

MONITOREO DE LA CALIDAD PROTEICA DE MAÍZ *o2* (*Zea mays* L.) EN LÍNEAS ENDOGÁMICAS Y SU PROGENIE F₁ Y F₂

MONITORING PROTEIN QUALITY OF *o2* MAIZE (*Zea mays* L.) IN INBRED LINES AND THEIR F₁ AND F₂ PROGENY

J. Luis Arellano-Vázquez¹, J. Manuel Vázquez-Ramos², Elpidio García-Ramírez²,
Y. Mercedes Gómez y-Gómez³, G. Fernando Gutiérrez-Hernández^{3*}

¹Programa de Maíz, Campo Experimental Valle de México, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. km 13.5 Carretera Los Reyes-Texcoco. 56250. Coatlínchán, Texcoco, México (arevajolu@yahoo.com.mx). ²Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Avenida Universidad y Copilco. 04510. Ciudad de México, México (jorman@unam.mx, elpidio@unam.mx.). ³Departamento de Bioprocesos, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotechnología, Instituto Politécnico Nacional. Avenida Acueducto s/n. 07340. La Laguna Ticomán. Ciudad de México, México (ygamezipn@hotmail.com, enredipn@yahoo.com.mx).

RESUMEN

El maíz *opaco 2* (*o2*) (*Zea mays* L.) es una opción para mejorar la nutrición humana en sectores sociales que basan su alimentación en este cereal, por sus elevados contenidos de los aminoácidos esenciales lisina y triptófano, por lo cual su mejoramiento genético es relevante. En este estudio se analizó la obtención de híbridos de maíz *o2*, desde las líneas parentales hasta la generación de consumo de grano (la F₂). Los objetivos fueron determinar el contenido de triptófano, lisina, proteína total e índice de calidad de proteína de seis líneas de maíz *o2*, de las 15 cruza simples formadas con ellas y de la generación F₂ de esas cruza, y además observar si esas variables disminuyen al pasar de la F₁ a la F₂. En el año 2011 se sembraron las líneas de maíz *o2* (M1 a M6) y las 15 cruza simples directas formadas con las líneas anteriores, mientras que la generación F₂ de las cruza anteriores y el H70 (testigo regional) se sembraron al año siguiente. El diseño experimental fue completamente al azar con dos repeticiones. En el grano cosechado de cada genotipo se determinaron los contenidos de lisina, triptófano, proteína total e índice de calidad de proteína y se estimaron las diferencias de estos valores entre F₁ y F₂. Las líneas M2 y M3 y las cruza M2 x M4, M2 x M6 y M3 x M6 presentaron los contenidos más altos de lisina, triptófano, proteína total e índice de calidad de proteína. La calidad de proteína no fue estable en la F₂, a excepción de M3 x M6 que conservó el índice de calidad de

ABSTRACT

Because of its high contents of essential amino acids lysine and tryptophan, *opaque-2* (*o2*) maize (*Zea mays* L.) is an option for improving human nutrition in social sectors whose diet is based on maize. For this reason, its genetic improvement is relevant. This study analyzed the *o2* maize hybrids from the parent lines up to the generation of grain for consumption (F₂). The objectives were to determine the contents of tryptophan, lysine and total protein and the quality protein index of the six *o2* maize lines, of the 15 single crosses formed with these lines and the F₂ generation of these crosses, as well as to observe whether these variables decreased between F₁ and F₂. The *o2* maize lines (M1 to M6) and the 15 single direct crosses formed with these lines were sown in 2011, whereas generation F₂ of the crosses and H70 (regional control) were sown the following year. The experimental design was completely randomized with two replications. Contents of lysine, tryptophan and total protein and the quality protein index were determined in harvested grain of each genotype, and differences in these values between F₁ and F₂ were estimated. Lines M2 and M3 and the crosses M2 x M4, M2 x M6 and M3 x M6 had higher contents of lysine, tryptophan and total protein and a higher quality protein index. Protein quality was not stable in F₂, with the exception of M3 x M6, which maintained the ICP in this generation and was the most consistent and stable cross. Inbreeding depression did not affect the crosses with intermediate protein quality (M2 x M5 and M5 x M6) nor did it affect lysine content, which was the experimental variable with the best response in all of the breeding stages.

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: enero, 2016. Aprobado: julio, 2016.

Publicado como ARTÍCULO en Agrociencia 51: 425-436. 2017.

proteína en esta generación y fue la cruza más consistente y estable. La depresión endogámica no incidió sobre las cruzas con calidad intermedia de proteína (M2 x M5 y M5 x M6) y tampoco sobre la lisina, que fue la variable experimental de mejor respuesta en todas las etapas genotécnicas.

Palabras clave: aminoácidos esenciales, calidad de proteína, depresión endogámica, lisina, *opaque2*, QPM, triptófano.

INTRODUCCIÓN

El grano de maíz es importante para la alimentación humana en América Latina y África (OCDE/FAO, 2011). En México es el cultivo principal, ocupa 33 % de la superficie sembrada nacional (7.5 millones ha), en el 2013 se produjeron 22.7 millones t de grano, el rendimiento nacional medio es 3.2 t ha⁻¹, lo cual representa el 18 % del valor de la producción agrícola (78 mil millones de pesos) (FAOSTAT, 2014) y se estima un consumo anual aparente de 210 kg de grano por persona (Morris y López, 2000).

El maíz es el alimento de mayor consumo y la principal fuente de proteínas (39 %) y energía (59 %) (Fernández *et al.*, 2013), en particular de la población rural y zonas citadinas marginales (Nuss y Tanumihardjo, 2011). Pero sus proteínas son deficientes en lisina y triptófano, aminoácidos esenciales para el metabolismo celular que no se sintetizan en los humanos y deben suministrarse mediante alimentos de origen animal.

El endospermo del maíz contiene 75 % de almidón y 15 % de proteína (Manicacci *et al.*, 2009). Esta última se almacena principalmente como zeína que es deficiente en lisina y triptófano (Serna *et al.*, 2008); por lo tanto, al consumir el grano del maíz solo se aprovecha 65 % de la proteína total (Gerdes *et al.*, 2012).

Para contribuir a reducir la desnutrición y optimizar la situación alimentaria, el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) y el programa HarvestPlus impulsan cultivos biofortificados (Nuss y Tanumihardjo, 2011) y trabajan de forma mancomunada con los programas nacionales. Entre sus objetivos está aumentar el valor nutricional del grano de maíz mediante el gen *opaque2* (*o2*).

El gen mutante *o2* se expresa en condición homocigótica recesiva y determina un mayor contenido de lisina y triptófano (Mertz *et al.*, 1964; Krivanek *et al.*, 2007). El valor nutritivo alto de estos maíces, llamados entonces *opaque2*, se ligaba con características

Key words: essential amino acids, quality protein, inbreeding depression, lysine, *opaque2*, QPM, tryptophan.

INTRODUCTION

Maize grain is the major component of human diets in Latin America and Africa (OCDE/FAO, 2011). In Mexico, it is the main crop, occupying 33 % of the country's cultivated area (7.5 million ha). In 2013, 22.7 million t of grain was produced, accounting for 18 % of the value of agricultural production (78 billion pesos) (FAOSTAT, 2014); the national mean yield is 3.2 t ha⁻¹. Apparent annual *per capita* consumption of the grain is estimated at 210 kg (Morris and López, 2000).

Maize is the food of highest consumption and the main source of proteins (39 %) and energy (59 %) (Fernández *et al.*, 2013), particularly for rural and marginalized urban populations (Nuss and Tanumihardjo, 2011). But, its proteins are deficient in lysine and tryptophan, which are essential amino acids for cell metabolism and, because humans cannot synthesize them, they must be supplied by food from animal sources.

Maize endosperm contains 75 % starch and 15 % protein (Manicacci *et al.*, 2009). The latter is stored mainly as zein, which is deficient in lysine and tryptophan (Serna *et al.*, 2008). For this reason, only 65 % of total proteins in consumed maize grain is used (Gerdes *et al.*, 2012).

To contribute to reducing malnutrition and to optimize the food situation, the Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) and the HarvestPlus program promote biofortified crops (Nuss and Tanumihardjo, 2011) and work hand in hand with national programs. Among their objectives is to increase the nutritional value of maize grain with the gene *opaque2* (*o2*).

The mutant gene *o2* is expressed in recessive homozygous conditions and determines a higher content of lysine and tryptophan (Mertz *et al.*, 1964; Krivanek *et al.*, 2007). Initially, the high nutritional value of these maize varieties, thus called *opaque2*, was linked to undesirable characteristics of the kernels, such as soft endosperm, low weight and low resistance to diseases and storage pests (Bjarnason and Vasal, 1992). These characteristics limited their use until, with traditional breeding techniques, genes that modify *opaque2* maize endosperm texture were incorporated (Vasal, 1994; Larkins *et al.*, 1994), and

indeseables del grano como endospermo con textura suave, bajo peso y poca resistencia a enfermedades y plagas de almacén (Bjarnason y Vasal, 1992). Lo anterior limitaba su uso hasta que mediante técnicas de mejoramiento tradicional se incorporaron genes modificadores de la textura del endospermo del maíz *opaco2* (Vasal, 1994; Larkins *et al.*, 1994) y se obtuvieron maíces con características muy semejantes a genotipos no modificados (Mendoza-E. *et al.*, 2006), y se denominaron maíces con alta calidad de proteína (MCP o QPM, siglas en inglés).

El mejoramiento genético de los maíces *o2* es complejo porque hay numerosos genes que regulan el desarrollo del endospermo (Holding *et al.*, 2008), y sólo algunos de ellos se han identificado; además, la expresión de la calidad de proteína es afectada por el ambiente (Landry y Delhay, 2007) y, en particular, por la dosis de fertilización (Gutiérrez *et al.*, 2014). Por lo tanto, la denominación de MCP implica la respuesta genotípica y fenotípica del cultivar y la tecnología de producción (Vázquez *et al.*, 2012). El éxito de la tecnología de los MCP estriba en que sus ventajas nutricionales se preserven hasta la generación F₂ porque es la destinada a la alimentación humana y animal, y podría ser también la semilla para el siguiente ciclo de cultivo, dado el alto costo de la semilla híbrida.

La semilla F₁ la siembra el agricultor para establecer el cultivo, el grano cosechado es la generación F₂ y es para el consumo. Por ello es relevante lograr que los atributos de calidad alta de la proteína estén codificados en el genoma de las líneas progenitoras, preservadas en las F₁ y expresadas en la F₂.

Hay poca información del monitoreo de la calidad de proteína a través de las diferentes etapas de formación de híbridos de maíz *o2*, desde líneas parentales hasta la cosecha del grano para uso alimenticio. Así los objetivos de este estudio fueron: 1) Determinar el contenido de triptófano, lisina, proteína total e índice de calidad de proteína de seis líneas de maíz *o2*, de 15 cruza simples formadas con ellas y de la generación F₂ de esas cruza; y 2) observar si esas variables disminuyen al pasar de la F₁ a la F₂.

MATERIALES Y MÉTODOS

Siembra en campo

La siembra en campo se efectuó en el Campo Experimental Valle de México del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales,

maize with characteristics very similar to unmodified genotypes were obtained (Mendoza-E. *et al.*, 2006) and denominated quality protein maize (QPM).

Breeding *o2* maize is complex because there are numerous genes that regulate the development of the endosperm (Holding *et al.*, 2008), and only some of them have been identified. Moreover, expression of quality protein is affected by the environment (Landry and Delhay, 2007), especially by the dosage of fertilization (Gutiérrez *et al.*, 2014). For this reason the denomination QPM implies a genotypic and phenotypic response of the cultivar to production technology (Vázquez *et al.*, 2012). Success of the QPM technology lies in the preservation of its nutritional advantages up to the F₂ generation, which is destined to become human and animal food and could be used for seed in the following crop cycle, given the high cost of hybrid seed.

Growers sow F₂ seed to establish the crop, and the harvested grain is generation F₂, which is for food. For this reason, it is relevant to assure that the attributes of high quality protein is coded in the genome of the parent lines, preserved in F₁ and expressed in F₂.

There is little information on monitoring protein quality through the different stages of *o2* maize hybrid formation, from parent lines to food grain harvest. Therefore, the objectives of this study were 1) to determine the tryptophan, lysine, and total protein contents and quality protein index of six *o2* maize lines, of 15 single crosses formed by these lines and of generation F₂ of these crosses; and 2) to observe whether these variables decrease from F₁ to F₂.

MATERIALS AND METHODS

Field planting

Field planting was carried out in the Campo Experimental Valle de México of the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CEVAMEX, INIFAP) located in Chapingo, México (19° 29' N and 98° 53' W), altitude 2240 m. The climate is temperate with 643 mm of rainfall in summer and average annual temperature of 15.1 °C, and the soil is sand clay.

Lines and F₁ crosses were sown on April 27, 2012, and both crops were managed as described below.

The experimental design was complete randomized blocks with three replications. The genetic material was planted in plots comprising two furrows measuring 5.0x0.80 m, with 26 plants in each row 0.20 m apart. Plant density was 65 thousand plants ha⁻¹ and the dosage of fertilizer (kg ha⁻¹) was N (120), P (60),

Agrícolas y Pecuarias (CEVAMEX, INIFAP) ubicado en Chapingo, México (19° 29' N y 98° 53' O), 2240 m de altitud, clima templado con 643 mm de precipitación en verano y temperatura promedio anual de 15.1 °C, y con suelo arcillo-arenoso.

Las líneas y cruza F_1 se sembraron el 20 de abril del 2011. Las cruza F_2 el 27 de abril del 2012, y ambos cultivos se manejaron como se describe a continuación.

El diseño experimental fue de bloques completos al azar con tres repeticiones. Los materiales genéticos fueron sembrados en parcelas cuyo tamaño fue de dos surcos de 5.0 x 0.80 m, con 26 plantas por surco con una separación entre ellas de 0.20 m. La densidad de población fue 65 mil plantas ha^{-1} y la dosis de fertilización ($kg\ ha^{-1}$) fue N (120), P (60), K (30). Los riegos de auxilio se aplicaron a los 40, 90 y 120 d después de la siembra (dds).

Alrededor de la madurez fisiológica del cultivo (150 dds), se eligieron al azar diez plantas con competencia completa por repetición, se cosecharon y desgranaron a mano, se mezclaron los granos de las repeticiones y de ellos se tomaron las dos muestras de 100 g usadas para las determinaciones químicas. Los granos se almacenaron con 10 % de humedad hasta su análisis.

Material genético

Los tipos de materiales genéticos fueron:

- 1) Seis líneas endogámicas de maíz *opaque2* (*o2*), con grano blanco y endospermo con textura normal (M1 a M6), derivadas de la cruce de las líneas CML 244 (S4), CML 352 (S5), CML 242 (S4), CML 246 (S3), CML 349 (S5) y CML 354 (S3) con la línea CML176 [(P63-12-2-1/P67-5-1-1)-1-2-B-B] del CIMMYT, ésta fue la donadora del gen *o2*; después se retrocruzaron tres ciclos hacia material normal, se autofecundaron y se hicieron incrementos masivos de ellas para recombinarlas y estabilizarlas (Cuadro 1).
- 2) Las 15 cruza simples directas formadas con las líneas anteriores (plantas S1, S2 o S3, según sus autofecundaciones posteriores al retrocruzamiento, con embriones F_1 en el campo de cultivo).
- 3) La generación F_2 de las cruza anteriores (plantas F_2 con embriones F_2 , en el campo de cultivo), se incluyó como testigo regional al H70, híbrido comercial con proteína y endospermo normales.

Los genotipos estudiados están adaptados para prosperar en el Altiplano Central de México (con altitudes de 2200 a 2600 msnm) y el cultivo de H70 predomina en esta región (Arellano *et al.*, 2011), por lo cual se eligió como testigo regional.

K (30). Auxiliary irrigation was applied 40, 90 and 120 d after planting (DAS).

Around physiological maturity of the crop (150 DAS), ten plants with complete competition per replication were selected at random. Ears were harvested and shelled manually; the kernels of the replications were mixed and two 100 g samples were taken to be used in the chemical determinations. The kernels, with 10 % moisture, were stored until analysis.

Genetic material

The genetic material was of the following types.

- 1) Six inbred lines of *opaque2* (*o2*) maize, with white grain and normal textured endosperm (M1 to M6), derived from crossing lines CML 244 (S4), CML 352 (S5), CML 242 (S4), CML 246 (S3), CML 349 (S5), and CML 354 (S3) with the CIMMYT line CML 176 [(P63-12-2-1/P67-5-1-1)-1-2-B-B], which was the donor of the *o2* gene. They were then backcrossed toward normal material and self-pollinated. Massive increases were then done to recombine and stabilize them (Table 1).
- 2) The 15 single direct crosses formed with the above lines (S1, S2 or S3 plants, depending on their self-pollinations after backcrossing, with F_1 embryos in the crop field).
- 3) The F_2 generation of the above crosses (F_2 plants with F_2 embryos, in the crop field). H70, a commercial hybrid with normal protein and endosperm, was included as the regional control.

The genotypes studied are adapted to prosper in the Central Highland Plateau of Mexico (with altitudes of 2200 to 2600 m), and H70 predominates in this region (Arellano *et al.*, 2011), the reason it was chosen as the regional control.

Determination of tryptophan, lysine and total protein contents and quality protein index

Chemical determinations were done during 2013 in the Molecular Biotechnology Laboratory of the Biotechnology Interdisciplinary Professional Unit of the Instituto Politécnico Nacional (UPIBI, IPN) in Mexico City. The lysine (Lys), tryptophan (Trp) and total protein (TP) contents and quality protein index (ICP) were quantified for each genotype (six lines, 15 F_1 crosses and their respective F_2), and the two replications of 100 grains mentioned above were used.

Cuadro 1. Líneas endogámicas de maíz con alta calidad de proteína utilizadas en el estudio (CEVAMEX, 2011).
Table 1. Quality protein maize lines used in the study (CEVAMEX, 2011).

Líneas	Genealogía	Niveles de endogamia
M1	[(CML244/CML176)/CML244/CML244/CML244]QPM-1-B-1-B	S2°
M2	[(CML352/CML176)/CML352/CML352/CML352]QPM-1-BTL-3-1TL-B-BTL-B-B-13-B	S3
M3	[CML242/CML176)/CML242/CML242/CML242]QPM-B*3-4-B	S1
M4	[(CML246/CML176)/CML246/CML246/CML246]QPM-B*3-3-B	S1
M5	[(CML349/CML176)/CML349/CML349/CML349]QPM-B*3-4-B	S1
M6	[(CML354/CML176)/CML354/CML354/CML354]QPM-B*3-11-B	S1
Testigo	H70	—

° = Autofecundaciones posteriores a las retrocruzas ♦ Self-pollinations after backcrosses.

Determinación de los contenidos de triptófano, lisina, proteína total e índice de calidad de proteína

Las determinaciones químicas se hicieron durante el 2013 en el Laboratorio de Biotecnología Molecular de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional (UPIBI, IPN), en la Ciudad de México. En cada genotipo (seis líneas, 15 cruces F₁ y sus respectivas F₂) se cuantificaron los contenidos de lisina (Lis), triptófano (Trp), proteína total (PT) e índice de calidad de proteína (ICP), y se utilizaron las dos repeticiones de 100 granos ya mencionadas.

Los granos se molieron y desgrasaron con hexano durante 6 h, de esta harina se tomaron 100 mg para realizar la determinación espectrofotométrica (Zuzi 4201/20) de los aminoácidos (Galicía *et al.* 2009). Para Lis el protocolo se basó en la reacción del 2-cloro, 3, 5-dinitropiridina (390 nm) y para Trp en la del ácido glicoxílico (560 nm).

La PT se calculó multiplicando el contenido de nitrógeno total, determinado según Galicía *et al.* (2009), por el factor 6.25 (Salinas y Vázquez, 2006). El ICP proteína (ICP) se calculó con la fórmula: $ICP = [\text{triptófano (\%)} \times 100] [\text{proteína (\%)}]^{-1}$ (Galicía *et al.*, 2009). Los resultados se expresaron como porcentaje en base seca en promedio de dos repeticiones.

Variación de la calidad de proteína entre las generaciones F₁ y F₂

Para estimar la estabilidad de las variables de la calidad de la proteína entre las generaciones F₁ y F₂, se calcularon las diferencias (%) de sus valores entre ambas generaciones: $F_1 - F_2 = (F_1 - F_2) / (F_1) \times 100$ (F₁)⁻¹; donde F₁ = valor de la cruce simple y F₂ = valor de la cruce segregante correspondiente, se multiplicó por (-1) para indicar la disminución de la variable (adaptado de Hernández-Leal *et al.*, 2013).

The grains were ground and defatted with hexane for 6 h. One hundred milligrams of this flour was used for spectrophotometric determination (Zuzi 4201/20) of the amino acids (Galicía *et al.* 2009). For Lys, the protocol was based on the reaction of 2-chloro, 3, 5-dinitropyridine (390 nm) and for Trp it was based on that of glyoxylic acid (560 nm).

Total protein was calculated by multiplying the content of total nitrogen, determined following Galicía *et al.* (2009), by the factor 6.25 (Salinas and Vázquez, 2006). The quality protein index (ICP) was calculated with the formula $ICP = [\text{tryptophan (\%)} \times 100] [\text{protein (\%)}]^{-1}$ (Galicía *et al.*, 2009). The results were expressed as percentages, dry weight base, and were averages of the two replications.

Variation in quality protein between generations F₁ and F₂

To estimate the stability of quality protein variables between generations F₁ and F₂, the differences (%) in the values between the two generations were calculated: $F_1 - F_2 = (F_1 - F_2) / (F_1) \times 100$ (F₁)⁻¹; where F₁ = value of the single cross and F₂ = value of the corresponding segregating cross multiplied by (-1) to indicate reduction of the variable (adapted from Hernández-Leal *et al.*, 2013).

Statistical analysis

With the data, an ANOVA was performed. Lysine, Trp and protein contents, and the ICP, between and within genotypes, were compared using the Tukey test ($p \leq 0.05$). To evaluate quality protein stability of each cross between their F₁ and F₂ generations (inbreeding depression), the t test for paired data was used ($p \leq 0.05$). All the statistical analyses were carried out with SAS software (SAS Institute, ver. 9.2).

Análisis estadístico

Con los datos se realizó un ANDEVA, los contenidos de Lis, Trp, contenido de proteína e ICP entre y dentro de genotipos, se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Para evaluar la estabilidad de la calidad de proteína de cada cruza entre sus generaciones F_1 y F_2 (depresión endogámica) se usó la prueba de t para datos apareados ($p \leq 0.05$). Todos los análisis estadísticos se efectuaron con SAS (SAS, Institute, ver. 9.2).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuantificaciones químicas

Hubo diferencias ($p \leq 0.01$) en Trp, Lis, PT, e ICP, para líneas y cruza F_1 y F_2 y testigo regional (H70) (Cuadro 2). Así, los genotipos expresaron una variación significativa en las características de la calidad de proteína cuantificadas, por lo cual se realizó la comparación estadística de las medias obtenidas en cada caso (Cuadro 3).

La diversidad en la expresión de las características evaluadas se puede deber a que la genealogía de las seis líneas parentales fue distinta aunque todas ellas compartieron la línea CML176 como donadora del gen *o2*. Es decir, las líneas conservaron su individualidad y nivel alto de endogamia, ya que sólo se incorporó el *o2* y después se retrocruzaron hacia su respectivo material no modificado o normal (Cuadro 1).

Las líneas (Cuadro 3) y las cruza F_1 (Cuadro 4) superaron significativamente al testigo regional (H70) en todas las mediciones de calidad de proteína evaluadas y principalmente en aminoácidos esenciales e ICP, caracteres químicos prioritarios para la calidad de proteína. Por lo tanto, se puede indicar que el potencial de los materiales fue amplio para generar híbridos de alta calidad de proteína.

RESULTS AND DISCUSSION

Chemical quantifications

Differences ($p \leq 0.01$) were found in Trp, Lys, and ICP for F_1 and F_2 lines and crosses and the regional control (H70) (Table 2). Thus, the genotypes expressed significant variation in the quantified characteristics of protein quality and, therefore, the means obtained in each case were compared (Table 3).

Diversity in expression of the evaluated characteristics may be because the genealogy of the six parent lines was different, although all of them shared line CML 176, the donor of the *o2* gene. That is, the lines conserved their individuality and high level of inbreeding since only the *o2* gene was incorporated and later backcrossed toward their respective unmodified, or normal, material (Table 1).

The lines (Table 3) and the F_1 crosses (Table 4) significantly surpassed the regional control (H70) in all of the measurements of protein quality evaluated, especially in essential amino acids and ICP, which are priority chemical traits for quality protein. Therefore, it may be pointed out that the evaluated materials showed large potential for producing hybrids with high protein quality.

Lines M2 and M3 had the highest contents ($p \leq 0.05$) of Trp and PT and the highest ICP, followed by line M6, while M1, M4 and M5 had the lowest performance (Table 3). That is, there was genetic variation among the lines for Trp, PT and ICP, but not for LIS since the content of this amino acid did not vary among lines nor between F_1 and F_2 crosses. It was thus the experimental variable with the best response in all the study.

Cuadro 2. Cuadrados medios y significancia estadística de los caracteres químicos evaluados en las líneas endogámicas de maíz, cruza F_1 y F_2 y testigo regional.

Table 2. Mean squares and statistical significance of the chemical traits evaluated in maize inbred lines, F_1 and F_2 crosses, and regional control.

Fuente de variación	Grados de libertad	Tryptófano		Lisina		Proteína		Índice de calidad de proteína	
Tratamientos	36	0.0011	**	0.0108	**	2.923	**	0.039	**
Error	37	0.0001		0.004		0.09		0.001	
CV (%)		6.51		16.44		2.35		6.75	

** $p \leq 0.01$; CV=Coeficiente de variación ♦ $p \leq 0.01$; CV=Coefficient of variation.

Cuadro 3. Promedios (% en base seca) del contenido de triptófano, lisina, proteína e índice de calidad proteica en las líneas endogámicas de maíz.

Table 3. Averages (% dry base) of tryptophan, lysine and protein contents, and quality protein index in maize inbred lines.

Genotipo	Triptófano	Lisina	Proteína	Índice de calidad de proteína
Líneas				
M1	0.075 c	0.290 a	13.15 b	0.57 b
M2	0.125 a	0.495 a	14.50 a	0.85 a
M3	0.120 a	0.470 a	13.90 a	0.86 a
M4	0.080 b	0.305 a	12.80 b	0.59 a
M5	0.075 c	0.415 a	12.55 b	0.62 b
M6	0.100 b	0.435 a	12.45 b	0.83 a
Testigo regional				
H-70	0.040 d	0.180 b	10.15 c	0.40 c
DSH	0.02	0.25	1.25	0.16

Medias con letra diferente en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey; $p \leq 0.05$) ♦ Means with different letters in a column are statistically different (Tukey; $p \leq 0.05$).

Las líneas M2 y M3 tuvieron los contenidos más altos ($p \leq 0.05$) de Trp, PT e ICP, seguidas de M6, y M1, M4 y M5 que mostraron el desempeño menor

The F₁ crosses with the highest, most consistent values over measurements were obtained by crossing the lines situated in the first two significant levels

Cuadro 4. Promedios (% en base seca) del contenido de triptófano, lisina, proteína e índice de calidad proteica en las generaciones F₁ y F₂ de las cruza de maíz.

Table 4. Averages (% dry base) of tryptophan, lysine and protein contents, and quality protein index in F₁ and F₂ generations of maize crosses.

Genotipo	Triptófano		Lisina		Proteína		Índice calidad de proteína	
	F1	F2	F1	F2	F1	F2	F1	F2
M1 x M2	0.065 b	0.061 a	0.280 a	0.403 a	13.75 a	12.09 b	0.47 b	0.50 a
M1 x M3	0.070 b	0.050 b	0.265 a	0.378 a	13.65 a	11.28 b	0.52 b	0.44 a
M1 x M4	0.075 b	0.049 b	0.310 a	0.351 a	13.5 b	11.55 b	0.56 b	0.42 a
M1 x M5	0.060 c	0.058 a	0.275 a	0.328 a	12.30 b	11.58 b	0.51 b	0.50 a
M1 x M6	0.070 b	0.062 a	0.310 a	0.421 a	12.55 b	12.04 b	0.53 b	0.51 a
M2 x M3	0.070 b	0.059 a	0.315 a	0.374 a	14.80 a	12.47 b	0.47 b	0.47 a
M2 x M4	0.125 a	0.051 b	0.475 a	0.358 a	13.80 a	13.16 a	0.89 a	0.39 a
M2 x M5	0.085 b	0.059 a	0.345 a	0.450 a	14.15 a	18.88 a	0.60 b	0.54 a
M2 x M6	0.115 a	0.050 b	0.495 a	0.346 a	14.20 a	10.29 c	0.81 a	0.49 a
M3 x M4	0.075 b	0.074 a	0.310 a	0.451 a	13.05 b	13.33 a	0.57 b	0.55 a
M3 x M5	0.080 b	0.055 a	0.340 a	0.399 a	13.5 b	13.37 a	0.62 b	0.41 a
M3 x M6	0.110 a	0.050 b	0.435 a	0.337 a	14.50 a	12.00 b	0.75 a	0.42 a
M4 x M5	0.075 b	0.043 b	0.290 a	0.321 a	12.90 b	10.69 c	0.58 b	0.40 a
M4 x M6	0.065 b	0.047 b	0.345 a	0.301 a	13.15 b	12.04 b	0.51 b	0.39 a
M5 x M6	0.080 b	0.055 a	0.360 a	0.455 a	12.65 a	10.82 c	0.63 b	0.50 a
H70	0.04 c	—	0.18 b	—	10.15 c	—	0.4 c	—
DSH	0.02	—	0.25	—	1.25	—	0.16	—

Medias con letra diferente en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey; $p \leq 0.05$) ♦ Means with different letters in a column are statistically different (Tukey; $p \leq 0.05$).

(Cuadro 3). Es decir, hubo variación genética entre líneas para Trp, PT e ICP pero no para Lis, porque el contenido de este aminoácido no varió entre líneas ni entre cruza F_1 y F_2 , por lo cual fue la variable con mejor respuesta en todo del estudio.

Las F_1 con los valores más altos y consistentes en las mediciones efectuadas se obtuvieron con los cruzamientos de las líneas situadas en los dos primeros niveles significativos (M2, M3, M4 y M6) (Cuadro 3), pero los cruzamientos entre líneas menos prominentes generaron híbridos con menores atributos de calidad de proteína. En ambos casos, con la hibridación se conservó la calidad proteica intrínseca de las líneas.

Las cruza M2 x M5 y M5 x M6 tuvieron un comportamiento intermedio pero consistente en las generaciones F_1 y F_2 (Cuadro 4), por lo cual fueron una opción genotécnica para formar MCP, es decir, híbridos con menores atributos de calidad proteica pero estables en la F_2 . La anterior es la generación de alimenta y en la cual se busca expresar los beneficios del maíz con alta calidad de proteína. Las líneas descritas como superiores (M2, M3 y M6) fueron progenitoras de siete cruza sobresalientes para PT ($p \leq 0.05$), de las cuales solo tres destacaron también en Trp, Lis e ICP. Por lo tanto las cruza consistentemente superiores en todas las variables fueron M2 x M4, M2 x M6 y M3 x M6 (Cuadro 4).

Los cruzamientos mencionados como más favorables para PT que para factores preponderantes de la alta calidad de proteína, como los aminoácidos esenciales y el ICP, no sugiere que las proteínas de los materiales experimentales tuvieran un buen balance de aminoácidos. Este argumento coincide con la ausencia de correlación entre contenido de proteína y reportada por Gutiérrez *et al.* (2014).

Variación de la calidad de proteína entre las generaciones F_1 y F_2

El examen de la calidad de proteína de las cruza al pasar de su generación F_1 (de polinización controlada) a la F_2 (de polinización aleatoria), mostró que la depresión endogámica fue no significativa en 70 % de los casos (Cuadro 5). Esto indicó que, pese a la recombinación aleatoria, la mayoría de las cruza mantuvo en las generaciones F_1 y F_2 contenidos semejantes de las variables estudiadas, principalmente de Lis e ICP, seguidas de Trp y al final PT (Cuadro 5).

(M2, M3, M4 and M6) (Table 3), but the crosses between less prominent lines generated hybrids with fewer quality protein attributes. In both cases, with hybridization, the intrinsic protein quality of the lines was conserved.

The crosses M2 x M5 and M5 x M6 had intermediate, but consistent, performance in generations F_1 and F_2 (Table 4). For this reason, they are a breeding option for formation of QPM, that is, hybrids with fewer, but more stable, quality protein attributes in F_2 , which is the generation used for food and that in which expression of the beneficial maize quality protein is sought. The lines described above as superior (M2, M3 and M6) were parents of seven outstanding crosses for PT ($p \leq 0.05$), of which only three stood out also in Trp, Lys and ICP. Thus, the crosses consistently superior in all of the variables of the study were M2 x M4, M2 x M6 and M3 x M6 (Table 4).

The crosses mentioned as more favorable for PT than for preponderant factors of high quality protein, such as the essential amino acids and ICP, does not suggest that the proteins of the experimental materials had a good balance of amino acids. This argument coincides with the absence of correlation between protein content and quality protein index, which was reported by Gutiérrez *et al.* (2014).

Variation in protein quality between generations F_1 and F_2

Examination of quality protein of the crosses passing from generation F_1 (controlled pollination) to F_2 (random pollination) showed that inbreeding depression was not significant in 70 % of the cases (Table 5). This indicated that, despite random recombination, most of the crosses, in generations F_1 and F_2 , maintained similar contents of the studied variables, mainly Lys and ICP, followed by Trp and finally PT (Table 5). Thus, PT was the chemical component that the crosses maintained with greatest difficulty in the food grain generation (F_2).

The stability of the crosses between the F_1 and F_2 generations could also be explained by the high level of inbreeding of the parent lines with respect to $\alpha 2$ (as mentioned above), so that recombination of F_2 occurred among alleles of the same gene and, consequently, in most of the crosses there was no inbreeding depression in the variables that are

Cuadro 5. Depresión endogámica (%) de los caracteres químicos evaluados entre las generaciones F₁ y F₂.
Table 5. Inbreeding depression (%) of the chemical traits evaluated between the F₁ and F₂ generations.

Genotipo	Triptófano	Lisina	Índice de calidad de proteína	
	F ₁ – F ₂	F ₁ – F ₂	F ₁ – F ₂	F ₁ – F ₂
M ₁ x M ₂	-5.7 ns ^o	47.0 ns	-12.1 **	7.2 ns
M ₁ x M ₃	-29.6 ns	49.3 ns	-17.5 *	-14.8 ns
M ₁ x M ₄	-35.2 *	15.0 ns	-14.1 *	-24.6 ns
M ₁ x M ₅	-8.1 ns	21.3 ns	-5.8 **	-2.4 ns
M ₁ x M ₆	-7.1 ns	36.0 ns	-4.2 ns	-3.1 ns
M ₂ x M ₃	-16.4 ns	19.9 ns	-15.8 *	-0.8 ns
M ₂ x M ₄	-58.3 *	-23.8 ns	-4.9 ns	-56.2 **
M ₂ x M ₅	-31.0 ns	32.1 ns	-22.9 **	-10.5 ns
M ₂ x M ₆	-56.4 *	-27.5 ns	-27.5 **	-39.9 *
M ₃ x M ₄	-0.7 ns	45.9 ns	2.0 ns	-2.5 ns
M ₃ x M ₅	-34.5 *	23.9 ns	-1.0 ns	-33.9 **
M ₃ x M ₆	-54.0 *	-19.6 ns	-17.4 **	-44.3 ns
M ₄ x M ₅	-42.0 ns	13.3 ns	-17.0 *	-30.0 ns
M ₄ x M ₆	-30.7 ns	-12.9 ns	-8.7 *	-24.2 ns
M ₅ x M ₆	-30.8 ns	29.2 ns	-14.3 ns	-18.8 ns

^o=Prueba de datos apareados de Student. En columnas: *p≤0.05; *p≤0.01; ns=No significativo ♦ °=Student test of paired data. In columns: *p≤0.05; **p≤0.01; ns=Not significant.

Así, PT fue el componente químico con mayor dificultad para que las cruzas lo conservaran en la generación de consumo de grano (F₂).

La estabilidad descrita de las cruzas entre las generaciones F₁ y F₂ también podría explicarse por el alto nivel de endogamia de las líneas parentales con respecto al *o2* (como ya se adujo), de manera que la recombinación de la F₂ ocurrió entre alelos del mismo gen y, en consecuencia, en la mayoría de las cruzas no hubo depresión endogámica en las variables que están determinadas por el *o2*, que son Lis, Trp e ICP, aunque este último de manera indirecta, puesto que es la proporción de la cantidad de TRP presente en la proteína del grano.

Otro aspecto destacado de la Lis es que sus diferencias F₁ – F₂ fueron positivas en 73 % de las cruzas (Cuadro 5). Esto significa que su contenido aumentó en la generación F₂, así que no denotó depresión endogámica, la cual sí se presentó en Trp, PT e ICP.

Los aumentos de Lis en la F₂ se atribuirían a que la recombinación ocurrió entre líneas homocigóticas para el *o2*, con contenidos altos del aminoácido, con

determined by the *o2* gene, which are Lys, Trp and ICP. For ICP, determination is indirect since it is the proportion of the quantity of Trp present in the grain proteins.

Another outstanding aspect of Lys is that its F₁ – F₂ differences were positive in 73 % of the crosses (Table 5), meaning that its content increased in the F₂ generation and thus there was no inbreeding depression, which did occur with Trp, PT and ICP.

The increases in Lys in F₂ would be attributable to the recombination between homozygous lines for *o2*, with high amino acid content, with which the F₂ crosses were obtained. They were also outstanding in the same variable and random pollination favored their Lys accumulation.

The crosses M₂ x M₄, M₂ x M₆ and M₃ x M₆ mentioned above as outstanding for their high significant levels of Trp, Lys, TP and ICP had reduced responses because of inbreeding depression. The exception was M₃ x M₆ which maintained its ICP with no changes in F₂. This cross was the best of the study because it showed high significant values in

las cuales se obtuvieron cruza F_1 . Éstas también fueron sobresalientes en la misma variable y la polinización aleatoria favoreció la acumulación de Lis.

Las cruza $M2 \times M4$, $M2 \times M6$ y $M3 \times M6$, mencionadas ya como sobresalientes por sus valores elevados y significativos de Trp, Lis, PT e ICP, redujeron sus respuestas por la depresión endogámica, excepto $M3 \times M6$ que conservó sin cambios su ICP en la F_2 . Esta cruza fue la mejor del estudio porque mostró valores altos y significativos de calidad de proteína en F_1 y no mostró depresión endogámica significativa.

Las cruza $M2 \times M5$ y $M5 \times M6$, con respuesta intermedia, tuvieron una alta estabilidad en la F_2 , porque no mostraron depresión endogámica ($p \leq 0.05$) en aspectos primordiales de la calidad de proteína (aminoácidos esenciales e ICP). Por tanto, también fueron híbridos valiosos.

Algunas cruza mantuvieron el nivel de calidad de sus líneas y otras no, lo cual podría derivar de su constitución genética, puesto que la expresión del $\alpha 2$ está regulada por el genotipo de la línea endogámica en la cual se introduce (Gutiérrez-Rojas *et al.*, 2008). Además hay genes modificadores del desarrollo del endospermo (Holding *et al.*, 2008), los cuales deben variar con el genotipo.

Entonces, hubo respuestas genotípicas diferentes para la depresión endogámica, las cruza con calidad de proteína superior fueron más susceptibles que combinaciones alélicas con menores atributos de calidad, y la recombinación genética aleatoria tuvo una repercusión favorable en la variable Lis y mermó el contenido de aminoácidos y el ICP.

La obtención de híbridos de maíz $\alpha 2$ es un proceso complejo pero viable, en el cual es deseable evaluar y caracterizar el germoplasma experimental con base en la cuantía de aminoácidos esenciales, sobre todo del ICP y la estabilidad de la manifestación de las bondades del $\alpha 2$ en la generación F_2 , y se debe definir el ambiente y el nivel tecnológico de producción al cual están destinados. Además es posible integrar los elementos anteriores mediante modelos matemáticos que contribuyan al conocimiento del proceso.

CONCLUSIONES

Las líneas $M2$ y $M3$ y las cruza $M2 \times M4$, $M2 \times M6$ y $M3 \times M6$ presentaron los contenidos más

quality protein in F_1 and did not exhibit significant inbreeding depression.

The crosses $M2 \times M5$ and $M5 \times M6$, with intermediate response, were highly stable in F_2 . They did not exhibit inbreeding depression ($p \leq 0.05$) in primordial aspects of quality protein (essential amino acids and ICP). For this reason, they are also valuable hybrids.

Some crosses maintained the level of quality of their lines and others did not, possibly because of their genetic constitution since expression of $\alpha 2$ is regulated by the genotype of the inbred line into which it was introduced (Gutiérrez-Rojas *et al.*, 2008). Moreover, there are genes that modify development of the endosperm (Holding *et al.*, 2008) and should vary with genotype.

Thus, there were different genotypic responses for inbreeding depression. Crosses with superior quality protein were more susceptible than allele combinations with lower quality attributes. Random genetic recombination had a favorable repercussion on the Lys variable and diminished amino acid content and ICP.

Obtaining $\alpha 2$ hybrids is a complex, but viable, process for which it is desirable to evaluate and characterize experimental germplasm based on the amount of essential amino acids and especially on ICP and stability of the manifestation of the virtues of $\alpha 2$ into generation F_2 . In addition, the environment and the production technology level it requires should be defined. It is also possible to integrate the above elements using mathematical models that contribute to knowledge of the process.

CONCLUSIONS

Lines $M2$ and $M3$ and the crosses $M2 \times M4$, $M2 \times M6$ and $M3 \times M6$ had the highest contents of lysine, tryptophan, and total protein, as well as the highest quality protein index. The quality of the protein of these crosses was not stable in F_2 , with the exception of $M3 \times M6$, which was the most consistent and stable cross.

Inbreeding depression did not affect crosses of intermediate quality protein or the lysine content, which was the experimental variable with the best response in all of the breeding stages.

altos de lisina, triptófano, proteína total e índice de calidad de proteína. La calidad de proteína de dichas cruza no fue estable en la F₂, excepto M3xM6, por lo cual fue la cruza más consistente y estable.

La depresión endogámica no incidió sobre las cruza con calidad intermedia de proteína ni en el contenido de lisina, que fue la variable experimental con mejor respuesta en todas las etapas genotécnicas.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestra gratitud a las Instituciones participantes en el Grupo Interdisciplinario de Investigación en Maíz (GIIM): INIFAP, CIMMYT, UNAM e IPN.

LITERATURA CITADA

Arellano V., J. L., J. Virgen V., M. Á. Ávila P., e I. Rojas M. 2011. H-70 Híbrido de maíz de alto rendimiento para áreas de temporal y riego del altiplano central de México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Campo Experimental Valle de México (CEVAMEX). México, D.F. Ficha Téc. 13. 34 p.

Bjarnason, M., S. and K. Vasal. 1992. Breeding of quality protein maize (QPM). In: Jules. J. (ed). Plant Breeding Reviews Vol. 9. Purdue University. John Wiley and Sons. pp: 181–210.

Fernández S., R., L. A. Morales C., y A. Gálvez M. 2013. Importancia de los maíces nativos de México en la dieta nacional. Una revisión indispensable. Rev. Fitotec. Mex. 36 Supl. 3-A: 275–283.

Galicia, L., E. Nurit, A. Rosales, and N. Palacios R. 2009. Laboratory protocols: Maize nutrition quality and plant tissue analysis laboratory. CIMMYT. El Batán, Texcoco, México. 42 p.

Gerdes, S., C. Lerma-Ortiz, O. Frelín, S. M. D. Seaver, C. S. Henry, V. de Crecy-Lagard, and A. D. Hanson. 2012. Plant B vitamin pathways and their compartmentation: A guide for the perplexed. J. Exp. Bot. 63: 5379–5395.

Gutiérrez H., G. F., J. L. Arellano V., J. M. Vázquez R., E. García R., P. Vázquez L., y E. Flores G. 2014. Formación de híbridos de maíz con calidad proteica: lisina, triptófano e índice de calidad. Rev. Fac. Agron. 31: 171–189.

Gutiérrez-Rojas A., M. Paul-Scott, O. R. Leyva, M. Menz, and J. Beltrán. 2008. Phenotypic characterization of quality protein maize endosperm modification and amino acid contents in a segregating recombinant inbred population. Crop Sci. 48:1714–1722.

Hernández-Leal, E., R. Lobato-Ortiz, J. J. García-Zavala, D. Reyes-López, A. Méndez-López, O. Bonilla-Barrientos, y A. Hernández-Bautista. 2013. Comportamiento agronómico de poblaciones F₂ de híbridos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Rev. Fitotec. Mex. 36: 209–215.

Holding D. R., B. G. Hunter, T. Chung, B. C. Gibbon, C. F. Ford, A. K. Bharti, J. Messing, B. R. Hamaker, and B. A. Larkins. 2008. Genetic analysis of opaque-2 modifier loci in quality protein maize. Theor. Appl. Genet. 117: 157–170.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to express our gratitude to the participating institutions of the Interdisciplinary Maize Research Group (GIIM): INIFAP, CIMMYT, UNAM and IPN.

—End of the English version—



Krivaneck A. F., H. De Groote, N. S. Gunaratna, A. O. Diallo, and D. Friesen. 2007. Breeding and disseminating quality protein maize (QPM) for Africa. Afr. J. Biotechnol.: 6: 312–324.

Landry J., and S. Delhay 2007. Influence of genotype and texture on zein content in endosperm of maize grains. Ann. Appl. Biol. 151: 349–356.

Manicacci, D., L. Camus-Kulandaivelu, M. Fourmann, Ch. Arar, S. Barrault, A. Rousselet, N. Feminias, L. Consoli, L. Francès, V. Méchin, A. Murigneux, J. L. Prioul, A. Charcosset, and C. Darneval. 2009. Epistatic interactions between *O2* transcriptional activator and its target gene *CyPzPDK1* control kernel trait variation in maize. Plant Physiol. 150: 506–520.

Mendoza-E., M., E. Andrio-E., J. M. Juárez-G., C. Mosqueda-V., L. Latournerie-M., G. Castañón-N., A. López-B., y E. Moreno-M. 2006. Contenido de lisina y triptófano en genotipos de maíz de alta calidad proteica y normal. Universidad y Ciencia 22: 153–161.

Mertz E. T., L. S. Bates, and O. E. Nelson. 1964. Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. Science 145: 279–280.

Morris M. L., y M. A. López P. 2000. Impactos del mejoramiento de maíz en América Latina 1996 – 1997. CIMMYT. El Batán, Texcoco, México. 45 p.

Nuss, E. T., and S. A. Tanumihardjo. 2011. Quality protein for Africa: Closing the protein inadequacy gap in vulnerable populations. Am. Soc. Nutr. 2: 217–224.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Div. Estadísticas (FAOSTAT). 2014. <http://faostat3.fao.org> (Consulta: abril 2016).

Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico y Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (OCDE/FAO). 2011. Perspectivas Agrícolas 2011–2020. OECD Publishing/FAO. 227 p.

Salinas M., Y., y G. Vázquez C. 2006. Metodologías de análisis de la calidad nixtamalera-tortillera en maíz. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Campo Experimental Valle de México (CEVAMEX). México D. F. Ficha Téc. 23. 91 p.

Serna S., S. O., C. A. Amaya G., P. Herrera M., J. L. Melesio C., R. E. Preciado O., A. D. Terrón I., and G. Vázquez C. 2008. Evaluation of the time-cooking and tortilla making properties of quality protein maize hybrids grown in Mexico. P. Food Human Nutr. 63: 119–125.

- Statistical Analysis System (SAS). 2002. SAS/STAT Ver. 9. SAS Inst. Inc. Cary NC, USA.
- Vázquez C., G. M., H. Mejía A., C. Tout C., y N. Gómez M. 2012. Características de granos y tortillas de maíces de alta calidad proteínica desarrollados para los valles altos centrales de México. *Rev. Fitotec. Mex.* 35: 23-31.