CTAB, para obtener ADN de muestras de plantas, particularmente de hojas jóvenes (Borges, 2009), con los siguientes pasos:

- Las hojas deshidratadas de cada muestra fueron maceradas en un mortero utilizando nitrógeno líquido para lograr que el material se hiciera polvo.
- Luego, se le agregaron 800  $\mu$ L de un tampón de extracción CTAB al 3 %. Este tampón de extracción incluía EDTA 30 mM, Tris-HCl 0,1 M a pH 8,0, NaCl 1,2 M, CTAB al 3 % y  $\beta$ -mercaptoetanol al 3 % añadidos justo antes de su uso. Se macero la muestra hasta obtener una mezcla uniforme de material vegetal, este paso debe realizarse en menos de dos minutos para evitar que las cadenas de ADN se rompan.

- En un microtubo nuevo de 1,5 mL se colocó el material vegetal macerado. Luego, los microtubos se incubaron a 65°C durante 1 h, mezclando suavemente a 650 rpm en un termoagitador marca BioSan cada 15 min para asegurar una homogeneización adecuada.
- Después de la incubación, se agregaron 500 µL de cloroformo-álcohol isoamílico (24:1), se mezclaron suavemente durante 1 min y luego se centrifugaron a 15000 rpm durante 10 min en una centrífuga Mirko 200R Hettich.
- Después de la centrifugación, se transfirieron 500 µL del sobrenadante a un tubo nuevo, junto con un volumen igual de cloroformo-isoamilalcohol (24:1) y 200 µL de CTAB 3% (sin β-mercaptoetanol). Esta solución se mezcló suavemente y se centrifugó nuevamente a 15,000 rpm durante 10 min. Posteriormente, se transfirieron 500 µL del sobrenadante a un tubo nuevo con 350 µL de isopropanol frío a -20°C y se mezclaron suavemente por inversión.
- Luego, la solución se centrifugó a 15,000 rpm durante 10 min y el sedimento resultante se dejó secar al aire durante aproximadamente 12 h con los tubos invertidos sobre papel de filtro a temperatura ambiente.
- El sedimento se resuspendió en una solución tampón TE (10Mm Tris y 1Mm EDTA) agregando 200 µL de TE y 4 µL de ARNasa (10 mg/ml<sup>-1</sup>). Los microtubos se incubaron a 37°C durante 30 min y posteriormente se almacenaron a -20°C.

#### 4.2.4.3 Cuantificación de ADN

La cuantificación de ADN se realizó utilizando el fluorómetro Qubit 4. Se siguieron los pasos establecidos según el manual de la marca Invitrogen. Para la realización de este procedimiento se utilizó el Qubit dsDNA BR (Broad Range) Assay Kit el cual usa dos estándares y nuestras muestras.

Para medir la concentración de ADN se usaron microtubos con un volumen final de 200  $\mu\text{L}$ ; los estándares se midieron con 190  $\mu\text{L}$  de Dilution Buffer del kit y 10  $\mu\text{L}$  de cada estándar. Los microtubos que sirvieron para la cuantificación de ADN de las muestras llevaron 198  $\mu\text{L}$  de Dilution Buffer y 2  $\mu\text{L}$  de ADN genómico.

#### 4.2.4.4 Amplificación por PCR

Se amplificó el ADN de cada ecotipo utilizando cada par de marcadores SSR (phi112, umc1066, phi057). Además de nuestras muestras (11), se añadió una (1) reacción sin ADN molde la cual se completó con  $\text{H}_2\text{O}$  que sirvió como control negativo para reconocer que no haya contaminación entre las muestras ni error en el pipeteo. Se llevaron a cabo 12 reacciones por cada marcador, finalmente se armaron 36 reacciones en un total de 2 repeticiones.

Cada reacción de amplificación consistió en un volumen final de 25  $\mu\text{L}$  que se basó en: 2  $\mu\text{L}$  de ADN molde estandarizado a 30ng/ $\mu\text{L}$  de las muestras en cada repetición; para los 23  $\mu\text{L}$  restantes de cada reacción se realizó un SuperMix por cada marcador y sus repeticiones compuesto por: 12,5  $\mu\text{L}$  de GoTaq Green; 0,5  $\mu\text{L}$  de la disolución de cada par de cebadores (1 $\mu\text{L}$  cada marcador) y 9,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ .

Las reacciones de amplificación (PCR) se llevaron a cabo en un termociclador Techne® Prime usando un perfil de desnaturalización inicial a 94°C de 5 min, seguido de 35 ciclos compuestos por una desnaturalización a 94°C por 1 min, hibridación de los cebadores (annealing) a 60°C por 30 s y extensión a 72°C por 30 s. Finalmente, se terminó con un período de extensión final a 72°C durante 5 min. Las muestras se conservaron a 10 °C hasta que fueron retiradas del equipo para almacenarse a 8°C hasta su utilización.

#### **4.2.4.5 Visualización de los productos de amplificación**

La separación de los productos de amplificación se efectuó en una caja de electroforesis horizontal Mupid One Advance en geles con dimensiones 183mm(W)×59mm(H)×162mm(L); los geles se realizaron con la agarosa Metaphore al 2.5% en 100 mL de buffer TBE 0,5X.

Se hizo un gel de 13 pocillos por cada repetición donde se colocó los 12 productos de la PCR y una escalera molecular; en cada orificio de los geles se colocó 4  $\mu$ L de la reacción correspondiente , a excepción del espacio 7 donde se colocó 1  $\mu$ L de 25 pb Step Ladder de Promega y 2  $\mu$ L de Loading Dye. El armado de los geles se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante .

La electroforesis de los geles se llevó a cabo en buffer TBE 0,5X y 5  $\mu$ L de Diamond Dye 6X. El tiempo de corrida fue de 1 hora y 30 minutos a 100V constantes. La visualización de nuestros productos se realizó utilizando el sistema de observación de geles E-Box.

#### **4.2.4.6 Análisis de datos moleculares con ImageJ**

El tamaño de los fragmentos se determinó utilizando el programa de análisis de datos moleculares ImageJ por comparación con el marcador de peso molecular 25pb Step Ladder Promega que mide fragmentos de ADN con un incremento de 25-300 pb. Los productos de diferentes tamaños fueron considerados como diferentes alelos. Se realizó una ecuación de línea recta para estimar el tamaño de las bases.

#### **4.2.5 Análisis Estadístico**

Con la finalidad de realizar una evaluación visual del carácter morfológico en las muestras estudiadas, se tomaron datos cualitativos de 20 semillas por variedad en la mesa de luz, asignando un valor dentro de la escala de evaluación y registrando los valores en una hoja Excel, con 20 repeticiones. Se calcularon las medias y se determinó de manera cualitativa la presencia del gen *o2/o2*. Los datos se agruparon en un cuadro de excel por cada variedad.

Con respecto al análisis molecular, se registraron los alelos usando el ImageJ en una hoja Excel, para los tres marcadores SSR (Phi112, Phi057 y Umc1066). Se realizó una clusterización jerárquica en el programa JASP generando un dendrograma.

**CAPÍTULO 3: ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA  
INVESTIGACIÓN**

## 5.1 RESULTADOS

En el análisis visual se puede decir que los materiales tipo 3 característico en maíces que cuentan con el gen opaco-2 en su forma homocigota recesiva (o2/o2). Por otro lado, con el uso de los marcadores moleculares microsátélites llamados phi112, phi057, umc1066 se logró caracterizar los materiales que presentan el gen de interés mediante la amplificación, visualización y cuantificación de bandas del ADN con la ayuda de técnicas biotecnológicas como electroforesis y PCR Además, se llevó a cabo una clusterización jerárquica para que mediante un dendrograma se puedan agrupar los datos que permitirán identificar las variedades con aptitud QPM.

## 5.2. EVALUACION CARÁCTER MORFOLÓGICO (GRADO DE OPACIDAD)

En una cámara de luz se observó y seleccionó utilizando una escala de opacidad, obteniendo lo siguiente:

**Tabla 6.** Tabla de Opacidad Media por Variedad (Elaborado por el autor).

<i>Variedad</i>	<i>Grado de Opacidad Media</i>	<i>Presencia gen o2/o2 (Opacidad ≤ 3)</i>
1	4	No
2	4,15	No
3	5	No
4	4,9	No
5	3,1	Si
6	4,3	No
7	3,25	Si
8	3,95	No
9	5	No
10	3	Si

Mediante esta análisis se pudo obtener que las variedades 5, 7 y 10 eran de un grado de opacidad tipo 3 por lo que fueron seleccionadas. Estos datos sirvieron para inferir visualmente la presencia de o2/o2.

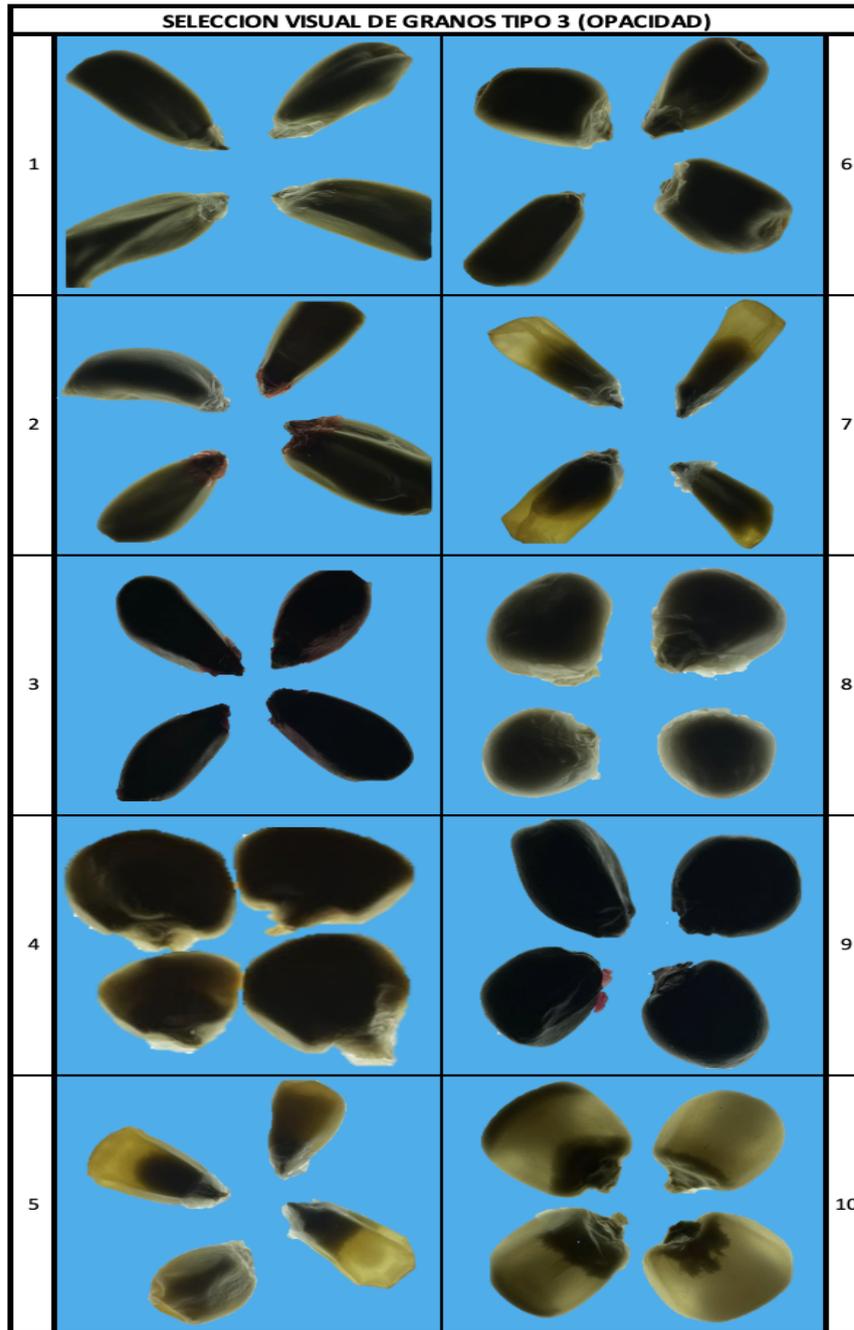


Figura 15. Semillas evaluadas en una cámara de luz (Elaborado por el autor).



Figura 15. Selección de granos en mesa de luz (Elaborado por el autor).

Se puede inferir sobre la presencia del gen Opaco-2, pero no se puede afirmar mediante los marcadores morfológicos la presencia de alelos recesivos o dominantes, lo cual es esencial en este trabajo de selección de semillas aptas para el desarrollo de variedades QPM.

El efecto positivo con respecto a 3 en las medias de las variedades con presencia podría llegar a deberse a factores ajenos al gen opaco-2, como genes o proteínas modificadoras del endospermo.

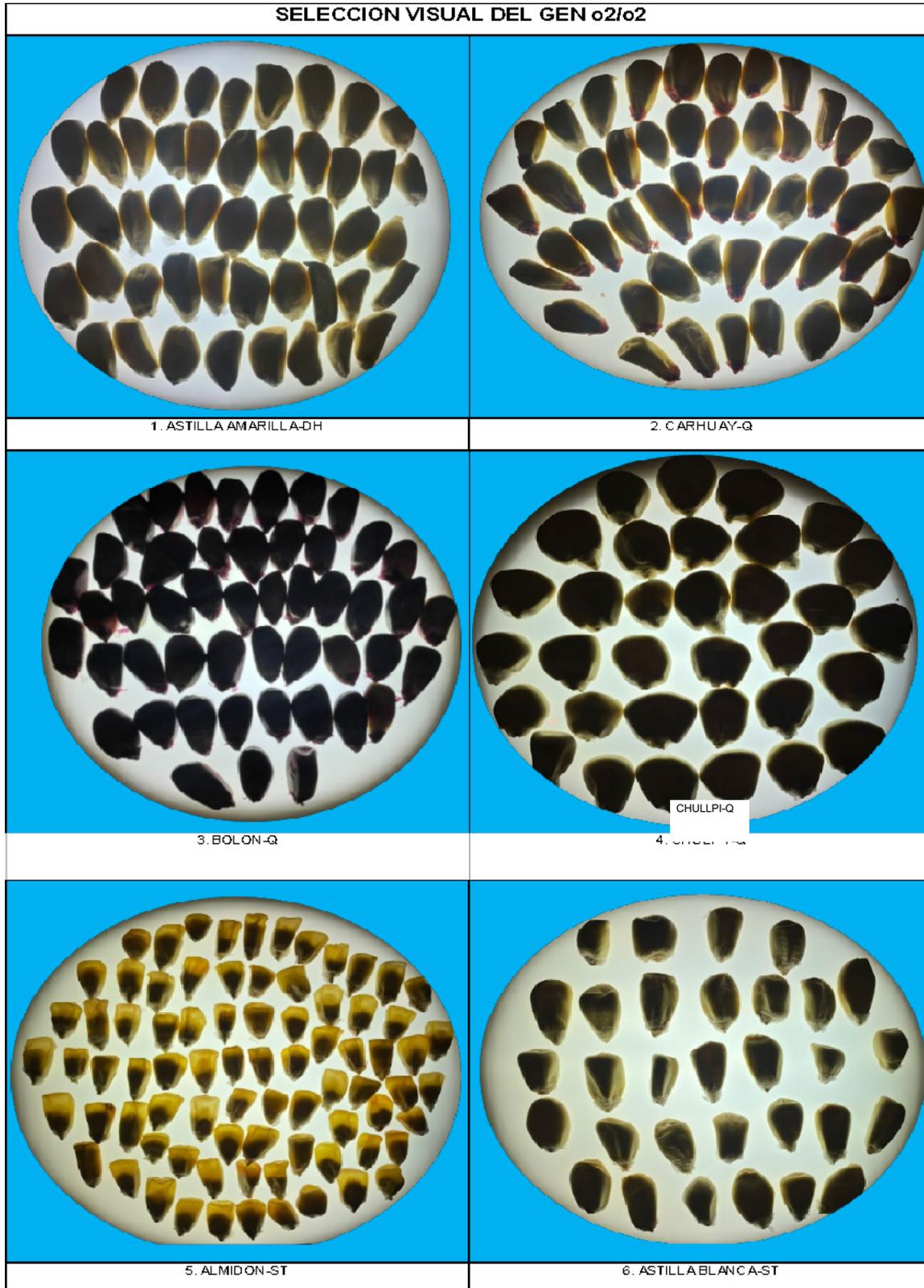


Figura 16. Semillas de materiales seleccionados en la cámara de luz (Elaborado por el autor).

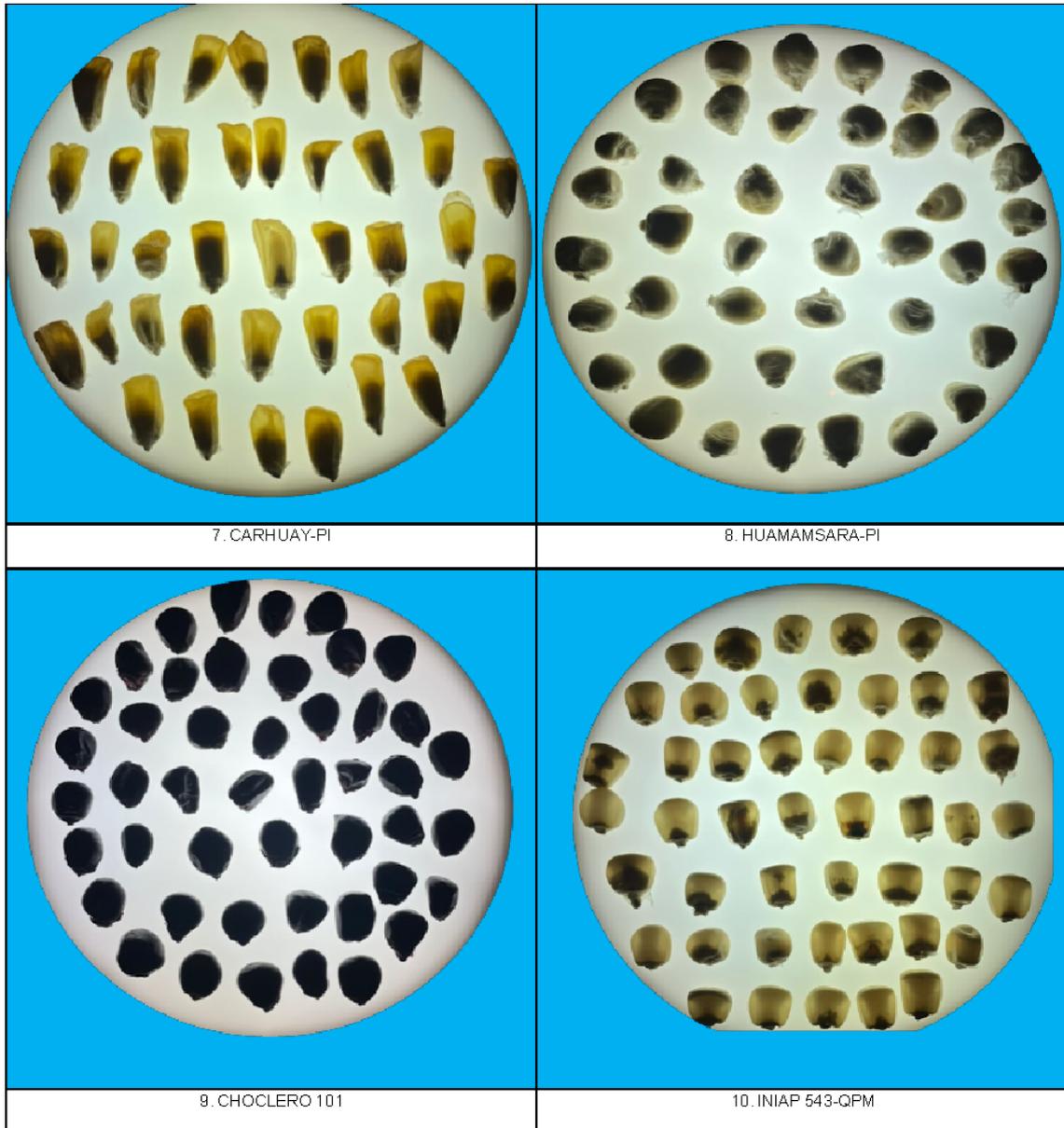


Figura 17. Semillas de materiales seleccionados en la cámara de luz (Elaborado por el autor).

### 5.3 Cuantificación de ADN

Los resultados obtenidos de la cuantificación de ADN fueron los siguientes:

**Tabla 7.** Concentraciones de ADN obtenidas por el método Broad Range dsDNA del Invitrogen Qubit 4 (Elaborado por el autor).

<i><b>Entrada</b></i>	<i><b>Variedad</b></i>	<i><b>Concentración (Ng/uL)</b></i>
1	Astilla Amarilla-DH	98,6
2	Carhuay-Q	282
3	Bolon-Q	238
4	Chullpi-Q	187
5	Almidon-ST	105
6	Astilla Blanca-ST	155
7	Carhuay-Pi	128
8	Huamamsara-Pi	508
9	Choclero-101	222
10	INIAP 543-QPM	704
11	B73	141

#### 5.4 Visualización de los productos amplificados

La visualización y cuantificación de bandas moleculares de uno de los geles dio resultado donde se pueden observar las variedades amplificadas donde se realizó por el análisis molecular.

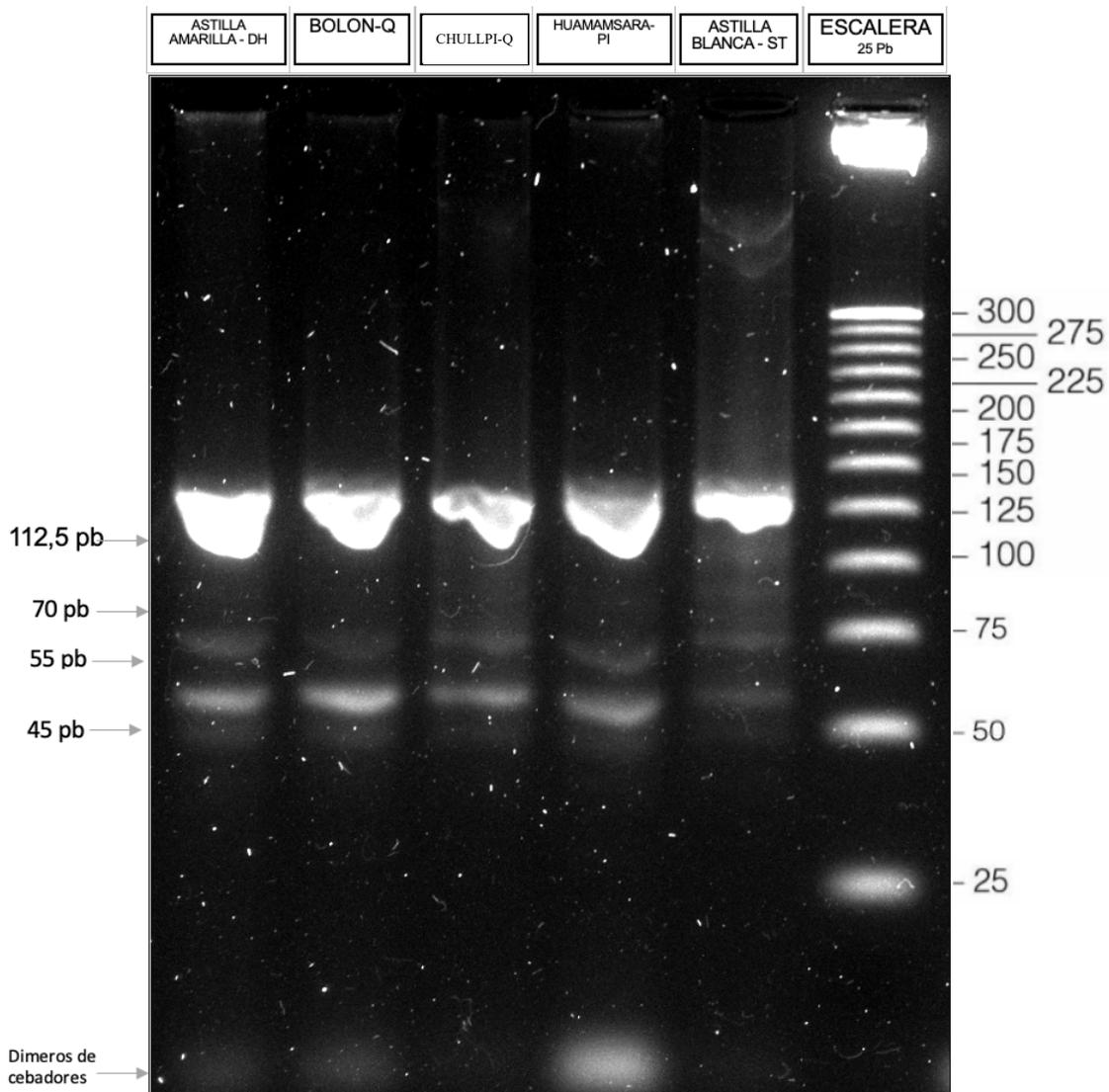


Figura 18. Amplificación de los productos aptos para mejoramiento QPM con uno de los marcadores utilizados (UMC1066).

## 5.5 Analisis Estadístico

Se obtuvieron 4 grupos en un dendrograma utilizando la distancia euclidiana. Se puede visualizar que las variedades criollas Bolon-Q, Chulpy-Q, Astilla Blanca-ST, Huamamsara-Pi y Astilla Amarilla-DH se agrupan con el testigo INIAP-543QPM. Las variedades restantes se acumularon en otros 2 grupos.

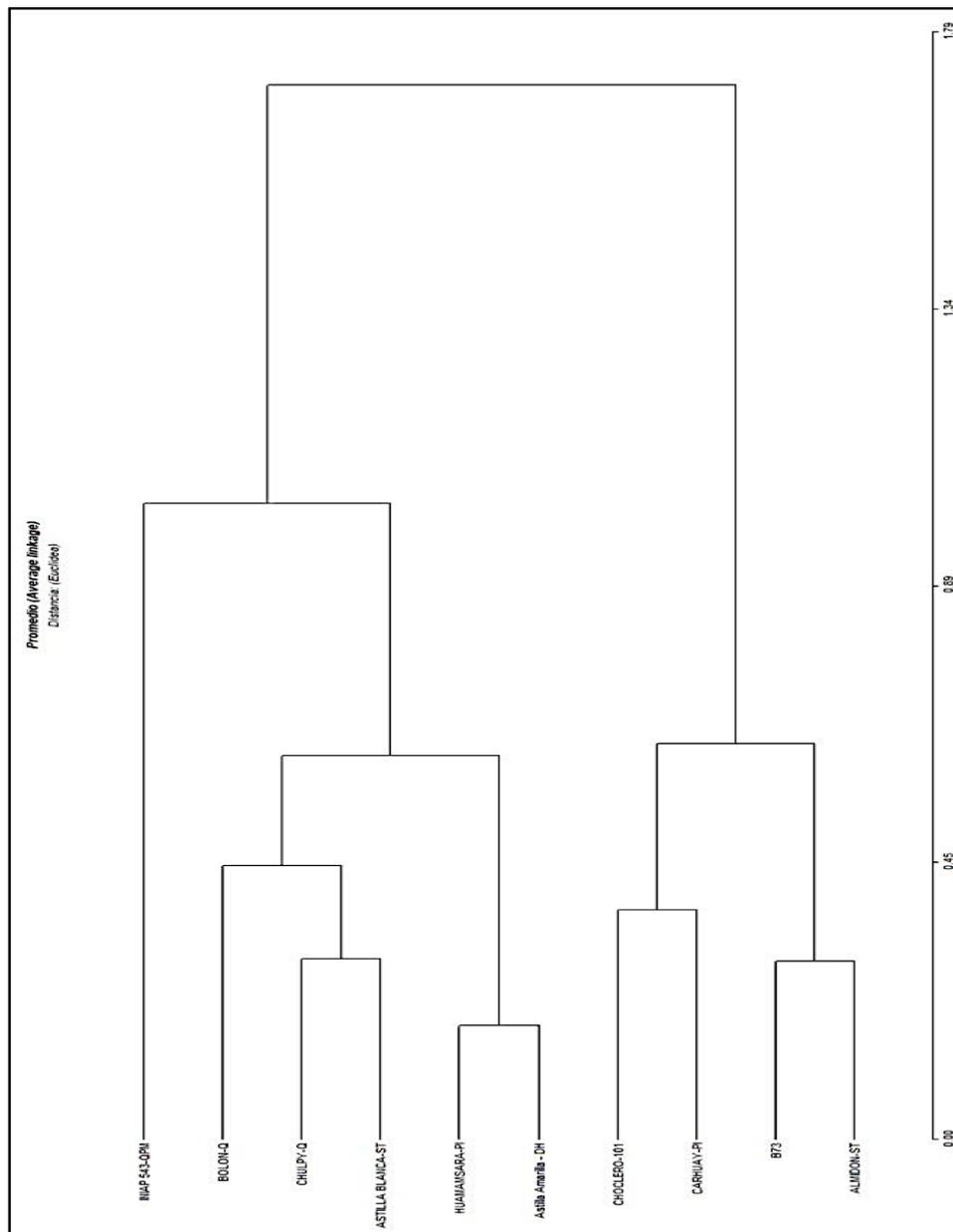


Figura 18. Dendrograma de clusterización euclidiana de las variedades estudiadas

**CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN, RECOMENDACIONES Y CONCLUSIÓN.**

## 6. DISCUSION

En relación con el marcador umc1066, se observa que presenta fragmentos de mayor tamaño en comparación con phi057 y puede ser resuelto eficientemente en geles de agarosa con concentraciones del 3-4% en la mayoría de los casos (Chin et al., 1996).

En cuanto al marcador phi112, tiende a ser dominante al detectar un alelo nulo (sin producto de amplificación) en las fuentes de opaco-2, aunque no de manera obligatoria. Este marcador puede resultar algo complejo, ya que no resulta útil en todas las poblaciones segregantes, como en retrocruzas, pero puede ser beneficioso en poblaciones F2 si el alelo nulo corresponde a opaco-2 (Chin et al., 1996).

Las variaciones en los sitios umc1066, phi057 y phi112 dentro del gen O2 incluyen cambios en el número de repeticiones de motivos SSR, con diferentes longitudes de fragmentos para cada cebador, así como variaciones en las regiones adyacentes a SSR, siendo que en phi112 puede no haber producto amplificado.

Las accesiones de QPM seleccionadas son de interés para los programas de mejora del maíz orientados a mejorar la calidad del grano. La aplicación de marcadores para los genes o2 y modificadores acelera el desarrollo de variedades de maíz QPM, y a su vez reduce considerablemente los costos laborales y financieros asociados con su producción.

Por otro lado, se requerirá conocer los niveles bioquímicos de los aminoácidos (Lisina y Triptófano) de los materiales que también serán un indicador de la presencia del gen o2/o2 y valor nutricional para la selección y desarrollo de las variedades.

## 7. RECOMENDACIONES

La calidad del ADN amplificado es muy importante para desarrollar estudios basados en marcadores moleculares microsatelites, la cantidad de hojas que se muestreen debe ser al menos de 15 individuos por variedad.

Por otro lado, se recomienda usar marcadores moleculares que además de estar ligados al gen de interés sean co-dominantes; esto debido a que la aptitud de una variedad para el desarrollo QPM se encuentra relacionada al grado de dominancia del gen en las variedades; estos marcadores son beneficiosos al momento de diferenciar sus alelos y bases.

Los microsatites resultan lo suficientemente seguros por lo que no se recomienda realizar el análisis visual del endospermo debido a que los datos no tendrían relación con la herencia genética que se busca investigar.

Obtener información sobre los niveles bioquímicos de los aminoácidos lisina y triptófano en las diferentes variedades puede resultar útil ya que estos datos podrían servir como un indicador de la presencia del gen *o2/o2*. Estos valores bioquímicos son fundamentales para la selección y desarrollo de variedades con un contenido nutricional elevado en proteínas.

Se sugiere la utilización conjunta de los tres marcadores en la selección asistida por marcadores moleculares para materiales de maíz con alto contenido de lisina (Orlovskaya, 2015).

## 8. CONCLUSION

En conclusión, la evaluación visual resultó útil para reconocer granos que tengan un grado de vitrosidad correspondiente a un maíz con alto contenido de proteína; pero no se puede realizar la selección de variedades criollas con este método. Los datos obtenidos del estudio visual no son útiles para realizar la selección de variedades criollas.

En el análisis molecular se obtuvieron bandas de dos testigos INIAP 543-QPM de valor para la selección de este tipo de materiales con alto contenido proteico, y B73, este último no corresponde a una variedad de alto contenido de proteínas por lo que sirvió como organismo modelo para la secuenciación genómica del maíz. Ambos materiales fueron buenos testigos de los experimentos.

Debido a esto, la utilización de los cebadores estudiados para procesos de selección de variedades nativas es efectiva; los procesos de Selección Asistida con marcadores requieren una respuesta más específica por lo que se sugiere la utilización de cebadores co-dominantes para poder realizar un trabajo de mejoramiento QPM práctico.

Además, el análisis molecular es útil para seleccionar variedades con poca variabilidad genética para realizar mejoramiento y también al momento deseleccionar variedades específicas mediante procesos de selección asistida con marcadores moleculares.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahenkora K, Twumasi-Afriyie S, Haag W, Dzah B D. (1995). Ghanaian kenkey from normal And quality protein maize: comparative chemical composition and rat growth trials. *Cereal Research Communications*. Vol. 23: Cap.3. pp. 299-304.
- Bhatnagar, S. (2004). Phenotypic and genotypic characterization of high lysine maize. Tesis para acceder al Grado de Doctor of Philosophy. Texas A&M University. 183pp.
- Bjarnason, M., & Vasal, S. K. (1992). Breeding of quality protein maize (QPM). *Plant breeding reviews*, 9(2), 181-216.
- Borges, A., Rosa, M. S., Recchia, G. H., Queiroz-Silva, J. R. D., Bressan, E. D. A., & Veasey, E. A. (2009). CTAB methods for DNA extraction of sweetpotato for microsatellite analysis. *Scientia Agricola*, 66, 529-534.
- Bressani, R. (1972). La importancia del maíz en la nutrición humana, en América Latina y otros países. En R. Bressani, J.E. Braham y M. Béhar, eds. *Mejoramiento nutricional del maiz*. Pub. INCAP L-3, p. 5-30. Guatemala, INCAP.
- Bressani, R. (1992). Nutritional value of high-lysine maize in humans. In: E.T. Mertz (ed.). *Quality Protein Maize*. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN. USA.
- Bressani, R. & Elias, L. (1969). Studies on the use of opaque-2 corn in vegetable proteinrich foods. *J. Agric. Food Chem.* 17: 659-662.

- Bressani, R. & Elias, L.G. (1966). All-vegetable protein mixtures for human feeding. The development of INCAP Vegetable Mixture 14 based on soybean flour. *J. Food Sci.* 31: 626.
- Cárdenas Guzmán, R. M. (2021). Política comercial y arancelaria aplicada al mercado del maíz amarillo duro (*Zea mays* Durum) en Perú del 2000-2016.
- Caviedes, M., Carvajal-Larenas, F. E., & Zambrano, J. L. (2020). Tecnologías para el cultivo de maíz (*Zea mays*. L) en el Ecuador. *ACI Avances En Ciencias e Ingenierías*, (1).
- Charcosset A and A Gallais. (2003). Application of Markers in Selection. In: *Molecular Markers in plant Genetics and Biotechnology*. Ed. Dominique de Vienne. Institute National de la Recherche Agronomique Versailles, France. INRA. pp. 153
- Chin ECL, Senior ML, Shu H, Smith JSC (1996) Maize simple sequence repetitive DNA sequences: abundance and allele variation. *Genome* 39:866–873.
- Córdova H S, A Krisvanek, A Ramírez & M Sierra. (2005). Yield potential and combining ability of tropical quality protein maize inbred lines. 97 Annual Meeting ASA. Salt Lake City Utah, November 6 to 10, 2005.
- Crow, James F. & Jerry Kermicle. (2002). “Oliver Nelson and quality protein maize.” *Genetics* 160.3: 819-821.
- Danilo Mejía, P. AGST. (2003). MAIZE: Post-Harvest Operation. *Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), AGST*.

- De Vienne D, S Santoni, & MFalkee. (2003). Principal sources of molecular markers. In: *Molecular Markers in plant Genetics and Biotechnology*. Ed. Dominique de Vienne. Institute National de la Recherche Agronomique Versailles, France. INRA. P. 3.
- Dreher, K., Khairallah, J., Ribaut, J. M., Morris, M. (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.
- ELIAS, M.; MÜHLEN, G.S.; McKEY, D.; ROA, A.C.; TOHME, J. Genetic diversity of traditional South American landraces of cassava (*Manihot esculenta* Crantz): an analysis using microsatellites. *Economic Botany*, v.58, p.242-256, 2004.
- ENSANUT. (2018). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. Tomo 1*.
- FAO. (1992). *El maíz en la nutrición humana*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma, Italia. Recuperado en agosto del 2023, de <https://www.fao.org/3/t0395s/T0395S00.htm#Contents>
- Florencio, R. H. (2005). Aptitud combinatoria y comportamiento híbrido de líneas de maíz tropicales" QPM" seleccionadas por métodos convencionales y marcadores moleculares.
- Gibbon, B. C., & Larkins, B. A. (2005). Molecular genetic approaches to developing quality protein maize. *Trends in Genetics*, 21, 227–233.

- Godoy, J. (2009). La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies: . *Ecosistemas*, 18(1). Recuperado a partir de <https://www.revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/view/3>
- González, Delkin Orlando; Palacios, Natalia; Gallego, Gerardo J.; Tohme M., Joseph (comps.). 1995. Protocolos para marcadores moleculares. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, CO. 82 p. (Publicación CIAT no. 258)
- Gutiérrez-Rojas, A., Scott, M.P., Leyva, O.R., Menz, M., Betrán, J. (2008). Phenotypic characterization of quality protein maize endosperm modification and amino acid contents in a segregating recombinant population. *Crop Science* 48:1714-1722.
- Habben, J E., et al. (1995). "Elongation factor 1 alpha concentration is highly correlated with the lysine content of maize endosperm." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92.19: 8640-8644.
- Hartings, H., Fracassetti, M., Motto, M. (2012). Genetic enhancement of grain quality-related traits in maize, *Transgenic Plants-Advances and limitations*. Ozden Çiftçi (Ed.). Available from: <http://www.intechopen.com/books/transgenic-plants-advances-and-limitations/genetic-enhancement-of-grain-quality-related-traits-in-maize>
- Hartings, H., M. Lauria, N. Lazzaroni, R. Pirona, and M. Motto. (2011). The Zea mays mutants opaque-2 and opaque-7 disclose extensive changes in endosperm metabolism as revealed by protein, amino acid, and transcriptome-wide analyses. *BMC Genomics* 12:41.

- Hartings, H., Maddaloni, M., Lazzaroni, N., Di Fonzo, N., Motto, M., Salamini, F., Thompson, R. (1989). The O2 gene which regulates zein deposition in maize endosperm encodes a protein with structural homologies to transcriptional activators. *European Molecular Biology Organization Journal* 8(10):2795-2801.
- Henry, A.M., Manicacci, D., Falque, M., Damerval, C. (2005). Molecular evolution of the Opaque-2 gene in *Zea mays* L. *Journal of Molecular Evolution* 61:551-558.
- Huang S., Frizzi, A., Florida, C.A., Kruger, D.E., Luethy, M.H. (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.
- INEC (2019). Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua (espac) 2018. techreport, Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. Online: <https://bit.ly/2YcJYaN>
- Karen Lucero. (2020). El ecuatoriano transita entre la desnutrición y el sobrepeso. *Revista GESTIÓN*.
- Lopes, M. A., & Larkins, B. A. (1991). Gamma-zein content is related to endosperm modification in quality protein maize. *Crop Science*, 31, 1655–1662.
- Maddaloni, M., Donini, G., Balconi, C., Rizzi, E., Gallusci, P., Forlani, F., Lohmer, S., Thompson, R. (1996). The transcriptional activator Opaque-2 controls the Expression of a cytosolic form of pyruvate orthophosphate dikinase-1 in maize endosperms. *Molecular and General Genetics* 250:647-657.

- Maddaloni, M., N. Di Fonzo, H. Hartings, N. Lazzaroni, F. Salamini, R.D. Thompson & M. Motto. 1989. The sequence of the zein regulatory gene opaque-2 (O2) of *Zea mays*. *Nucleic Acids Research* 17: 7532-7535.
- Maffia L M D, E e Helen, and T M Edwin (1989) Protein quality of two varieties of high-Lysine maize fed alone and with black beans or milk to normal and depleted weanling Rats. *The American Journal of clinical Nutrition* 29; pp. 817-824 USA.
- Martínez Augustin, O. , & M. de V. E. . (2006). *Proteínas y péptidos en nutrición enteral*.
- Martínez B F, J De Figueroa and SALarios. (1996). High lysine extruded products of quality Protein maize. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 71: 2. Pp.151-155.
- Martínez, M., Ríos, H., Miranda, S., Moreno, I., Acosta, R., Farrera, A., Velazco, J. (2006). Caracterización de la diversidad y selección participativa de prospecciones de maíz en Chiapas, México. *Cultivos Tropicales* 27(1):55-62.
- Olmos, S. (2004). SELECCIÓN ASISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES Y SU APLICACIÓN EN EL MEJORAMIENTO GENÉTICO DE TRIGO. *Facultad de Ciencias Agrarias. UNNE*.
- Olmos, S. (2004). Selección asistida por marcadores moleculares y su aplicación en el mejoramiento genético.
- Prasanna BM, Vasal SK, Kassahun B, SN N (2001) Quality protein maize. *Curr Sci* 81:1308–1319.

- Recendiz Hurtado Florencio. (2005). *Aptitud combinatoria y comportamiento híbrido de líneas de maíz tropicales "QPM" seleccionadas por métodos convencionales y marcadores moleculares*. Universidad de Guadalajara.
- Soza Sevilla, M. J. (2022). Caracterización molecular de 25 accesiones de maíz blanco (*Zea mays* L.) provenientes de nueve departamentos de Nicaragua, 2019-2021 (Doctoral dissertation, Universidad Nacional Agraria).
- Tautz D. & Renz M. (1984). Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic Genomes. *Nucleic Acids Research*. 12: 4127-4138.
- Valadez M E & G Kahl. (2000). *Huellas de ADN en genomas de plantas (teoría y protocolos de Laboratorio)*. Mundi Prensa S.A. de CV. Universidad Autónoma de Chapingo.
- Vicente-Carbajosa J, Moose SP, Parsons RL, Schmidt RJ. (1997). A maize zinc-finger protein binds the prolamin box in zein gene promoters and interacts with the basic leucine zipper transcriptional activator Opaque2. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 7685–7690.
- Viteri, F., Martínez, C. & Bressani, R. (1972). Evaluación de la calidad proteínica del maíz común, del maíz opaco-2 y del maíz común suplementado con aminoácidos y otras fuentes de proteína. En R. Bressani, J.E. Braham y M. Béhar eds. *Mejoramiento nutricional del maíz*. Pub. INCAP L-3, p. 195-208. Guatemala, INCAP.

- Vivek, B. S., Krivanek, A. F., Palacios-Rojas, N., & Twumasi-Afriyie, S. (2008). *Mejoramiento de maíz con calidad de proteína (QPM): Protocolos para generar variedades QPM* (No. 560-2016-38856).
- Vivek, B. S., Krivanek, A. F., Palacios-Rojas, N., Twumasi-Afriyie S., & Diallo, A. O. (2008). *Mejoramiento de maíz con calidad de proteína (QPM): Protocolos para generar variedades QPM*. México, D.F.: CIMMYT. Pp. 66.
- Wang X, Jose A, Bryan CG, Lopez-Valenzuela JA, Gakiere B, Galili G, Larkins BA. (2007). Characterization of monofunctional aspartate kinase genes in maize and their relationship with free amino acid content in the endosperm. *J Exp Bot* 58(10):2653–2660.
- Wang, X.L. & Larkins, B.A. (2001). Genetic analysis of amino acid accumulation in opaque-2 maize endosperm. *Plant Physiology* 125:1766-1777.
- Weising K., Nybom H., Wolff K. & Kahl G. (2005). *DNA Fingerprinting in Plants. Principles, Methods, and Applications*. Taylor & Francis Group, Segunda Edición. E.U.A.
- Yang, W., Zheng, Y., Ni, S., Wu, J. (2004). Recessive allelic variations of three microsatellite sites within the O2 gene in maize. *Plant Molecular Biology Reporter* 22:361-374.
- Zambrano, J. L., Yáñez, C., Sangoquiza, C., Limongi, R. Alarcón, D., Zambrano, E., Caicedo, M., Villavicencio, P., Cartagena, Y., ... Pinargote, L. (octubre, 2019). Situación del cultivo de maíz en Ecuador: investigación y desarrollo de tecnologías en el Iniap [Resumen]. Ponencia presentada en XXIII Reunión Latinoamericana del Maíz y IV Congreso de Semillas (p. 30- 31). Mosquera, Colombia: AGROSAVIA

Zeng, M., Qian, L. Nan, Y. & S, Qing. (1995). The accumulation of lysine controlled by The o2 gene in QPM. Maize Genetics Cooperation Newsletter. No. 69, pp.17-18.