



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GENÉTICA

**ESTUDIOS GENÉTICOS SOBRE LA ESTABILIDAD DE LA
PROVITAMINA-A EN MAÍZ BIOFORTIFICADO: ANÁLISIS
GENÉTICO DE LA ENZIMA CCD1 EN SEMILLA E INFLUENCIA
DE SEQUÍA Y BAJO NITRÓGENO EN EL CULTIVO**

YADHIRA DEL CARMEN ORTIZ COVARRUBIAS

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2018



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Posgraduados, el que suscribe Yadhira del Carmen Ortiz Covarrubias alumna de esta institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realice en esta institución, bajo la dirección del profesor Víctor Heber Aguilar, por lo que otorga los derechos de autor de mi tesis: Estudios genéticos sobre la estabilidad de la provitamina-A en maíz biofortificado, análisis genético de la enzima CCD1 en semilla e influencia de sequía y bajo nitrógeno en el cultivo; y de los productos de dicha investigación al Colegio de Posgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del colegio de posgraduados y la regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la institución, el consejero o director de tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta institución.

Montecillo, municipio de Texcoco, Estado de México, 06 de diciembre del 2018.

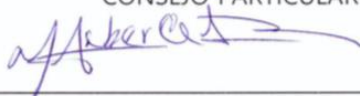
Yadhira del Carmen Ortiz Covarrubias

Consejero Víctor Heber Aguilar Rincón

La presente tesis titulada "ESTUDIOS GENÉTICOS SOBRE LA ESTABILIDAD DE PROVITAMINA-A EN MAIZ BIOFORTIFICADO: ANÁLISIS GENÉTICO DE CCD1 EN SEMILLA E INFLUENCIA DE SEQUÍA Y BAJO NITRÓGENO EN EL CULTIVO" realizada por la alumna YADHIRA DEL CARMEN ORTIZ COVARRUBIAS, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GENÉTICA
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. VÍCTOR HEBER AGUILAR RINCÓN

ASESORA




Dra. NATALIA PALACIOS ROJAS

ASESORA



Dra. Ma. DEL CARMEN MENDOZA CASTILLO

ASESOR



Dr. THANDA DHLIWAYO

ASESOR



Dr. GUILLERMO CARRILLO CASTAÑEDA

ASESOR



Dr. IGNACIO BENÍTEZ RIQUELME

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Noviembre de 2018

ESTUDIOS GENÉTICOS SOBRE LA ESTABILIDAD DE LA PROVITAMINA-A EN MAÍZ BIOFORTIFICADO: ANÁLISIS GENÉTICO DE LA ENZIMA CCD1 EN SEMILLA E INFLUENCIA DE SEQUÍA Y BAJO NITRÓGENO EN EL CULTIVO

Yadhira del Carmen Ortiz Covarrubias, Dra.
Colegio de Postgraduados, 2018
RESUMEN

La estabilidad de carotenos PVA de los granos de maíz biofortificados no está plenamente demostrada. Factores enzimáticos y medioambientales influyen en la estabilidad de PVA. El objetivo de este estudio fue elucidar aún más los mecanismos de degradación de los carotenoides con el fin de generar alternativas de mejoramiento genético que contribuyan a una acumulación estable de carotenos PVA en los maíces biofortificados. Para ello se cuantificó el número de copias del gen de CCD1 en el genoma y sus transcritos en granos maduros de maíz y se buscaron polimorfismos en las secuencias de los genes de CCD1 y CCD4 que estuvieran asociados con la estabilidad de carotenos PVA. Adicionalmente, se midieron características físicas y químicas del grano entero y desgerminado para observar la influencia de estos compuestos sobre la estabilidad de carotenoides. Y se evaluaron los efectos de la sequía y el bajo nitrógeno del suelo sobre el contenido de carotenos PVA en un 55 de híbridos de maíz.

Los resultados mostraron variabilidad en la cantidades relativas de ARNm de CCD1 entre los genotipos. Además, las líneas con mayor cuantificación relativa del ARNm de CCD1 presente en la semilla, presentaron la mayor degradación de β -criptoxantina y β -caroteno. Hubo correlación baja pero significativa del valor k de degradación y concentración de β -criptoxantina con el número de copias relativas del gen CCD1 en el genoma de las 42 líneas de maíz analizadas. Asociaciones altamente significativas con valores log que sobrepasan el umbral se observaron entre el valor k de β -caroteno y SNPs de CCD4. Los valores k de β -caroteno de estas líneas fueron los más altos y forman parte del grupo de genotipos derivados de líneas con alelos mutantes para *LcyE* y/o *CrtRB1*.

Se observó que las tasas de degradación de los carotenoides fueron más bajas en grano entero en comparación con grano degerminado. Las mayores concentraciones de

β -caroteno se encontraron en el endospermo harinoso ($r^2 = 0.75$, $p < 0.05$) y la mayor concentración inicial de β -caroteno, condujo a la mayor tasa k de degradación. Esta diferenciación en la deposición del β -caroteno puede jugar un papel importante en su estabilidad, haciéndola mas susceptible al medio ambiente.

La heredabilidad, la acción génica y la aptitud combinatoria de los carotenoides PVA no se vieron afectadas por el bajo nivel de N_2 o el estrés por sequía.

Con estos resultados podemos concluir que parte de la degradación de los carotenos en el grano de maíz se explica por el polimorfismo en genes que codifican enzimas como la CCD1 y CCD4. Sin embargo, la diferenciación en el almacenamiento de los carotenos PVA en el grano de maíz también puede jugar un papel importante en su estabilidad. La concentración de PVA en el grano fue inferior en los tratamientos de estrés. Sin embargo, la alta heredabilidad de carotenos PVA y germoplasma superior a $20 \mu\text{g g}^{-1}$ de PVA, pueden permitir el desarrollo de nuevas variedades y hacer que las pérdidas por estrés sean intrascendentes.

Palabras clave: Maíz, provitamina A, CCD1, CCD4, estabilidad.

GENETIC STUDIES ON THE STABILITY OF PROVITAMIN-A IN BIOFORTIFIED MAIZE: GENETIC ANALYSIS OF CCD1 ENZYME IN SEED AND DROUGHT AND LOW NITROGEN EFFECT IN CROP

Yadhira del Carmen Ortiz Covarrubias, Dra.
Colegio de Postgraduados, 2018

ABSTRACT

Stability of carotenes PVA in biofortified maize grains is not fully established. Enzymatic and environmental factors influence stability of PVA. The aim of this study was to further elucidate mechanisms of degradation of carotenoids in order to generate alternatives for genetic improvement that contribute to a stable accumulation of PVA carotenes in biofortified maize. For this, copy number of CCD1 gene in the genome and its transcripts in mature grains were quantified and calling variant were in the sequences of the CCD1 and CCD4 genes that were associated with the stability of carotene PVA. Additionally, physical and chemical characteristics of the whole and degerminated kernel were measured to observe the influence of these compounds on the stability of carotenoids. Both effects, drought and low soil nitrogen on the PVA carotene content in 55 maize hybrids were assessed.

Results showed variability in relative amounts of CCD1 mRNA among the genotypes. In addition, the lines with higher relative quantification of CCD1 mRNA present in the grain, tend to further degradation of β -cryptoxanthin and β -carotene. There was a low but significant correlation of the k-value of degradation of β -cryptoxanthin and the content of β -cryptoxanthin with relative copy number of CCD1 in the genome of the 42 maize lines analyzed. Highly significant associations with log values exceeding the threshold were observed between the k-value of β -carotene and SNPs of CCD4. The k-values of β -carotene in these lines were the highest and are part of the group of genotypes derived from lines with mutant alleles for *LcyE* and *CrtRB1*.

It was observed that carotenoid degradation rates were lower in whole kernel compared to degermed kernel. The highest concentrations of β -carotene were found in the floury endosperm ($R^2 = 0.75$, $p < 0.05$) and the highest initial concentration of β -carotene, led to the highest rate of degradation. This differentiation in the deposition of β -carotene can play an important role in its stability, making it more susceptible to

environment. Heritability, gene action and combinatorial aptitude of the PVA carotenoids were not affected by low level of N₂ or drought stress.

With these results we can conclude that part of the degradation of carotenes in corn grain is explained by the polymorphism in genes that encode enzymes such as CCD1 and CCD4. However, differentiation in the storage of carotenes PVA in maize kernel can also play an important role in its stability. PVA content in grain was lower in the stress treatments. However, high heritability of PVA carotenes and germplasm higher than 20 µg g⁻¹ of PVA allows development of new varieties and make stress losses negligible.

Key words: Maize, Provitamin A, CCD1, CCD4, stability

AGRADECIMIENTOS

Inicialmente, quiero agradecer a mi asesora Natalia Palacios Rojas por permitirme realizar esta investigación bajo su supervisión; por las enseñanzas, por la paciencia y su amplia disposición mostrada a lo largo de mis estudios de doctorado. A mi consejero el Dr. Víctor Heber Aguilar Rincón por siempre estar al pendiente del desarrollo y avances de los experimentos y en general de la tesis.

Al mismo tiempo, quisiera agradecer a todo el consejo particular por el apoyo brindado. Sin algún orden en particular, Dra. Ma. del Carmen Mendoza Castillo, Dr. Thanda Dhliwayo, Dr. Ignacio Benítez Riquelme, Dr. Guillermo Carrillo Castañeda por las ideas, sugerencias y comentarios en las reuniones de consejo, que siempre fueron de ayuda para aterrizar y terminar de darle forma al trabajo de investigación realizado. Adicionalmente, por la revisión de esta tesis.

A la Dra. Martha Hernández y al estudiante de intercambio Jonathan Poole, por la realización del experimento de la cuantificación del número de copias del gen CCD1 en el genoma. Quisiera extender el agradecimiento a la Dra. Martha Hernández por sus consejos y apoyo en el laboratorio en general; por las clases particulares de Biología Molecular. Además de las buenas platicas, consejos atinados y por su amistad.

A todo el personal del laboratorio de Calidad Nutricional de Maíz “Evangelina Villegas” del CIMMYT. Bertha Pérez, María Luisa Cabrera, Dionicio Zavala, Alejandra Miranda, Miguel Bojorges, Aldo Rosales, Aide Molina, que de alguna manera participaron activamente con los experimentos realizados en esta tesis. Al personal de mejoramiento de maíces subtropicales. A Andrea Susana y Don Rubén, que en todo momento estuvieron apoyando para la obtención de la semilla obtenida para los experimentos efectuados en la tesis.

Al Colegio de Postgraduados PREGEP- Genética. Al personal administrativo de Genética, en especial a la Sra. Dalila (q.e.p.d.), Eva y Patricia Campos. A Liliana Santamaría, asistente del Programa Global de Maíz del CIMMYT. Gracias por el apoyo brindado en los trámites de cada cuatrimestre.

Quiero agradecer a mis profesores de Genética, en especial al Dr. Guillermo Carrillo Castañeda, Dr. Amalio Santacruz Varela, Dr. Ignacio Benítez Riquelme, por el ímpetu y

amor a la genética y a la investigación en general. Por esa inspiración transmitida en el aula para ver lo hermoso de la ciencia.

El profundo agradecimiento a mis papás por apoyarme incondicionalmente; por guiarme a lo largo del camino de la vida. A mi Sebastián por ser mi guía espiritual indirecto, por darle propósito a mi vida y hacerla más divertida. A mis hermanos Gama y Karla.

A mis amistades nuevas y a las de siempre. Sin algún orden en particular Juan de Dios Hernández Quintero, Carmen Méndez, Giulia López, Regina Durón, Marisol Cruz, Consuelo López, Enrique Canales, Raúl Rodríguez. Yingsi Zhou, Zoran Camdzija, Meriam Nefzaoui, Pedro Barbosa y Paula Vieira. Por todos los buenos ratos, pláticas y consejos, por compartir sus conocimientos. Gracias por siempre acompañarme; por el apoyo moral y la fortaleza que me brindaron en los momentos de dificultad y debilidad.

Esta tesis fue realizada con el apoyo de CIMMYT, el proyecto *Harvest Plus*. Agradezco a CONACYT y al pueblo de México por la beca brindada para realizar mis estudios de postgrado.

A SEBASTIÁN

CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT	vi
AGRADECIMIENTOS	viii
LISTA DE CUADROS	xv
LISTA DE FIGURAS	xviii
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
Genética de los carotenoides y su ruta de síntesis.	3
Funciones y efecto de la deficiencia de carotenoides en la salud humana.	5
Mejoramiento genético de Provitamina-A en maíz.	6
Estabilidad de Carotenos Provitamina-A del grano de maíz pre y post-cosecha.	7
DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA TESIS	9
MATERIAL VEGETAL	11
LITERATURA CITADA	13
CAPÍTULO 1. RELACIÓN GENÉTICA DE LA ENZIMA DIOXIGENASA QUE ESCINDE CAROTENOS Y LA ESTABILIDAD DE CAROTENOS PROVITAMINA- A EN MAÍZ	16
1.1 RESUMEN	16
1.2 INTRODUCCIÓN	17
1.3 MATERIALES Y METÓDOS	19
1.3.1 Determinación de la pérdida de carotenoides durante el almacenamiento.	20
1.3.1.1 Experimento de degradación.	20
1.3.1.2 Extracción de carotenoides y cuantificación por UPLC.....	20
1.3.1.3 Cálculos para la concentración de carotenoides.....	21
1.3.1.4 Tasa de degradación de carotenoides.	22
1.3.2 Expresión relativa del gen CCD1 en granos de maíz maduros.	22
1.3.2.1 Extracción de ARN.....	22
1.3.2.2 Cuantificación y calidad de ARN total.	23
1.3.2.3 Síntesis del ADN complementario (ADNc).....	24

1.3.2.4 Cuantificación de transcritos de CCD1.	24
1.3.3 Cuantificación del número de copias del gen CCD1 en el genoma.	25
1.3.4 Secuenciación de los genes de CCD1 y CCD4.	26
1.3.4.1 Extracción ADN y re-secuenciación.	26
1.3.4.2 Control de calidad de las secuencias genómicas de CCD1 y CCD4.	27
1.3.4.3 Alineamiento con el genoma de referencia.	27
1.3.4.4 Localización de variantes en la secuencia de CCD1 y CCD4.	27
1.3.4.5 Anotación de variantes en la secuencia de CCD1 y CCD4.	28
1.3.4.6 Alineamiento múltiple de secuencias de CCD1 y CCD4.	28
1.3.4.7 Análisis de asociación.	28
1.4 RESULTADOS.	29
1.4.1 Contenido y proporción de carotenoides en los granos de maíz.	29
1.4.2 Degradación de carotenoides en los granos de maíz.	30
1.4.3 Correlaciones entre la degradación y concentración de carotenoides en los granos de maíz.	32
1.4.4 Expresión genética de CCD1 en diferentes genotipos de maíz.	33
1.4.5 Correlación entre el valor k de degradación de carotenos PVA y expresión relativa de CCD1.	35
1.4.6 Correlación del número de copias del gen CCD1, con la expresión de CCD1 y con el valor k de degradación de carotenos PVA.	36
1.4.7 Predicción del efecto de las variantes.	37
1.4.8 Polimorfismos en secuencias de CCD1 y CCD4 en líneas altas en PVA.	38
1.5 DISCUSIÓN.	42
1.6 LITERATURA CITADA.	47
1.7 ANEXOS.	51
1.6.1 Determinación de la calidad e integridad de ARN y ADNc.	56
1.6.2 Cuantificación de la expresión génica.	57
1.6.3 Determinación de la calidad e integridad de ADN.	58
1.6.4 Parámetros estadísticos de calidad de las secuencias genéticas de CCD1 y CCD4.	59

CAPÍTULO 2. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DEL GRANO DE MAÍZ INFLUYEN EN LA RETENCIÓN DE CAROTENOIDE DURANTE EL ALMACENAMIENTO.....	61
2.1 RESUMEN	61
2.2 INTRODUCCIÓN	62
2.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	64
2.3.1 Material vegetal.....	64
2.3.2 Características físicas del grano.	65
2.3.3 Experimento de almacenamiento de grano.....	65
2.3.4 Análisis de carotenoides y tococromanos.	65
2.3.5 <i>Tasa de degradación de carotenoides y cálculo de la retención de carotenoides.....</i>	<i>66</i>
2.3.6 Determinación de la capacidad de absorción de radicales oxidantes.	66
2.3.7 Análisis estadístico.....	66
2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
2.4.1 Características físicas, concentración de carotenoides y TCCM de los granos de maíz.	67
2.4.2 Concentración y tasas k de degradación de carotenoides en granos enteros y degerminados de maíz biofortificado.....	69
2.4.3 Actividad antioxidante en granos enteros y granos degerminados.	72
2.4.4 Correlaciones entre carotenoides PVA, su tasa de degradación, TCCM, ORAC y características físicas del grano.....	73
2.4.5 Análisis de componentes principales.	77
2.5 CONCLUSIONES	79
2.6 LITERATURA CITADA.....	79
2.7 ANEXOS	83
CAPÍTULO 3. CONDICIONES DE ESTRÉS POR SEQUÍA Y NITRÓGENO LIMITADO DEL SUELO SOBRE LOS CAROTENOIDES PROVITAMINA-A DEL GRANO DE MAÍZ	84
3.1 RESUMEN	84
3.2 INTRODUCCIÓN	85

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS	88
3.3.1 Germoplasma experimental.	88
3.3.2 Diseño de campo de experimentación y manejo agronómico.	90
3.3.3 Medición de los datos de campo.	91
3.3.4 Análisis de carotenoides.	91
3.3.5 Características físicas del grano.	92
3.3.6 Análisis estadístico.....	92
3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	94
3.4.1 Contenido de carotenoides.	94
3.4.2 Dureza y tamaño del grano bajo estrés abiótico.	96
3.4.3 Rendimiento de grano.	97
3.4.4 ACG y ACE para carotenoides.....	99
3.4.5 Efectos de ACG de los carotenoides.....	106
3.4.6 Coeficientes de correlación entre carotenoides, rendimiento de grano y rasgos de calidad de grano.	109
3.5 CONCLUSIONES	113
3.7 LITERATURA CITADA	113
CONCLUSIONES GENERALES	118

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1 Genealogía de las líneas de maíz evaluadas.....	12
Cuadro 1.1 Correlación entre los valores k de degradación [‡] y entre las concentraciones de carotenoides [†] ($\mu\text{g g}^{-1}$) en las 42 líneas de maíz amarillo.....	32
Cuadro 1.2 Correlación entre los valores k de degradación y concentraciones de carotenoides.....	33
Cuadro 1.3 Análisis de varianza de la cuantificación relativa del ARNm de CCD1 de once líneas de maíz.....	34
Cuadro 1.4 Correlación del número de copias, con la expresión de CCD1 y con valor k de degradación de carotenos provitamina-A en cuarenta y dos genotipos de maíz amarillo.....	37
Cuadro 1.5 Número de efectos de variantes por tipo y por región de las secuencias de CCD1 y CCD4 en las cuarenta y dos líneas de maíz.....	38
Cuadro 1.6 Análisis de asociación de k de degradación y polimorfismos en las secuencias de las enzimas CCD1 y CCD4.....	39
Cuadro 1.7 Medidas de tendencia central y de dispersión de la concentración inicial y valor k de degradación de carotenoides en las 42 líneas de maíz analizadas.....	51
Cuadro 1.8 Concentración inicial de los carotenoides en 42 línea de maíz analizada (presentada como $\mu\text{g g}^{-1}$ en peso seco).....	52
Cuadro 1.9 Valor k de degradación de los carotenoides en 42 líneas de maíz.....	53
Cuadro 2.1 Promedio de la concentración de carotenoides, tocoferoles, capacidad antioxidante [†] y proporción del grano en las ocho líneas de maíz con altas concentraciones de β -criptoxantina.....	68
Cuadro 2.2 ANOVA y comparación de medias de la concentración inicial de carotenoides en los tratamientos de grano entero y grano degerminado en ocho líneas de maíz.....	69

Cuadro 2.3 ANOVA y comparación de medias de los valores <i>k</i> de carotenoides en los tratamientos en grano entero y grano degerminado en ocho líneas de maíz.....	71
Cuadro 2.4 Correlación de la concentración tococromanoles y proporción de las estructuras del grano con los valores <i>k</i> de degradación de carotenoides en ocho líneas de maíz altas en β -criptoxantina.....	77
Cuadro 2.5 Porcentaje de retención de carotenoides en ocho genotipos de maíz durante el almacenamiento.	83
Cuadro 2.6 Correlación de los valores <i>k</i> de degradación y concentración inicial de carotenos analizado en el promedio de las ocho genotipos de maíz.	83
Cuadro 3.1 Nombres, genealogías, contenido de provitamina A (PVA) y genotipos para los extremos 3 'y 5' del locus <i>CrtRB1</i> (<i>CrtRB1</i> 3' y <i>CrtRB1</i> 5', respectivamente) y el extremo 5 'del locus <i>LycE</i> para los 11 líneas cruzadas bajo un diseño dialélico para la formación de 55 híbridos.....	89
Cuadro 3.2 Promedios de las características evaluadas y el error estándar bajo condiciones optimas, de estrés de sequia y estrés de bajo nitrógeno.	96
Cuadro 3.3 Cuadrados de PVA, β -caroteno, β -criptoxantina, luteína y zeaxantina para 55 híbridos provenientes de un diseño de cruce dialélico evaluados bajo condiciones optimas, de sequia y bajo nitrógeno en 8 ambientes	100
Cuadro 3.4 Cuadrados medios de rendimiento de grano, PVA, β -caroteno, β -criptoxantina, luteína y zeaxantina para 55 híbridos provenientes de un diseño de cruce dialélico evaluados bajo condiciones optimas en cuatro ambientes.	101
Cuadro 3.5 Cuadrados medios de rendimiento de grano, Provitamina A (PVA), β -caroteno, β -criptoxantina, luteína y zeaxantina para 55 híbridos provenientes de un diseño de cruce dialélico evaluados bajo condiciones de sequía (S)y bajo nitrógeno (BN)	104
Cuadro 3.6 Estimados de la aptitud combinatoria general para rendimiento de grano, PVA, β -caroteno, β -criptoxantina, luteína y zeaxantina bajo condiciones optimas (OPT) de sequía (S) y bajo nitrógeno (BN).	108

Cuadro 3.7 Coeficientes de correlación fenotípica de rendimiento de grano (RG), días a la antesis (AD), humedad de grano (MOI), provitamina A (PVA), β -caroteno (BC), β -criptoxantina (BCX), luteína y zeaxantina (ZX)	112
--	-----

LISTA DE FIGURAS

<p>Figura 1.1 Diagrama de caja de los rangos y medias de la concentración de carotenoides en las cuarenta y dos líneas de maíz analizadas. Lut= luteína; Zea= zeaxantina; BCX= β-criptoxantina; cisBC9= 9cisβ-caroteno; BC= β-caroteno; cisBC13=9cisβ-caroteno; ProVA= Provitamina-A.</p>	30
<p>Figura 1.2 Diagrama de caja de los rangos y medias del valor <i>k</i> de degradación de carotenoides en las cuarenta y dos líneas de maíz analizadas. Lut= luteína; Zea= zeaxantina; BCX= β-criptoxantina; cisBC9= 9cisβ-caroteno; BC= β-caroteno; cisBC13=9cisβ-caroteno; ProVA= Provitamina-A.</p>	31
<p>Figura 1.3 Gráfico de la expresión relativa del gen CCD1 en once líneas de maíz. Las letras representan el agrupamiento realizado en la comparación de medias (Test de Fisher) del promedio de la expresión relativa de cada línea. Barras de error representan el error estándar de los mínimos cuadrados de la cuantificación de los transcritos.....</p>	34
<p>Figura 1.4 Diagrama de dispersión de la expresión relativa del gen CCD1 y el valor <i>K</i> de degradación de β-caroteno en once líneas de maíz.....</p>	35
<p>Figura 1.5 Diagrama de dispersión de la expresión relativa del gen CCD1 y el valor <i>K</i> de degradación de β-criptoxantina en once líneas de maíz.</p>	36
<p>Figura 1.6 Diagramas Manhattan de la secuencia de las enzima CCD1. El eje x muestra las posiciones físicas de los SNP. El eje y muestra el log negativo de los valores P. Cada punto representando un SNP individual.</p>	40
<p>Figura 1.7 Diagramas Manhattan de la secuencia de las enzima CCD4. El eje x muestra las posiciones físicas de los SNP. El eje y muestra el log negativo de los valores P. Cada punto representando un SNP individual.</p>	41
<p>Figura 1.8 Dendrograma de la secuencia de la enzima CCD4. L=línea de maíz.</p>	42

Figura 1.9 a) Patrones de bandeo de ARN con muestras representativa de los genotipos estudiados; b) Producto de PCR del gen Actin1 en geles de agarosa al 1% de muestras de ADNc maíz. <i>MP</i> . marcador de peso molecular es X174/HaeIII. (-) control negativo	56
Figura 1.10 Producto PCR del gen CCD1 en gel de agarosa al 1% de tres muestras de ADNc de maíz. a =ADN; b =control negativo (muestra sin ADN); c =ADNc sin tratamiento de ADNasa; <i>MP</i> =marcador de peso molecular es X174/HaeIII.....	57
Figura 1.11 Gráficos de la curva de amplificación (a), de fusión (b) y la curva patrón (c) del <i>software</i> CFX Manager™, versión 3.1.....	58
Figura 1.12 Patrones de bandeo de ADN con muestras representativa de los genotipos de maíz estudiados; gel de agarosa al 0.8%; <i>MP</i> . marcador de peso molecular λ /HindIII.	58
Figura 1.13 a) Ejemplos del control de calidad arrojados por el <i>software</i> “FastQC” de las secuencias crudas de dos líneas de maíz. b) Parámetros estadísticos de datos crudos del conjunto de 42 líneas de maíz con “bamtools”.....	59
Figura 1.14 Dendrograma de la secuencia de enzima CCD1. L=línea de maíz.....	60
Figura 2.1 Diagrama de caja de las tasas de degradación de los carotenoides analizados en las ocho líneas de maíz.	70
Figura 2.2 Diagrama de dispersión de la relación entre el porcentaje de endospermo harinoso y el contenido inicial de β -criptoxantina de 8 líneas de maíz con alto contenido en β -criptoxantina.	75
Figura 2.3 Diagrama de dispersión de la relación entre el porcentaje de endospermo harinoso y el contenido inicial de β -caroteno de 8 líneas de maíz con alto contenido en β -criptoxantina.....	75
Figura 2.4 Diagrama de componentes principales de características de físicas de grano, ORAC, concentraciones iniciales de tococromanos y carotenoides en las ocho líneas de maíz analizadas. α -T3, α -tocotrienol;	

γ -TP, γ -tocoferol; α -TF, α -tocoferol; LUT, luteína; ZEAX, zeaxantina;
 β CX, β -criptoxantina; β C, β -caroteno; PVA, Provitamina A. 78

INTRODUCCIÓN GENERAL

Los carotenoides son pigmentos naturales de color amarillo o naranja sintetizados en plastidios de plantas y por otros organismos fotosintéticos (Moise *et al.*, 2014). Están presentes en algunos animales y recientemente se han encontrado genes que expresan enzimas carotenogénicas en el genoma de áfidos (Moran y Jarvik, 2010).

Los carotenoides son moléculas lineales insaturadas de 40 carbonos conformada de ocho unidades de isoprenos o terpenos. Este esqueleto lineal puede modificarse por ciclación, migración de los dobles enlaces, por la introducción de grupos funcionales oxigenados o por isomerización. Dependiendo de su estructura es la función que desempeñan y las propiedades físicas y químicas que poseen. Los carotenoides se han clasificado en carotenos y xantófilas. Los carotenos son compuestos no oxigenados como β -caroteno, que contienen anillos α y/o β -ionona en uno o ambos extremos de la cadena. Las xantofilas contienen grupos funcionales oxigenados en la cadena de hidrocarburos como hidrox-, metox-, epoxi- o carboxi-. Las xantofilas (luteína, violaxantina, neoxantina, zeaxantina, β -criptoxantina) son abundantes en los tejidos vegetales fotosintéticos (Moise *et al.*, 2014). Se ha observado que los grupos -OH, las formas esterificadas y la matriz en que se presentan las xantófilas les proporciona mayor estabilidad en comparación con los carotenos, que suelen ser más propensos a la pérdida (Burri, 2015). β -criptoxantina se encuentran disueltas en lípidos en frutos como mandarinas. Gracias a esta micela, β -criptoxantina es menos hidrófoba que el α - y β -caroteno y por lo tanto más estable (Burri, 2015).

Los carotenoides muestran variación cuantitativa y cualitativa a través de los distintos tejidos de las plantas. El tipo de carotenoide depende de la tarea fisiológica que desarrollen en ese tejido específico. Los amiloplastos son plastidios especializados para el almacenamiento de gránulos de almidón. En semillas de cereales como en maíz, la luteína y zeaxantina son los principales carotenoides y también se almacenan en las paredes externas de los amiloplastos (Howitt y Pogson, 2006). En semillas oleaginosas de canola, girasol y calabaza, los eliooplastos son los plastidios que almacenan los carotenoides en estructuras lipoproteicas y puede secuestrar carotenoides como láminas y cristales (Howitt y Pogson, 2006). La luteína es el componente mayoritario de este tipo

de semillas. La principal función de los carotenoides en la semilla es para la producción *in situ* del ácido absólico (ABA). Zeaxantina es el compuesto precursor de ABA sintetizado en la rama β de la ruta de síntesis de apocarotenos. Se ha reportado que la acumulación de ABA alcanza su punto máximo en la fase de maduración de la semilla. Esta hormona contribuye en la latencia de la semilla permitiendo su germinación hasta que las condiciones sean favorables para el crecimiento de la planta (Howitt y Pogson, 2006). La luteína reduce la actividad de la peroxidasa que está relacionada con el envejecimiento y la pérdida de viabilidad de la semilla, contribuyendo a una germinación exitosa (Howitt y Pogson, 2006).

Los carotenoides en frutos son muy estables cuando se localizan en plastoglóbulos. Los plastoglóbulos son cuerpos lipídicos dentro de los cromoplastos. Los carotenoides son los precursores de apocarotenos fuentes de color, sabor y aroma de flores y frutas. β -caroteno es el sustrato principal para la síntesis de β -ionona mediado por enzimas catalíticas como la CCD1. β -ionona es un compuesto volátil de bajo peso molecular fisiológicamente útil en estos tejidos para atraer insectos polinizadores y dispersores (Howitt y Pogson, 2006).

En hojas de plantas, los carotenoides se ubican en los cloroplastos. Participan en la captura de la luz solar transfiriendo la energía a las moléculas de clorofila dentro del aparato fotosintético. En este proceso, los carotenoides participan dentro del complejo denominado antena fotosintética, constituido por pigmentos unidos a proteínas. El complejo refleja la luz roja-naranja-amarilla, ampliando el rango de absorción del espectro electromagnético (400 a 600 nm) y aumentando así la capacidad de energía absorbida. β -caroteno tiene propiedades altamente fotosintéticas en comparación con las xantofilas. También participan como foto-protección, evitando que los rayos solares generen especies de oxígeno reactivo que puedan destruir al aparato fotosintético dentro de las membranas de los tilacoides (Demming-Adams *et al.* 1996).

Genética de los carotenoides y su ruta de síntesis.

La presencia de carotenos en el grano de maíz esta comprometida por la dosis génica de *Yellow 1* (*Y1*), gen que en estado dominante codifica para la enzima PSY (fitoeno sintasa; Buckner *et al.*, 1996). Para que el endospermo genere el color amarillo en el grano, es necesario que presente tres de los cuatro fenotipos posibles generados en la doble fecundación. En una cruce monohíbrida, estos fenotipos son el resultado de la fusión de los dos núcleos polares del saco embrionario o gametofito femenino y un núcleo de esperma del polen o gametofito masculino (Ford, 2000).

Cuando *y1* está en estado recesivo el endospermo es blanco, pero el embrión sigue siendo amarillo, con el mismo contenido de carotenoides que en los granos que tienen el gen *Y1* dominante. Las regiones fotosintéticas de la planta también producen carotenos y xantofilas. Esta diferencia en la producción de pigmentos sugiere que dentro del núcleo *y1* está regulado por el desarrollo o que isozimas del gen *Y1* están presentes (Buckner *et al.*, 1996). La mutación de *y1* en la región promotora bloquea la transcripción, por lo tanto, no hay enzima presente en el endospermo del grano.

Suwarno *et al.* (2015) y Fu *et al.*, (2013) encontraron que las variaciones del 27% y 8-9% en la concentración de carotenos provitamina A (PVA; como β -criptoxantina, α y β -caroteno) en maíz, se explicaba por un marcador localizado dentro de la secuencia del gen *PSY* en el cromosoma. Incluso la inserción de este gen en el genoma del arroz que no tiene este gen *per se*, resultó en un incremento 17 veces de β -caroteno ($31 \mu\text{g g}^{-1}$ peso seco; Paine *et al.*, 2005). Aunque los efectos de la sequía y el bajo contenido de nitrógeno sobre el contenido de PVA en el grano aun se desconocen, se ha reportado que la sequía induce la síntesis de *PSY3* en las raíces de maíz (Li *et al.*, 2008) y arroz (Welsch *et al.*, 2008), y esto se correlaciona con el aumento del flujo de carotenoides y ABA.

Sin embargo, *Y1* no es el único gen que aporta la variación de color que corresponde a la cantidad de carotenoides en el grano de maíz. Las bases genéticas del organismo aporta numerosos genes estructurales que codifican enzimas y genes reguladores. Estos genes reguladores son llamados activadores de la transcripción porque codifican proteínas que controlan la transcripción de genes estructurales. Genes

estructurales y reguladores participan en la ruta de síntesis y catalización de carotenos y de las cuales depende su concentración (Ford, 2000; Zhai *et al.*, 2016).

Como todos los isoprenoides, los carotenoides se sintetizan a partir del isopentenil difosfato (IPP, del inglés isopentenyl diphosphate), compuesto de 5 carbonos proveniente de la ruta 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP, del inglés methyl-D-erythritol 4-phosphate; Moise *et al.*, 2014). Se necesita la condensación de cuatro moléculas de IPP catalizada por *geranil geranil difosfato sintasa* (*ggpps*; del inglés *geranylgeranyl diphosphate synthase*) para generar el compuesto geranil geranil difosfato (GGPP, C₂₀). El sustrato GGPP es precursor de varias rutas de síntesis de terpenoides incluidos los carotenoides, y se ha asociado con la síntesis y la acumulación de carotenoides (Wurtzel, 2004).

La condensación de dos moléculas de GGPP por la enzima PSY, forma el 15-cis-fitoeno que representa el compuesto control de la reacción en la vía de síntesis. El 15-cis-fitoeno se convierte en un compuesto pigmentado rojo llamado all-trans-licopeno, a partir de cuatro reacciones de desaturación mediadas por las enzimas fitoeno desaturasa (PDS, del inglés phytoene desaturase) y ζ-caroteno desaturasa (ZDS, del inglés ζ-carotene desaturase) y después por la isomerización catalizada por carotenoide isomerasa (CrtISO, del inglés carotene isomerase; Aluru *et al.*, 2008). Las enzimas PDS, ZDS Y CrtISO han sido relacionadas con la concentración de carotenos en el grano de maíz. Por ejemplo, PDS se ha asociado con la deficiencia de carotenos y la hormona ABA en mutante vivíparo (*vp*) como *vp2*, *vp5* y *w3*, que presentan endospermo blanco (Li *et al.*, 1996; Matthews *et al.*, 2003). Así también, el mutante *vp9* de endospermo blanco, se asocia con la ZDS (Matthews *et al.*, 2003). Inclusive, se ha reportado que el factor de transcripción *APETALA2* (*AP2*) se une a la región reguladora principal del promotor *PSY* y se ha demostrado que regula modestamente los niveles de transcritos de *PSY* y *PDS*, así como el contenido de carotenoides en *A. thaliana* (Welsch *et al.*, 2007).

En un paso posterior, las enzimas licopeno e-ciclasa (LycE) y licopeno β-ciclasa (LcyB) generan α-caroteno, mientras que la acción única de enzimas LcyB produce β-caroteno con dos anillos β-ionona (Zhai *et al.*, 2016). Alelos mutantes de *lcyE* generan un incremento hacia β-caroteno y en menor medida hacia la rama alfa, aumentando la

cantidad de compuestos relacionados con la PVA (Harjes *et al.* 2008). A pesar de la selección de mutantes de *lcy*, Naqvi *et al.*, (2011) encontraron un equilibrio en la cantidad de luteína y zeaxantina de las rutas α y β , respectivamente. Esto sugiere una regulación compleja en la ruta de síntesis de carotenos y apocarotenos.

En seguida, en rutas alternas α y β -caroteno son catalizadas por la enzima hidroxilasa CrtRB1 y modificadas hacia xantófilas. En la vía β la enzima CrtRB1 convierte el β -caroteno en β -criptoxantina. La expresión del gen esta negativamente correlacionada con la cantidad de β -caroteno (Yan *et al.*, 2010). De esta forma, los alelos mutantes del gen han sido seleccionados para aumentar significativamente la cantidad de β -caroteno en maíz (Babu *et al.*, 2013).

Funciones y efecto de la deficiencia de carotenoides en la salud humana.

Los carotenoides aportan calidad nutricional a los granos de cultivos básicos que los sintetizan. Son importantes para la salud humana porque participan como precursores de la vitamina A y como antioxidantes. La PVA participa en funciones fisiológicas del organismo humano, en procesos como la visión, crecimiento e inmunidad. Además que el poder antioxidante de los carotenoides permite disminuir el riesgo de enfermedades degenerativas como cáncer y enfermedades cardiovasculares (Berman *et al.*, 2014; Rodriguez-Concepcion *et al.*, 2018). La actividad de PVA de los carotenos se da por la cantidad de anillos que posee su molécula. Mientras que β -criptoxantina y α -caroteno solo contienen un anillo β -ionona, la actividad de PVA de β -caroteno es mayor por que su molécula posee dos anillos que pueden convertirse cada uno en retinol. Estudios de biodisponibilidad y bioaccesibilidad de carotenoides PVA mencionan que β -criptoxantina suele ser mejor absorbida por el intestino humano. También, se ha asociado el consumo de luteína y zeaxantina con la prevención de la degeneración de la mácula del ojo que en personas de edad avanzada produce ceguera (Rodriguez-Concepcion *et al.*, 2018).

En una dieta equilibrada los humanos consumen 20 minerales y 40 nutrientes entre ellos vitaminas y aminoácidos esenciales (Pfeiffer y McClafferty, 2007). Sin embargo, en ciertas comunidades de África, Latinoamérica y Asia la desnutrición de micronutrientes afecta a una gran parte de la población. Una de las causas es la falta de una dieta

completa, ya que en la mayor parte del año su alimentación se basa en cereales básicos. La deficiencia de vitamina A (DVA) es uno de los principales problemas de salud pública resultando más afectados los niños y mujeres embarazadas (Pfeiffer y McClafferty, 2007). Mientras que en niños es causa de ceguera evitable y aumenta significativamente el riesgo de enfermedad y muerte por infecciones tratables, como diarrea o sarampión; en mujeres embarazadas, principalmente en el tercer trimestre aumenta el riesgo de la mortalidad causado por la alta demanda de vitamina A por parte de ambos, neonato y madre (<http://www.who.int/nutrition/topics/vad/en/>).

Mejoramiento genético de Provitamina-A en maíz.

El programa global Harvest plus (<http://www.harvestplus.org>) del Grupo Consultivo de Investigación Agrícola Internacional (CGIAR, del inglés Consultative Group on International Agricultural Research) desde hace 14 años se ha orientado a utilizar la variabilidad genética de micronutrientes en cultivos básicos. El objetivo es aminorar problemas de salud pública debido a la malnutrición en poblaciones humanas vulnerables, bajo la idea “las plantas se reproducen, las píldoras no”, ya que una de las estrategias más comunes para combatir la malnutrición son la suplementación (tabletas o suspensiones de vitamina A) y la fortificación de alimentos (Pfeiffer y McClafferty 2007).

La variación en contenido de los carotenoides en el grano de maíz ha permitido a los fitomejoradores seleccionar genotipos sobresalientes en esta característica. Esta variación depende de la base genética de los genotipos, observándose mayores concentraciones en los genotipos de clima templado, en contraste con materiales de climas tropicales (Suwarno, 2014; Dhliwayo *et al.*, 2014).

El contenido de carotenoides en diferentes germoplasmas de maíz han sido extensamente analizados (Egesel *et al.*, 2003; Menkir *et al.*, 2008; Suwarno, 2014). En general, zeaxantina se encuentra en la mayor proporción seguida de luteína, β -criptoxantina y en proporciones relativamente menores β -caroteno.

La cantidad de los carotenoides en el grano de maíz ha sido modificada a causa de la selección artificial. Se han reportado concentraciones naturales que van de 0.24- 8.8 $\mu\text{g g}^{-1}$ y 5.5- 66.0 $\mu\text{g g}^{-1}$ en peso seco (ps) de PVA y carotenos totales, respectivamente (Harjes *et al.*, 2008; Ortiz-Monasterio *et al.*, 2007). La selección artificial ha modificado

estas cantidades y ahora podremos observar rangos de 5.1-22 $\mu\text{g g}^{-1}$ y 20.1- 89.0 $\mu\text{g g}^{-1}$ ps de PVA y carotenos totales, respectivamente (Azmach *et al.*, 2018; Menkir *et al.*, 2008; Suwarno, 2014; Ortiz *et al.*, 2016).

Estudios de aptitud combinatoria efectuados con la finalidad de observar el comportamiento de carotenos PVA, han demostrado que los carotenoides son altamente estables a través de ambientes, mostrando predominio de efectos genéticos aditivos sobre no aditivos además de heredabilidades altas e intermedias (Egesel *et al.*, 2003; Menkir y Maziya-Dixon, 2004; Senete *et al.*, 2011; Dhliwayo *et al.*, 2014; Menkir *et al.*, 2008; Suwarno *et al.* 2014). Para PVA estas estimaciones sugieren un progreso rápido desde la selección. Dhliwayo *et al.* (2014) reportaron un aumento mayor al 25% por ciclo de la selección recurrente para los carotenos PVA en tres poblaciones. Pixley *et al.*, (2013) resumió el avance en el desarrollo de maíz PVA a través de la selección recurrente y mejoramiento de pedigrí con un aumento del 300% en los niveles de PVA en 8 años de mejoramiento; pasando de 6 $\mu\text{g g}^{-1}$ en promedio a 20 $\mu\text{g g}^{-1}$ de PVA.

El uso de marcadores moleculares y la predicción genómica, ha permitido acelerar la respuesta a la selección de los altos contenidos de PVA en genotipos de maíz (Babu *et al.* 2012; Azmach *et al.* 2013; Velu *et al.* 2016; Pixley, Palacios-Rojas, y Glahn 2011). Así, se identificaron variaciones alélicas de genes que participan en la ruta de síntesis, como licopeno ϵ -ciclase (Lcye ϵ) (Harjes *et al.*, 2008) y β -caroteno hidroxilasa 1 (crtRB1; Yan *et al.*, 2010). Esta última enzima permite aumentar hasta cuatro veces más la concentración de PVA. Se realizó la liberación y comercialización de híbridos trilineales con 7-8 $\mu\text{g g}^{-1}$ primero en Zambia en 2012 y hoy en día hay más de 40 cultivares de maíz biofortificado comercializado en Nigeria, Congo, Tanzania, Malawi, Zimbabue, Zambia (Anderson *et al.*, 2017).

Estabilidad de Carotenos Provitamina-A del grano de maíz pre y post-cosecha.

A nivel celular la estabilidad de carotenoides depende del lugar de su almacenamiento. Naturalmente, los carotenoides son secuestrados en cloroplastos y cromoplastos formando enlaces con distintos compuestos. En las membranas fotosintéticas de los cloroplastos crean complejos clorofila-proteína-carotenoide preferencialmente con xantofilas, aportando la función de captura de luz y fotoprotección

(Vishnevetsky, Ovadis, y Vainstein 1999). Las estructuras de acumulación de carotenos determinan la estructura del cromoplasto como globular (compuestos lipídicos), cristalino, membranoso fibrilar-tubular (complejos proteína-lípidos. Schaub *et al.* (2017) reportaron que los micro-cristales de β -caroteno tiene una mayor estabilidad, mientras que los complejos β -caroteno-lípido hace más biodisponible la conversión β -caroteno/retinol para el humano.

Shewmaker *et al.* (1999), observaron en plantas transgénicas un nuevo cuerpo de inclusión rodeado por una membrana, postulándose que la aparición de esta nueva estructura de almacenamiento de los carotenoides permite mayor acumulación de los mismos.

Recientemente, en arroz transgénico se aumentó la concentración de carotenoides al inducir una reserva metabólica expresando el gen de *A. thaliana* *ORANGE* (*AtOR*) (Bai *et al.*, 2016). La mutación del gen *OR* induce la diferenciación de proplastidos en cromoplastos promoviendo la acumulación de carotenos (Lu *et al.*, 2006).

Los carotenos al ser compuestos antioxidantes provocan su propia degradación causada por oxidación durante el secado del grano o las condiciones normales de almacenamiento (oxígeno, luz, temperatura, humedad, tiempo) que genera pérdidas considerables de los compuestos carotenoides (Che *et al.*, 2016; Ortiz, Rocheford, y Ferruzzi 2016; Schaub *et al.*, 2017). El maíz biofortificado con PVA tiene mayores cantidades de β -caroteno y β -criptoxantina en comparación con el maíz amarillo normal (Taleon *et al.*, 2017). En el maíz PVA, se ha encontrado que la β -criptoxantina es más estable durante el almacenamiento en comparación con β -caroteno (Ortiz *et al.*, 2016; Sowa *et al.*, 2017). El grado de estabilidad varía según el genotipo, así como la forma de almacenamiento, en grano o harina, el tamaño de partícula de la harina y la concentración de oxígeno en el contenedor de almacenamiento (Ortiz *et al.*, 2016; Taleon *et al.*, 2017).

La oxidación por enzimas como las lipoxigenasas también puede ser causa de pérdida. En “Golden Rice” por ejemplo, aplicando la tecnología de iRNA para disminuir la expresión del gen de la enzima lipoxigenasa endógena, reveló un bajo envejecimiento y aumento de la estabilidad de β -caroteno en semilla después de un tratamiento de envejecimiento artificial (Gayen *et al.* 2015).

Entre los factores enzimáticos que catalizan carotenoides están dos grupos de hidroxilasas (9-cis epoxicarotenoide dioxigenasas, NCEDs por sus siglas en inglés; y dioxigenasas de ruptura de carotenos, CCDs por sus siglas en inglés) que catalizan carotenoides para la formación de apocarotenoides (Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012).

Se ha reportado la actividad catalítica de CCD1 y por lo tanto una disminución de carotenoides en *Medicago truncatula* (Floss yWalter 2009; Floss *et al.* 2008; Vogel *et al.* 2008; Baldermann *et al.* 2010; Tuan y Park 2013; Ma *et al.* 2014; Lashbrooke *et al.* 2013).

La CCD1 está localizada en el citoplasma (Auldridge *et al.*, 2006), aunque también pueden asociarse con la membrana externa del cloroplasto (Simkin *et al.*, 2004) y tiene un papel en la producción de compuestos volátiles de frutas y flores (Baldermann *et al.*, 2010; Simkin *et al.*, 2004).

Sin embargo, no se conoce completamente las causas del catabolismo de los carotenos en grano de maíz biofortificado. Dicha información será valiosa para complementar el conocimiento del destino de los carotenos PVA en el grano maduro de maíz. El propósito de este trabajo fue el estudio genético de la enzima CCD1 y la búsqueda de marcadores moleculares en su secuencia que estén asociados a la degradación de carotenos, con el fin de proponer alternativas de mejoramiento genético que contribuyan a una acumulación estable de estos compuestos en los granos de maíces biofortificados.

Adicionalmente, evaluar el efecto de estrés por sequía y bajo nitrógeno en el contenido de PVA de híbridos de maíz con el fin de aportar información para el diseño y selección dentro de un programa biofortificación y contribuir al conocimiento de estabilidad de carotenos antes y después de la cosecha.

DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA TESIS

La *Introducción General* acoge el tema de carotenos en maíz y revisión literaria del estado de la investigación en el área de biofortificación y la estabilidad de carotenos. Se mencionan generalidades de los carotenoides, los beneficios que aportan a la salud humana y qué pasa cuando están carentes en la dieta humana. También se mencionan los avances en el incremento de los carotenoides en el grano de maíz y el porqué el

enfoque de biofortificación en maíz resulta ser una estrategia sostenible.

Se incluye un apartado sobre el *Material Vegetal*, donde se describe el germoplasma de maíz utilizado en el trabajo de investigación. Se describen los experimentos y origen del grano utilizado en los estudios presentados en los *Capítulos 1, 2 y 3*.

Basados en estudios moleculares y de asociación genética previamente realizados de CCD1 (Vallabaneni *et al.*, 2014; Suwarno *et al.*, 2015) y CCD4 (Gonzales-Jorge *et al.*, 2013), sugieren que estas enzimas están implicadas en la degradación de carotenos. La diversidad de los maíces biofortificados analizados en el *Capítulo 1* fueron esenciales para el estudio genético de la enzima CCD1 y su relación con la catalización de carotenos. Justificando con ello los estudios adicionales de la relación genética de las enzimas CCD1 y CCD4 con la estabilidad de carotenos en granos maduros de maíz biofortificado.

Estudios anteriores han reportado que la degradación de los carotenoides difiere entre el germoplasma de maíz (Ortiz *et al.*, 2016; Cabrera-Soto *et al.*, 2017). Además que también se reportó que los materiales de maíz con altas concentraciones de β -criptoxantina resultaban menos afectados en la pérdida de PVA (Taleon *et al.*, 2017; Sowa *et al.*, 2017). Basados en la influencia de varios componentes sobre la estabilidad de carotenos, como lipoxigenasas (Gayen *et al.*, 2015) y la vitamina E presentes en el germen (Che *et al.*, 2016) además de la estructura física del grano; el *Capítulo 2* se centra en medir las características físicas y químicas del grano entero y desgerminado y cómo ello influye en la estabilidad de los carotenoides.

Estudios genéticos han demostrado la alta heredabilidad de los carotenoides a través de diferentes ambientes (Suwarno, 2014; Dhliwayo *et al.*, 2014; Menkir *et al.*, 2008). Sin embargo, se desconoce el comportamiento de los carotenoides en el grano de maíz cuando el cultivo crece bajo estrés por sequía o estrés por nitrógeno limitado. El objetivo del estudio del *Capítulo 3* fue evaluar los efectos de la sequía y el bajo nitrógeno del suelo sobre el contenido de carotenos PVA en 55 de híbridos de maíz.

MATERIAL VEGETAL

Se seleccionaron 44 líneas mejoradas de maíz altas en Provitamina A (PVA; > a 4 hasta 30 $\mu\text{g g}^{-1}$) con polimorfismo en la secuencia genética de la enzima CCD1 y diferentes tasas de degradación y concentración de carotenos PVA (Suwarno *et al.*, 2015). En el *Capítulo 1* se utilizaron 42 de las 44 líneas para un nuevo experimento de degradación, la cuantificación del número de copias del gen CCD1 y para la secuenciación de los genes de CCD1 y CCD4. Adicionalmente, se cuantificó la expresión relativa de CCD1 en 11 de las 44 líneas de maíz.

Para los estudios presentados en el *Capítulo 2*, se seleccionaron ocho genotipos de maíz de altas cantidades de β -criptoxantina. Para los estudios del efecto de la sequía y bajo nitrógeno en la acumulación de carotenos que se presenta en el *Capítulo 3* se utilizaron 55 híbridos. Once de las 44 líneas mejoradas de maíz se utilizaron como parentales para la obtención de los híbridos analizados bajo dichas condiciones de stress (Cuadro 1).

Las 44 líneas de maíz (Cuadro 1) fueron desarrolladas por el programa de mejoramiento de CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo) con el apoyo del programa global de biofortificación Harvest Plus.

De estas líneas, veinte (1-20, Cuadro 1) presentan alto contenido de β -criptoxantina (5-18 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso de materia seca). La mayoría de dichas líneas se han utilizado en el programa de mejoramiento para el desarrollo de una variedad sintética alta en β -criptoxantina. Entre las líneas destaca la CML297.

Once líneas de las 44 (21-31, Cuadro 1) fueron derivadas de parentales que presentan uno o ambos alelos de *CrtRB1* y *LcyE*, favorables para el alto contenido de carotenos PVA. Las once líneas fueron seleccionadas con ayuda de marcadores moleculares y tienen un contenido de PVA >15 $\mu\text{g g}^{-1}$. El alelo favorable para *crtRB1* se obtuvo de la línea (KU1409/DE3/KU1409)S2-18-2-B que fue derivada por retrocruzamiento de la línea templada "DE3". Mientras que el alelo favorable para *LcyE* se obtuvo de la línea tropicalizada CarotenoidSyn3-FS11-4-3-B*2 (Babu *et al.*, 2013).

Trece líneas adicionales de las 44 (32-44, Cuadro 1), fueron derivadas de germoplasma templado, seleccionadas de forma convencional y adaptadas a climas tropicales, buscando fenotipos altos en contenido de PVA (Pixley *et al.*, 2013). También

se incluye la CML451 (44, Cuadro 1), una línea élite tropical de grano amarillo con excelente potencial de rendimiento y superior para otros rasgos agronómicos.

Cuadro 1 Genealogía de las líneas de maíz evaluadas.

Numeración consecutiva	Capítulo ^s	ID	Genealogía	
1	1a,b y 2	1	B-CryptoxanthinSynF1-#-42-1-1-1-B	
2	1a,b	2	B-CryptoxanthinSynF1-#-42-1-3-1-B	
3	1a,b y 2	3	B-CryptoxanthinSynF1-#-42-2-1-1-B	
4	1a,b	4	B-CryptoxanthinSynF1-#-42-2-2-1-B	
5	1a,b	5	B-CryptoxanthinSynF1-#-55-2-1-1-B	
6	1a,b	6	B-CryptoxanthinSynF1-#-86-2-2-1-B	
7	1a,b y 2	7	B-CryptoxanthinSynF1-#-153-1-1-1-B	
8	1a,b	8	B-CryptoxanthinSynF1-#-172-1-1-1-B	
9	1a,b	9	B-CryptoxanthinSynF1-#-172-2-1-1-B	
10	1a,b y 2	10	B-CryptoxanthinSynF1-#-187-2-1-1-B	Genotipos altos en β -criptoxantina
11	1a,b	11	B-CryptoxanthinSynF1-#-54-2-2-1-B	
12	1a,b	12	B-CryptoxanthinSynF1-#-72-1-2-1-B	
13	1a,b y 2	13	B-CryptoxanthinSynF1-#-117-2-1-1-B	
14	1a,b y 2	14	B-CryptoxanthinSynF1-#-123-2-2-1-B	
15	1a,b	15	B-CryptoxanthinSynF1-#-171-2-1-1-B	
16	1a,b y 2	16	B-CryptoxanthinSynF1-#-185-2-2-1-B	
17	1a,b	17	B-CryptoxanthinSynF1-#-188-2-3-1-B	
18	1a,b y 2	18	B-CryptoxanthinSynF1-#-193-1-2-1-B	
19	1a,b	19	B-CryptoxanthinSynF1-#-213-1-3-1-B	
20	1a,b	20	B-CryptoxanthinSynF1-#-259-2-1-1-B	
21	1a,b y 3	22	(KUI carotenoid syn-FS11-1-1-B-B-B/(KU1409/DE3/KU1409)S2-18-2-B)-B-2(MAS:L4H1)-2-B*6	
22	1a,b y 3	23	KUIcarotenoidsyn-FS17-3-2-B*12	
23	1a,b y 3	24	(KUI carotenoid syn-FS17-3-2-B-B-B/(KU1409/DE3/KU1409)S2-18-2-B)-B-3(MAS:L4H1)-4-B*6	
24	1a,b y 3	25	(KUI carotenoidsyn-FS17-3-2-B-B-B-B/(CML297/(KU1409/DE3/KU1409)S2-18-2-B))-B-26-1-B*3	
25	1a,b,c	27	NC486/(NC486/Carotenoid Syn3-FS5-1-5-B-B//KUI carotenoid syn	Genotipos con alelos mutantes <i>LcyE</i> y/o <i>CrtRB1</i>
26	3	97	(CLQRCWQ97-B///((KUIcarotenoidsyn-FS17-3-2-B-B-B/(KU1409/DE3/KU1409)S2-18-2-B)//CarotenoidSyn3-FS11-4-3-B-B-B))-B-25-2-B*6	
27	3	99	(KUI carotenoidsyn-FS17-3-2-B-B-B/(KU1409/DE3/KU1409)-S2-18-2-B)-B-4(MAS:L4H1)-2-B*4	
28	1a,b,c	44	(KUICarotenoid syn-FS11-1-1-B-B-B/(KU1409/DE3/KU1409)S2-18-2-B)-B-2(MAS:L4H1)-5-B*4	
29	1a,b,c	45	(KUICarotenoid syn-FS17-3-2-B-B-B/(KU1409/DE3/KU1409)S2-18-2-B)-B-1(MAS:L4H1)-1-B*4	
30	1a,b y 3	46	KUICarotenoidsyn-FS25-3-2-B*8	

31	1a,b y 3	96	(KUI carotenoidsyn-FS17-3-2-B-B-B-B/(CML297/(KU1409/DE3/KU1409)-S2-18-2-B))-B-46-3-B*3	
32	1a,b	26	(CML150xCML451)-B-33-3-1-B-Bx(CML176xCL-G2501)-B-43	
33	1a,b	29	CML-285-B*4	
34	1a,b,c	30	((KUI409/SC55/KUI409)-S2-12-1-B-B)-B*4	
35	1a,b,c	31	(CML305/CML486)-8-1-1-B*6	
36	1a,b,c	33	((DTPYC9-F65-2-3-1-1-B-BxDTPYC9-F65-2-2-1-1-B-B)	
37	1a,b,c	38	(B97-B)-B*2	Genotipos mejorados
38	1a,b,c	42	(CML300/CML486)-7-2-2-B*6	seleccionan
39	1a,b,c	43	MAS[206/312]-23-2-1-1-B-B-B/[BETASYN]BC1-9-3-1-1-2-B*6	do para altos contenidos de PVA
40	1a,b,c	47	([[[NAW5867/P30SR]-40-1/[NAW5867/P30SR]-114-2]-16-2-2-B-2-B/CML395-6]-B-20-1-B-3-#[BETASYN]BC1-3-1-1-#/CML300)-3-3-2-B*4	
41	1a,b,c	48	(CML300/CML486)-7-2-1-B*4	
42	1a,b y 3	98	CML537/[BETASYN]BC1-10-3-#-B-*12	
43	1a,b	32	(LAA2002-46-2-B)-B-B-B-B-B	
44	1a,b y 3	50	CML451-B	

ID= Identificación de la línea de maíz. En la genealogía B*n (ej. B*4) representa el número de veces de autopolinización. §El *Capítulo 1* se dividió en tres experimentos a= Cuantificación de carotenoides; b= Cuantificación del número de copias del gen CCD1 en el genoma; c= Cuantificación de transcritos de CCD1.

LITERATURA CITADA

- Aluru, M., Y. Xu, R. Guo, Z. Wang, S. Li, W. White, K. Wang, and S. Roder. 2008. Generation of transgenic maize with enhanced provitamin A content. *J. Exp. Bot.* 59(13): 3551–3562.
- Azmach, Girum, Melaku Gedil, Abebe Menkir, and Charles Spillane. 2013. “Marker-Trait Association Analysis of Functional Gene Markers for Provitamin A Levels across Diverse Tropical Yellow Maize Inbred Lines.” *BMC Plant Biology* 13 (227).
- Babu, Raman, Natalia Palacios Rojas, Shibin Gao, Jianbing Yan, and Kevin Pixley. 2012. “Validation of the Effects of Molecular Marker Polymorphisms in LcyE and CrtRB1 on Provitamin A Concentrations for 26 Tropical Maize Populations.” *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik* 126 (2): 389–99. doi:10.1007/s00122-012-1987-3.
- Baldermann, Susanne, Masaya Kato, Miwako Kurosawa, Yoshiko Kurobayashi, Akira Fujita, Peter Fleischmann, and Naoharu Watanabe. 2010. “Functional Characterization of a Carotenoid Cleavage Dioxygenase 1 and Its Relation to the Carotenoid Accumulation and Volatile Emission during the Floral Development of *Osmanthus Fragrans* Lour.” *Journal of Experimental Botany* 61 (11): 2967–77. doi:10.1093/jxb/erq123.
- Che, Ping, Zuo-Yu Zhao, Kimberly Glassman, David Dolde, Tiger X. Hu, Todd J. Jones, Silas Obukosia, Florence Wambugu, and Marc C. Albertsen. 2016. “Elevated Vitamin E Content Improves All- *Trans* β -Carotene Accumulation and Stability in Biofortified

- Sorghum." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (39): 11040–45. doi:10.1073/pnas.1605689113.
- Floss, Daniela S, Willibald Schliemann, Jürgen Schmidt, Dieter Strack, and Michael H Walter. 2008. "RNA Interference-Mediated Repression of MtCCD1 in Mycorrhizal Roots of *Medicago truncatula* Causes Accumulation of C27 Apocarotenoids, Shedding Light on the Functional Role of CCD1." *Plant Physiology* 148 (3): 1267–82. doi:10.1104/pp.108.125062.
- Floss, Daniela S, and Michael H Walter. 2009. "Role of Carotenoid Cleavage Dioxygenase 1 (CCD1) in Apocarotenoid Biogenesis Revisited." *Plant Signaling & Behavior* 4 (3): 172–75. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2652522&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Gayen, Dipak, Nusrat Ali, Sailendra Nath Sarkar, Swapan K. Datta, and Karabi Datta. 2015. "Down-Regulation of Lipoxygenase Gene Reduces Degradation of Carotenoids of Golden Rice during Storage." *Planta* 242: 353–363. doi:10.1007/s00425-015-2314-4.
- Lashbrooke, Justin G, Philip R Young, Samantha J Dockrall, Krishnan Vasanth, and Melané A Vivier. 2013. "Functional Characterisation of Three Members of the *Vitis Vinifera* L. Carotenoid Cleavage Dioxygenase Gene Family." *BMC Plant Biology* 13 (156). doi:10.1186/1471-2229-13-156.
- Ma, Juanjuan, Jing Li, Jianbo Zhao, Hui Zhou, Fei Ren, Lu Wang, Chao Gu, Liao Liao, and Yuepeng Han. 2014. "Inactivation of a Gene Encoding Carotenoid Cleavage Dioxygenase (CCD4) Leads to Carotenoid-Based Yellow Coloration of Fruit Flesh and Leaf Midvein in Peach." *Plant Molecular Biology Reporter* 32 (1): 246–57. doi:10.1007/s11105-013-0650-8.
- Ortiz, Darwin, Torbert Rocheford, and Mario G Ferruzzi. 2016. "Influence of Temperature and Humidity on the Stability of Carotenoids in Biofortified Maize (*Zea Mays* L.) Genotypes during Controlled Post-Harvest Storage." *Agricultural and Food Chemistry* 64 (13): 2727–36. doi:10.1021/acs.jafc.5b05698.
- Pfeiffer, Wolfgang H., and Bonnie McClafferty. 2007. "HarvestPlus: Breeding Crops for Better Nutrition." *Crop Science* 47 (SUPPL. DEC.). doi:10.2135/cropsci2007.09.0020IPBS.
- Pixley, Kevin V., Natalia Palacios-Rojas, and Raymond P. Glahn. 2011. "The Usefulness of Iron Bioavailability as a Target Trait for Breeding Maize (*Zea Mays* L.) with Enhanced Nutritional Value." *Field Crops Research* 123 (2). Elsevier B.V.: 153–60. doi:10.1016/j.fcr.2011.05.011.
- Schaub, Patrick, Florian Wüst, Julian Koschmieder, Qiuju Yu, Parminder Virk, Joe Tohme, and Peter Beyer. 2017. "Nonenzymatic β -Carotene Degradation in Provitamin A-Biofortified Crop Plants." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65 (31): 6588–98. doi:10.1021/acs.jafc.7b01693.
- Tuan, Pham Anh, and Sang Un Park. 2013. "Molecular Cloning and Characterization of cDNAs Encoding Carotenoid Cleavage Dioxygenase in Bitter Melon (*Momordica Charantia*)." *Journal of Plant Physiology* 170 (1). Elsevier GmbH.: 115–20. doi:10.1016/j.jplph.2012.09.001.
- Velu, Govindan, Jose Crossa, Ravi P. Singh, Yuanfeng Hao, Susanne Dreisigacker, Paulino Perez-Rodriguez, Arun K. Joshi, et al. 2016. "Genomic Prediction for Grain

- Zinc and Iron Concentrations in Spring Wheat.” *Theoretical and Applied Genetics* 129 (8). Springer Berlin Heidelberg: 1595–1605. doi:10.1007/s00122-016-2726-y.
- Vishnevetsky, Michael, Marianna Ovadis, and Alexander Vainstein. 1999. “Carotenoid Sequestration in Plants: The Role of Carotenoid- Associated Proteins.” *Trends in Plant Science* 4 (6): 232–35. doi:10.1016/S1360-1385(99)01414-4.
- Vogel, Jonathan T., Bao Cai Tan, Donald R. McCarty, and Harry J. Klee. 2008. “The Carotenoid Cleavage Dioxygenase 1 Enzyme Has Broad Substrate Specificity, Cleaving Multiple Carotenoids at Two Different Bond Positions.” *Journal of Biological Chemistry* 283 (17): 11364–73. doi:10.1074/jbc.M710106200.
- Yan, Jianbing, Catherine Bermudez Kandianis, Carlos E Harjes, Ling Bai, Eun-Ha Kim, Xiaohong Yang, Debra J Skinner, *et al.* 2010. “Rare Genetic Variation at Zea Mays CrtRB1 Increases Beta-Carotene in Maize Grain.” *Nature Genetics* 42 (4). Nature Publishing Group: 322–27. doi:10.1038/ng.551.

CAPÍTULO 1. RELACIÓN GENÉTICA DE LA ENZIMA DIOXIGENASA QUE ESCINDE CAROTENOS Y LA ESTABILIDAD DE CAROTENOS PROVITAMINA-A EN MAÍZ

1.1 RESUMEN

Las enzimas CCD's han sido involucradas con la escisión de carotenos en las etapas tempranas del desarrollo del grano. El objetivo planteado en este estudio fue determinar la relación de CCD1 y CCD4 con la cantidad de carotenos PVA en granos de maíz post-cosecha. Para ello se realizaron los siguientes experimentos: cuantificar el número de copias del gen de CCD1 en el genoma y sus transcritos en granos maduros de maíz biofortificado con PVA, relacionarlos con la estabilidad de carotenoides durante su almacenamiento y buscar polimorfismos en las secuencias de los genes de CCD1 y CCD4 que estén asociados con la estabilidad de los mismos compuestos. Los resultados mostraron genotipos que presentan baja cantidad relativa de ARN mensajero mientras que otros genotipos¹ presentan altas cantidades relativas de ARNm de CCD1. Además, las líneas con mayor cuantificación relativa del ARNm de CCD1 presente en la semilla, tienden a mayor degradación de β -criptoxantina y β -caroteno. El número de copias del gen CCD1 no se correlacionó con la mayor expresión de transcritos. Sin embargo, hubo correlación baja pero significativa del valor k de degradación de β -criptoxantina y la concentración de β -criptoxantina con el número de copias relativas del gen CCD1 en el genoma de las 42 líneas de maíz analizadas.

Asociaciones altamente significativas con valores log que sobrepasan el umbral se observaron entre el valor k de β -caroteno y SNPs de CCD4. Los valores k de β -caroteno de estas líneas fueron los más altos y forman parte del grupo de genotipos derivados de líneas con alelos mutantes para *LcyE* y/o *CrtRB1*. En este estudio se comprobó que la enzima CCD1 y CCD4 tienen un impacto sobre la estabilidad de carotenos PVA. Es necesario validar el efecto observado de estas regiones genómicas en la estabilidad de carotenos PVA, para poder proponer una alternativa en la selección molecular de genotipos con estabilidad de sus compuestos con actividad de PVA.

Palabras clave: CCD1, degradación, provitamina A, maíz.

1.2 INTRODUCCIÓN

Los genes, las enzimas y los compuestos intermediarios involucrados en la ruta de biosíntesis y catálisis de carotenos han sido estudiados a detalle en plantas y microorganismos por tener un impacto en la acumulación de carotenoides (Wurtzel, 2004; Paine *et al.*, 2005; Vogel *et al.*, 2008; Moise *et al.*, 2014; Zhai *et al.*, 2016; Tan *et al.*, 2017). Este conocimiento es de especial interés en el mejoramiento de plantas, ya que aunado al desarrollo de tecnologías como la selección asistida por marcadores moleculares, se ha aplicado con el fin de obtener alta calidad nutricional en cultivos (Yan *et al.*, 2010; Herjes *et al.*, 2008). Como ejemplo, el desarrollo de variedades con altas cantidades de compuestos que tienen actividad de provitamina A (PVA) se ha reportado por Bouis *et al.*, (2011) y Babu *et al.*, (2013) en cultivos básicos como maíz, camote (*Ipomoea batatas*) y yuca (*Manihot esculenta*). Adicionalmente, utilizando dicho conocimiento e ingeniería genética, se ha desarrollado el arroz dorado (Golden rice) que tiene alta concentración de PVA (Paine *et al.*, 2005).

La estabilidad de carotenoides PVA que son benéficos para los humanos, se ve afectada por la actividad normal de enzimas dentro del fruto o la semilla. Estas enzimas actúan de modo natural para la producción de distintos apocarotenoides que tienen función fisiológica o de desarrollo en la planta (Auldrige, McCarty, y Klee 2006; Kloer y Schulz 2006).

Las enzimas que producen apocarotenos son conocidas como dioxigenasas que escinden carotenos (CCD, del inglés carotenoid cleavage dioxygenases). Las CCDs poseen estructuras génicas bien conservadas y por lo tanto están presentes en especies vegetales, animales y microorganismos (Priya y Siva 2014). Incluso los miembros que conforman este grupo de enzimas han conservado a través del tiempo su centro activo. Esta estructura está formada por cuatro residuos de histidina y un ion Fe^{2+} y necesita O_2 para su activación (Kloer y Schulz 2006).

La enzima 9'-cis epoxicaroteno oxigenasa fue el primer miembro del grupo de las CCDs observado en un mutante vivíparo de maíz (gen VP14) con función catalizadora en la biosíntesis de la hormona ácido abscísico (Schawartz *et al.*, 1997). En *Arabidopsis thaliana* se conocen nueve miembros de la familia de las dioxigenasas. Cuatro CCDs nombradas como CCD1, CCD4, CCD7, CCD8 y cinco 9-cis epoxicarotenoide

dioxigenasas (NCEDs, del inglés 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase; Schwartz *et al.*, 2001). Recientemente en *Crocus sativus* se caracterizó otra enzima que participa en las primeras fases de desarrollo del color en la flor, nombrada como CCD2 (Frusciante *et al.* 2014).

Estudios sobre la CCD1 provienen principalmente de ensayos enzimáticos *in vitro* y de su expresión en bacterias. Las enzimas CCD1 escinden varios carotenoides lineales, monocíclicos y bicíclicos, independientemente de su estereoquímica y en varias posiciones a lo largo de la cadena de carbonos de diferentes especies (Floss *et al.*, 2008; Simkin *et al.*, 2004; Vogel *et al.*, 2008).

Se conoce que los sustratos de la enzima CCD1 se encuentran en los plastidios y las enzimas responsables para su síntesis se ubican en ese órgano (Cunningham y Gantt, 1998). Además en las paredes externas de los plastidios se pueden encontrar cantidades considerables de carotenoides (Markwell *et al.*, 1992), estando disponibles para la escisión de enzimas citolíticas como la CCD1 (Auldridge *et al.*, 2006).

La actividad catalítica de CCD1 también se ha observado en experimentos *in vivo*. En semillas maduras de *A. thaliana*, *Solanum lycopersicum* y petunia, cuando se suprimió el gen ortólogo de CCD1 se observó alta cantidad de contenido de carotenoides como β -caroteno (Auldridge *et al.* 2006; Simkin *et al.*, 2004).

La actividad catalítica de CCD1 se ha comprobado también en granos de maíz. Se observó que al inicio del desarrollo de los granos, existe relación negativa entre la cantidad de carotenos y cantidad de transcritos que codifican para la enzima CCD1 ((da Silva Messias *et al.* 2014; Vallabhaneni, Bradbury, y Wurtzel 2010). Los mismos autores observaron una correlación negativa estadísticamente significativa entre el número de copias de CCD1 en el genoma y el contenido de carotenoides (Vallabhaneni *et al.*, 2010). El gen CCD1 en el genoma de maíz está ubicado en el brazo largo del cromosoma 9. El set de copias del gen es un macro transposón que fue generado por dos transposones Tam3L. El macro transposón se ubica en la región 1.9 Mb cercano al CCD1r progenitor, el cual contiene de 1 a 23 copias (28 kb) repetidas en tándem del gen CCD1 y sus genes vecinos P450, Tglu y Rpl21 (Tan *et al.* 2017).

Aunque el locus de CCD1 se encuentra en el genoma de todos los maíces tanto blancos como amarillos, los fenotipos de endospermo blanco siempre presentan el alelo

dominante de este gen y por lo regular un set de copias del gen, por lo que resulta en una regulación negativa con respecto a la acumulación de carotenos (Tan *et al.* 2017). Además que tienen el alelo recesivo de *PSY*.

Suwarno *et al.*, (2015) realizaron un estudio de asociación del genoma completo (GWAS, del inglés Genome Wide Association Study) con ~476,000 polimorfismos de un nucleótido (SNP, del inglés Single Nucleotide Polymorphism) en un panel de 380 líneas de grano amarillo, donde buscaban regiones genómicas que controlaran la variación en la concentración de carotenoides en granos de maíz. Los autores observaron una relación entre CCD1 y la degradación de carotenoides. Una variante de CCD1 resultó en una baja degradación de β -criptoxantina en líneas de maíz anteriormente observadas por tener bajas tasas de degradación en PVA. Kandianis *et al.* (2013) y Owens *et al.* (2014) demuestran esta misma relación, sugiriendo que estas son potenciales regiones genómicas que se pueden usar como blanco para estabilizar los compuestos PVA dentro del grano de maíz.

En la búsqueda de una mejor estabilidad de los carotenoides PVA en el grano de maíz en esta investigación se plantearon como objetivos: a) cuantificar el número de copias del gen de CCD1 en el genoma y sus transcritos en granos maduros de maíz biofortificado con PVA, b) relacionarlos con la estabilidad de carotenoides durante su almacenamiento y c) buscar polimorfismos en las secuencias de los genes de CCD1 y CCD4 que estén asociados con la estabilidad de los mismos compuestos.

1.3 MATERIALES Y METÓDOS

En laboratorio se germinaron semillas para obtener tejido fresco de hoja de los genotipos usados en la cuantificación del número de copias del gen CCD1 y la secuenciación de los genes de CCD1 y CCD4 (Cuadro 1). Para la obtención del grano de maíz usado en la expresión relativa del gen CCD1 y en la determinación de la pérdida de carotenoides (Cuadro 1) las líneas de maíz se sembraron en la estación experimental en Agua Fría, Puebla, México (20° 32' N; lat.110 msnm; temperatura anual 22° C; promedio de precipitación anual 1200 mm) durante el ciclo de primavera-verano del 2014. Las condiciones agronómicas de irrigación, fertilización, control de plagas y malezas se realizaron siguiendo las prácticas estándar de la región. Los mazorcas

autofecundadas fueron cosechadas, desgranadas y almacenadas inmediatamente en cuarto frío a 4°C hasta su uso.

1.3.1 Determinación de la pérdida de carotenoides durante el almacenamiento.

1.3.1.1 Experimento de degradación.

El material experimental se dividió en 5 sobres de 50 semillas cada uno para realizar el experimento de degradación. El experimento consistió en almacenar las muestras de maíz a temperatura entre 22° y 25°C, sin incidencia de luz solar por cinco periodos de tiempo (0, 2, 4, 8 y 16 semanas). Al término de cada período (tratamiento), las muestras se guardaron a -80°C hasta el momento de la extracción del ARN (ácido ribonucleico) y la cuantificación de carotenos.

1.3.1.2 Extracción de carotenoides y cuantificación por UPLC.

Durante todo el proceso de extracción se trabajó usando luz amarilla para reducir la degradación de los carotenoides. Se molieron 30 semillas por muestra en un molino Cyclotec 1093 (Tecator, Sweden), para obtener un tamaño de partícula de 0.5 mm. Se tomaron 600 mg de harina por muestra para iniciar la extracción de carotenos según el método descrito por Palacios-Rojas (2018). El procedimiento de extracción de carotenos inició añadiendo 6 ml de etanol con 0.1% de butilhidroxitolueno (BHT), se agitó en vórtex y se incubó a 85° C por 5 min. Enseguida se añadieron 500 µL de hidróxido de potasio para saponificar las muestras y se incubó nuevamente a 85° C por 10 min. Al término de la incubación se mantuvieron en hielo. Se añadieron 3 ml de agua desionizada, 3 ml de hexano y 200 µL de apocaroteno (β -apo-8'-carotenal) como control interno. Después de centrifugar a 2095 rcf durante 3 min, se extrajo el supernadante. Después de 3 extracciones (3 ml de hexano – vórtex – centrifuga) se evaporó el hexano con un sistema de evaporación al vacío (Speed Vac) y el extracto seco se reconstituyó en solución de 500 µL metanol:1,2-dicloroetano (50:50). La solución anterior se filtró en acrodiscos de 0.22 µm y se colocó el filtrado en viales debidamente etiquetados. De esta suspensión, se tomó una alícuota de 20 µl y se inyectó en el sistema de UPLC. Se utilizó una columna

Acquity UPLC BEH C8, 1.7 μm 2.1 x 100 mm (Waters Chromatography, Milford, MA) con flujo de 0.3 ml min^{-1}

Las fases móviles A y B fueron: Acetato de amonio 10 mM en una mezcla de agua/isopropanol (90:10) y Acetonitrilo/isopropanol (90:10), respectivamente. Los espectros de carotenoides se escanearon a 300-498 nm y los datos fueron colectados y procesados usando el *software* Waters Millennium 2010 (Waters Chromatography). Los carotenos cuantificados fueron luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, β -caroteno y sus isómeros 9-cis y 13-cis β -caroteno los cuales se identificaron por la comparación de los estándar conocidos, tiempos de retención y picos espectrales característicos.

Se hizo una curva de calibración con estándares de luteína, zeaxantina, β -caroteno y β -criptoxantina. La preparación de cada estándar se hizo con 5 ml de 2-propanol y se leyó cada uno en espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm de absorbancia, para determinar la concentración inicial.

Paralelamente al proceso de extracción, se determinó la humedad a cada muestra por termo balanza que se midió como la pérdida de peso al secado. Se utilizaron 500 mg de harina para el análisis (Palacios-Rojas, 2018).

1.3.1.3 Cálculos para la concentración de carotenoides.

De la curva de calibración se obtuvo la ecuación de la recta característica para cada carotenoide. Por lo tanto, la concentración para cada uno estuvo dada por la siguiente fórmula:

$$C \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right) = \frac{m * \text{Area} \pm b * F}{W} * \frac{1}{1000}$$

Dónde: C= concentración de cada carotenoide $\mu\text{g g}^{-1}$ de muestra en base húmeda; m = pendiente de la recta característica del carotenoide; Área = área de la muestra obtenida de la extracción de cada carotenoide; b = ordenada al origen de la recta característica; F = factor (el cual puede incluir diluciones); 1/1000 = factor para convertir ng g^{-1} a $\mu\text{g g}^{-1}$.

$$F = V_r / V_{\text{inyec}}$$

Dónde: V_r = volumen de reconstitución (500 μ L); V_{inyec} = volumen de inyección (2 μ L).

Posteriormente se realizó la corrección de la concentración, dividiendo la concentración obtenida (C) entre la eficiencia de la extracción (EE), para obtener la concentración de cada carotenoide en base húmeda. Se hicieron los cálculos con los datos de humedad para reportar en base seca. Para determinar la EE de los carotenoides se agregó a cada muestra 200 μ L de apocaroteno. Y se comparó el área de ésta y la resultante de la inyección de 0.8 μ L de apocaroteno puro.

Se determinó el contenido de PVA con el siguiente cálculo:

Provitamina A (μ g g^{-1})= 0.5*Contenido de β -criptoxantina + Contenido de 9-Cis β -caroteno + Contenido de 13-cis β -caroteno + Contenido de β -caroteno (Palacios-Rojas, 2018).

1.3.1.4 Tasa de degradación de carotenoides.

Se utilizó un modelo de cinética de primer orden para describir la degradación de carotenoides en el maíz como el descrito por Ortiz *et al.* (2017) obteniendo la constante k de degradación bajo la siguiente fórmula: $\ln(X/X_0) = -kt$; dónde: X es la concentración del carotenoide en el tratamiento (t), y X_0 es la concentración inicial del carotenoide.

1.3.2 Expresión relativa del gen CCD1 en granos de maíz maduros.

1.3.2.1 Extracción de ARN.

Se esterilizó en autoclave el material de laboratorio usado en el experimento y se hizo una re-esterilización con calor seco a 95°C durante 48 h, para dejarlo libre de ARNsas. El agua empleada para la preparación de las soluciones se trató por una noche con dietil pirocarbonato (DEPC, del inglés diethyl pyrocarbonate) al 0.1% (v/v) y se re-esterilizó en autoclave. Para la extracción de ARN total, se utilizaron aproximadamente 50 mg de endospermo córneo de maíz. La muestra de endospermo se cortó con tijera, depositando el tejido en tubo Ependorff de 2 ml. Se molió cada muestra en TissueLyser II (Qiagen, Valencia, CA) por 2 min con frecuencias de oscilación de 28 s^{-1} . Dos ml de fenol grado analítico y 2 ml de la solución de extracción (LiCl 100 mM, Tris-HCl 100 mM $ph=9$, SDS 1%, EDTA 10mM) se calentaron a 80° C para permitir su mezcla. En seguida

se adicionaron 400 μl de dicha mezcla a cada tubo con tejido, agitando suavemente hasta disolver. Posteriormente se incubaron los tubos por 5 min a 37°C con agitación constante. Se agregaron 200 μl de cloroformo y se incubaron nuevamente en iguales condiciones de temperatura y agitación. Por último, las muestras se centrifugaron a 18,407 rfc durante 15 min para separar las fases, recuperando la fase acuosa superior en un tubo Ependorff limpio. Se midió el volumen recuperado y se adicionó 1/3 de cloruro de litio 8 M para precipitar el ARN. Después de incubar por 10 horas a 4°C , se centrifugaron las muestras a 9,391 rcf, se retiró el sobrenadante y el ARN colectado se re-suspendió en agua DEPC y se guardó a -20°C .

1.3.2.2 Cuantificación y calidad de ARN total.

La concentración del ARN total se midió por absorbancia en un espectrofotómetro NanoDrop 8000 (Thermo Fisher Scientific, USA), a una longitud de onda de 260 nm, tomando en cuenta que una unidad de A_{260} equivale a $40 \mu\text{g ml}^{-1}$ de ARN. Se estimó el índice de pureza del ARN extraído haciendo lecturas a 260 y 280 nm, y se obtuvo el cociente A_{260}/A_{280} . Valores cercanos a 1.8 -2 indican una baja contaminación de ADN en la muestra. Se migró el ARN total en gel de agarosa bajo condiciones desnaturalizantes, para determinar su integridad. El procedimiento para cada muestra fue el siguiente: se tomó 1 μg de ARN total disuelto en 6 μl de agua-DEPC y se mezcló con 19.2 μl de la mezcla desnaturalizante preparada con 12.5 μl de formamida, 4.0 μl de formaldehído (37%), 2.5 μl de MAE 10x (MOPS 200 mM, acetato de sodio trihidratado 50 mM, EDTA disódico 10 mM, pH 7.0 ajustado con KOH). Además se adicionó 0.2 μl de bromuro de etidio (10 mg ml^{-1}) a cada muestra. Cada muestra se desnaturalizó a 65°C por 5 min e inmediatamente se incubó en hielo por 5 min, previo a la aplicación de 25 μl en un gel de agarosa al 1.2% (p/v). El gel se preparó homogenizando con calor 42.3 ml de agua-DEPC y 0.6 g de agarosa Nusieve (FMC, Rockland, NY, USA). Se añadieron 5 ml de MAE 10x y se bajó la temperatura hasta 55°C . Una vez fría la muestra se añadieron 2.7 ml de formaldehído (37%). La mezcla se vació en un molde de electroforesis previamente limpio con NaOH 0.4 M y enjuagado con agua-DEPC. Se dejó solidificar el gel dentro de una campana de extracción por 30 min antes de cargar las muestras. Se usó MAE 1x como amortiguador de migración. Las muestras se migraron a una corriente constante

de 75 V por 1.5 h. El ARN se consideró de buena calidad y sin degradación si las bandas del ARN ribosomal fueron nítidas y si no presentaron barridos. La documentación del gel se hizo con el paquete Kodak 1D *Image Analysis Software* (New Haven, CT, USA).

1.3.2.3 Síntesis del ADN complementario (ADNc).

Para eliminar la posible contaminación con ADN genómico de las extracciones de ARN, se tomó 1 µg del ARN total y se mezcló con 1 µl de DNasa I Amp Grade (1 U µl⁻¹) y agua-DEPC para tener un volumen final de 8 µl. Esta alícuota se incubó 15 min a temperatura ambiente. En seguida se adicionó 1 µl de EDTA 25 mM para detener la reacción de la ADNasa. Se usó el protocolo de oligo (dT) para PCR tiempo real (Invitrogen™ LS18418012 USA) para la síntesis del ADNc. El protocolo incluyó la adición de 1 µl de dNTP (10 nM), 0.5 µg de oligo (dT) y la incubación a 65°C por 10 min para al final incubar 1 min en hielo. La función del oligo (dT) es unirse a la cadena poli A del ARN para preparar la síntesis de la cadena complementaria. En seguida se agregó 1 µl de retro-transcriptasa reversa (Superscript™ II RT; 50 U) y se incubó a 42° C por 50 min en presencia de 2 µl de buffer RT 10X, 4 µl 25 mM de MgCl₂, 2 µl 0.1 M de DTT, 1 µl de ARNasa OUT™ (40 U/II) y agua (libre de nucleasas) para la formación del ADNc. La reacción se detuvo a 70°C por 15 min. Como último reactivo, se añadió ARNasa-H e incubó por 15 min a 37°C para eliminar ARN residual. Esta reacción se guardó a -20° C hasta su uso.

Se amplificó el gen “Actina1” de maíz para verificar la integridad del ADNc sintetizado (accesión J01238 NCBI). Los iniciadores se denominaron Actf2 (5'-CCTGAAGATCACCCCTGTGCT-3') y Actr2 (5'-GCAGTCTCCAGCTCCTGTTC-3'; Hernández-Rodríguez, 2003). La reacción se hizo añadiendo 1 µl de ADNc, 2 µl /2 µM de cada uno de los iniciadores Actf2 y Actr2, y 5 µl de REDTaq (Sigma R-2648, USA).

1.3.2.4 Cuantificación de transcritos de CCD1.

Se usaron oligonucleótidos específicos nombrados ccd1F (5'-CTGGAGAAGAAGATGACGGCTAT-3) y ccd1R (5'-AGGCATGGAATCCATAAGGAAC-3') (ID en gene bank DQ100347; Vallabhaneni *et al.* 2010). La mezcla de reacción de la PCR se preparó con 7.5 µl de iQTM SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA), 2

µl 2 µM de cada uno de los iniciadores de CCD1 (hacia delante y reverso), 2 µl del ADNc y 2.5 µl de agua para tener un volumen total de 14 µl. Las condiciones de reacción incluyeron una incubación inicial de 95° C por 3 min, seguida de 45 ciclos de 95° C por 30 s, 58.5° C por 30 s y 72° C por 45 s, además de un tiempo final de elongación por 5 min a 72° C. El proceso se llevó a cabo en tiempo real en un termociclador con un sistema de detección fluorescente (Bio-Rad CFX96™). El análisis de datos fue hecho en el *software* CFX Manager™, versión 3.1 (Bio-Rad) del mismo aparato. Se calcularon las cantidades relativas del ARN mensajero (ARNm) del gen en base del valor del ciclo umbral (Ct) de cada muestra y extrapolando en la pendiente de la curva estándar obtenida a partir de la dilución seriada de una muestra de maíz control.

1.3.3 Cuantificación del número de copias del gen CCD1 en el genoma.

Se aisló ADN genómico de tejido liofilizado de hoja de maíz por el método bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB, del inglés cetyl trimethyl ammonium bromide; protocolos CIMMYT, 2005). El ADN obtenido se limpió después de la precipitación con acetato de sodio (NaOAc) e isopropanol. Un segundo lavado se hizo con etanol (ETOH) al 75% y se resuspendió en TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM). El rendimiento, la pureza y la calidad del ADN se determinaron mediante la cuantificación por Quantifluor, la cuantificación por Nanodrop 8000 y se visualizó el ADN en geles de agarosa.

Las condiciones de PCR, mezcla de reacción y el programa térmico se prepararon de acuerdo con el protocolo descrito por Vallabhaneni *et al.*, (2010) con una modificación en la concentración de los oligonucleótidos de CCD1. Las secuencias específicas de genes para CCD1 fueron ccd1F (5-CTGGAGAAGAAGATGACGGCTAT-3) y ccd1R (5'-AGGCATGGAATCCATAAGGAAC-3') (ID en gene bank DQ100347; Vallabhaneni *et al.*, 2010). Para normalizar² los valores del número de copia del gen CCD1, se utilizó como control la fitoeno desaturasa (PDS) por caracterizarse en tener una única copia del gen en el genoma de maíz. Los oligonucleótidos de PDS fueron pdsF (5-GAAATCATCGATGCAACTATGGAA-3) y pdsR (5'-CTTCGATAGGTGACCTTTGGA-3')

² En la PCR en tiempo real es necesario usar genes de expresión constante para la cuantificación de genes problema.

(ID L39266 Vallabhaneni *et al.*, 2010). Se amplificaron ambos genes en cada muestra y se calcularon los valores de ΔCt ($\Delta Ct = \text{Control Ct} - \text{Objetivo Ct}$) para obtener la cantidad relativa de número de copias del gen CCD1.

La mezcla de reacción para la PCR-TR fue preparada para obtener un volumen final de 20 μl , la cual contenía 10 μl IQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad 170-8882), 2 μl de cada uno de los iniciadores (1.0 μM), 4 μl de agua grado PCR y 2 μl del ADN (10 ng μl^{-1}). El ciclo térmico se llevó a cabo en un termociclador con un sistema de detección fluorescente (Bio-Rad CFX96™). Las condiciones térmicas de la reacción incluyeron un ciclo inicial a 94°C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 95°C por 10 sec, 58°C por 35 sec y 72°C por 10 sec. El análisis de los datos se realizó con el *software* CFX Manager™, versión 3.1 (Bio-Rad).

1.3.4 Secuenciación de los genes de CCD1 y CCD4.

1.3.4.1 Extracción ADN y re-secuenciación.

El ADN genómico fue aislado de los genotipos de maíz de acuerdo con la técnica de CTAB (Protocolos CIMMYT, 2006). Las muestras de ADN fueron cuantificadas usando el espectrofotómetro NanoDrop 8000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE) y la calidad se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y calculando el coeficiente de absorbancia de A_{260}/A_{230} y A_{260}/A_{280} .

Las librerías de secuenciación del gen CCD1 para cada muestra de maíz fueron generadas con 1 μg de ADN genómico usando el kit Nextera DNA Library Prep (Illumina San Diego CA, USA). El genotipo B73 se utilizó para fabricar el ADN cot³. La preparación de la muestra, adaptadores y secuenciación fueron realizados según el protocolo de Illumina Paired-end y los datos de secuenciación fueron generados en la plataforma HiSeq (Illumina San Diego CA, USA) con una cobertura media de 300x.

Características genómicas de los genes:

CCD1 Cromosoma 9; *ccd1/wc1*- chr9:155,236,300-155,242,260; 5,960 pb ADN genómico; Accesoión DQ100347 NCBI.

³ El ADN cot bloquea las secuencias de ADN repetitivas y evita la hibridación no específica. Esta hibridación cruzada dificulta la identificación de genes.

CCD4 Cromosoma 4; nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase6- chr4:162,737,219-162,739,449; 2,230 pb ADN genómico; accesión NC_024462.2 NCBI.

1.3.4.2 Control de calidad de las secuencias genómicas de CCD1 y CCD4.

Se empleó la herramienta “FastQC versión 0.11.5” que ofrece una impresión de la calidad de los archivos crudos (.bam). Las tablas y gráficas en archivos .html para cada línea de maíz se adjuntan en el archivo nombrado FastQC_all.zip. Además, se realizó un análisis de calidad de secuencias del conjunto de líneas de maíz mediante “bamtools stats” (comandos se encuentra en el archivo bam_stats.txt).

1.3.4.3 Alineamiento con el genoma de referencia.

Se emplearon comandos de distintos *software* en el lenguaje de programación UNIX System V (August 2000). Inicialmente se hizo una alineación con el genoma de referencia *Zea mays* B73 versión 4 (www.maizgedb.org) previamente indexado, para acelerar la búsqueda de los algoritmos de alineamiento, usando el *software* “BWA v0.7.12” (Li, 2013). BWA se basa en la transformada de Burrows Wheeler para mapear secuencias muy parecidas al genoma de baja divergencia. Se obtuvieron ficheros de alineamiento independientes los cuales se ordenaron, filtraron e indexaron con el *software* “Samtools” (Li *et al.* 2009; www.htslib.org). Con “Picard tools” (<http://picard.sourceforge.net/>) se marcaron lecturas duplicadas que se hubiesen generado durante la PCR. El marcado de los duplicados asegura que en el llamado de variantes no se tomen en cuenta y se minimicen los errores. El conjunto de comandos se encuentra en el archivo alineamiento.txt

1.3.4.4 Localización de variantes en la secuencia de CCD1 y CCD4.

Usando el comando “UnifeidGenotyper” del *software* GATK (Genome analysis toolkit versión 3.4; McKenna *et al.*, 2010) se localizaron las variantes. Se generaron tres archivos de formato de localización de variantes (VCF, del inglés variant calling format) que contienen variantes de tipo SNP e Indel de todas las líneas de maíz dentro de las regiones genómicas de interés (CCD1 y CCD4). Los archivos VCF fueron filtrados con un puntaje mínimo de calidad ≥ 30 similar al enfoque de Chia *et al.* (2012). Los

comandos se encuentra en el archivo variantcalling.txt y los archivos crudos se nombraron como GATK_ccd1.vcf y GATK_ccd4.vcf.

1.3.4.5 Anotación de variantes en la secuencia de CCD1 y CCD4.

Se usó la herramienta “snpEff” versión 4.3r (Cingolani, 2012) para revelar información relevante de las variantes genómicas detectadas. Este paquete usa bases de datos públicas para interpretar las variantes, proporcionando información de la ubicación de la variante en el gen (ej. exón, intrón, “splicing”, UTR, “upstream”, “downstream”, región intergénica), en cuántos y en cuál transcrito aparece dicha variante, tipo de variante (sinónima, Transiciones = Ts; no-sinónima, transversiones =Tv) el cambio de aminoácido que produce, etc. Ts son los cambios entre purinas o pirimidinas A <-> G y C <-> T y es esperado que ocurra dos veces más que las Tv que son los cambios de purina a pirimidina y viceversa A <-> C, A <-> T, G <-> C o G <-> T. En regiones que codifican proteínas, la relación Ts / Tv es típicamente más alta (en humanos más alta que 3). La alta relación se da cuando la mutación ocurre en la tercera base de un codón generando que la Tv cambie el aminoácido codificado (Morton, 2003). Los comandos se encuentra en el archivo anotaciones_ANN.txt

1.3.4.6 Alineamiento múltiple de secuencias de CCD1 y CCD4.

El algoritmo UPGMA (del inglés Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages) del *software* clustalW 2.0 (Larkin *et al.* 2007) fue usado a fin de relacionar las secuencias de los dos genes (CCD1 y CCD4) más similares de las cuarenta y dos líneas de maíz, de modo progresivo hasta llegar a las más diferentes de acuerdo al orden dictado por el árbol guía (alineamientos por parejas).

1.3.4.7 Análisis de asociación.

La asociación de los valores *k* de degradación y la secuencia de cada enzima CCD1 y CCD4, se efectuó en el *software* “Plink v1.07” (Purcell *et al.*, 2007). La asociación utilizó valores asintóticos -prueba de razón de verosimilitud y prueba de Wald, esta última basada en la distribución T- y de significación empírica. Además, se complementó con un procesamiento de permutación de datos para generar niveles de significancia

empírica que son propiedades deseables cuando se trabaja con tamaños de muestra pequeños, aumentando la confiabilidad de los resultados. Comandos usados en la metodología se alojan en la carpeta complementaria de forma individual.

1.4 RESULTADOS

1.4.1 Contenido y proporción de carotenoides en los granos de maíz.

El promedio de la concentración total de carotenos presentes en las cuarenta y dos líneas de maíz es de $29.44 \mu\text{g g}^{-1}$ ps (peso seco), con intervalo de $5.83 \mu\text{g g}^{-1}$ ps a $61.56 \mu\text{g g}^{-1}$ ps. En general, el contenido total de carotenos en mayor proporción se presenta mayor en zeaxantina (33.13%), seguido de β -criptoxantina (27.08%), β -caroteno (17.37%), luteína (13.39%) 9cis β -caroteno (4.53%) y 13cis β -caroteno (4.47%; Figura 1.1, Cuadro 1.7). Estudios previos realizados con maíces biofortificados muestran variaciones en las proporciones de carotenos y un mayor porcentaje de β -caroteno con respecto a los demás carotenoides (Taleon *et al.* 2017; Ortiz, Rocheford, y Ferruzzi 2016; Muzhingiri *et al.* 2016). Las proporciones de carotenoides difieren en este estudio principalmente porque la mitad de los genotipos evaluados hacen porte de los esfuerzos de mejoramiento enfocados al aumento de β -criptoxantina. Se hace notar que las líneas 11, 14, 15, 16, 19 y 47 presentan cantidades de β -criptoxantina hasta 19 veces más altas que β -caroteno (Cuadro 1.8).

Las líneas 24, 45 y 96 tienen las más altas concentraciones de β -caroteno, mientras que las líneas 16, 31 y 47 las más altas concentraciones de β -criptoxantina (Cuadro 1.8).

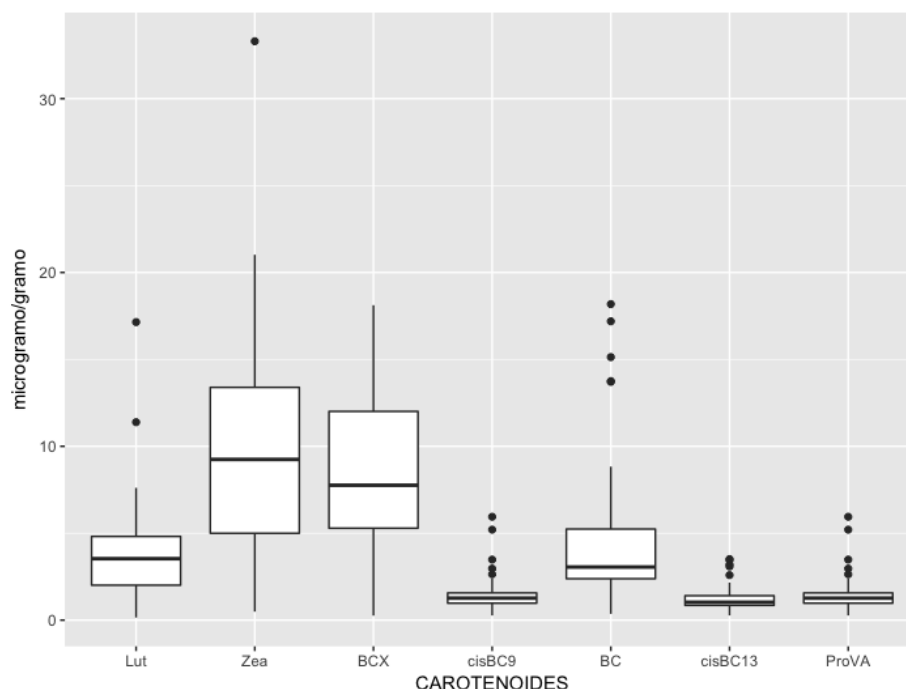


Figura 1.1 Diagrama de caja de los rangos y medias de la concentración de carotenoides de cuarenta y dos líneas de maíz analizadas. Lut = luteína; Zea = zeaxantina; BCX = β -criptoxantina; cisBC9 = 9cis β -caroteno; BC = β -caroteno; cisBC13 = 9cis β -caroteno; ProVA = Provitamina-A. Los puntos indican valores atípicos.

1.4.2 Degradación de carotenoides en los granos de maíz.

En promedio, las tasas de degradación de luteína y zeaxantina fueron menores a 0.008. Valores k de 0.02 para PVA, 0.024 para β -caroteno y 0.012 para β -criptoxantina fueron encontrados (Figura 1.2; Cuadro 1.7). Las tasas de degradación de PVA y β -caroteno son mucho mayores de las que se reportan en la literatura (Taleon *et al.*, 2017). Probablemente se deba a que las concentraciones de carotenoides aquí encontradas fueron mayores o por las condiciones de almacenamiento que también pudieron favorecer las tasas de degradación.

Valores k de degradación positivos y negativos se observaron para luteína, indicando que en algunos genotipos se perdió luteína y en otros hubo síntesis (figura xb). Es importante notar que las líneas 22, 27 y 44 son derivadas de líneas de maíz con el alelo mutante *LcyE*. Esta mutación inhibe la síntesis de los compuestos de la rama alfa de la ruta donde se encuentra la luteína. Sin embargo, estos tres genotipos presentaron aumento en la concentración de luteína después de dieciséis semanas de

almacenamiento. Naqvi *et al.* (2011) observaron que la sobre-expresión del gen *LcyB* no solo inducía altas cantidades de β -caroteno, sino que también se encontró un equilibrio en la cantidad de los compuestos como luteína y zeaxantina (de las rutas alfa y beta, respectivamente).

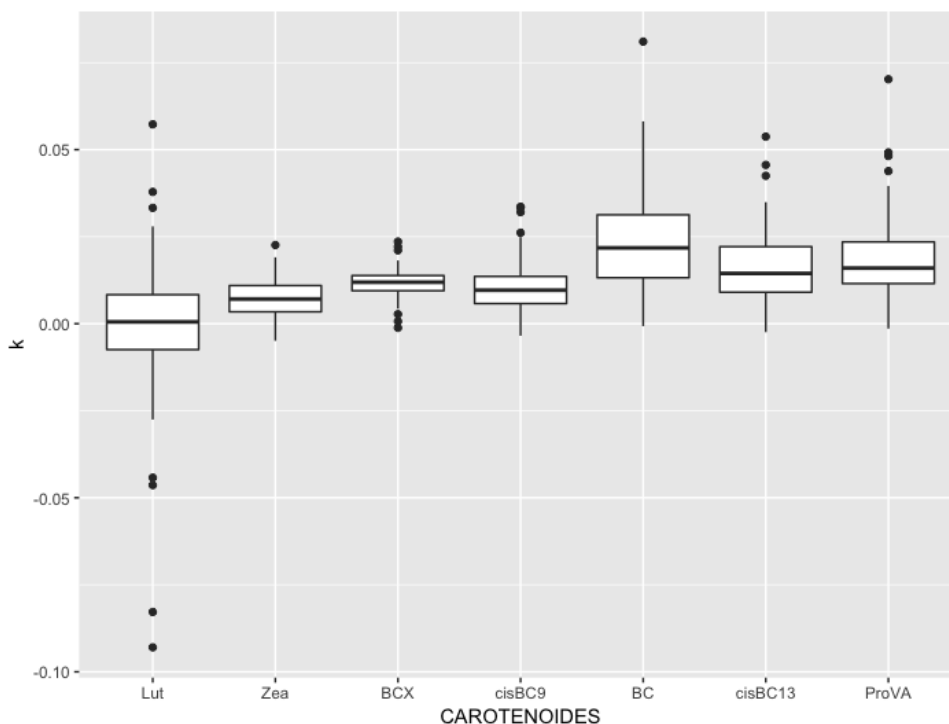


Figura 1.2 Diagrama de caja de los rangos y medias del valor k de degradación de carotenoides en las cuarenta y dos líneas de maíz analizadas. Lut= luteína; Zea= zeaxantina; BCX= β -criptoxantina; cisBC9= 9cis β -caroteno; BC= β -caroteno; cisBC13=9cis β -caroteno; ProVA= Provitamina-A.

No se observaron diferencias significativas entre los genotipos para los valores k de luteína, zeaxantina y β -criptoxantina. Y mientras que las líneas 27, 47 y 50 tuvieron las más bajas tasas de degradación para β -caroteno y PVA, las líneas 22, 24, 25, 44, 45 y 96 resultaron con muy altas tasas de degradación (Cuadro 1.9). Basados en el pedigrí, las líneas 24, 45 y 96 tienen uno o ambos alelos mutantes de *LcyE* y *CrtRB1* y por lo tanto tuvieron las más altas concentraciones de β -caroteno y PVA (PVA= 23.61, 20.22 y 21.03 $\mu\text{g g}^{-1}$ ps respectivamente; Cuadro 1.8).

Adicionalmente cabe notar que la línea 47 tuvo una concentración total de PVA de 9.08 $\mu\text{g g}^{-1}$ ps y 12.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ ps de β -criptoxantina, ocho veces más alta que β -caroteno

(Cuadro 1.8). La misma línea de maíz presentó los menores valores de k para β -caroteno y PVA 0.002 y 0.0008 respectivamente. Los valores k de degradación de luteína fueron negativos.

1.4.3 Correlaciones entre la degradación y concentración de carotenoides en los granos de maíz.

Correlaciones positivas y significativas se observaron entre la concentración de las xantofilas ($p>0.05$) y entre las concentraciones de PVA, β -caroteno y sus isómeros ($p>0.05$; Cuadro 1.1 abajo de la diagonal). Sin embargo, la correlación entre la concentración de β -criptoxantina y β -caroteno fue negativa y significativa ($p>0.05$), indicando que a mayor concentración de β -criptoxantina es menor la concentración de β -caroteno y viceversa (Cuadro 1.1 abajo de la diagonal).

Las correlaciones entre los valores k de zeaxantina y luteína fueron positivas y significativas, sugiriendo que la tendencia de degradación es en ambos carotenoides. De la misma forma sucede en PVA, β -criptoxantina, β -caroteno y sus isómeros, al disminuir la degradación de β -criptoxantina por ejemplo, también disminuye la degradación de β -caroteno y sus isómeros (Cuadro 1.1 arriba de la diagonal).

Cuadro 1.1 Correlación entre los valores k de degradación[‡] y entre las concentraciones de carotenoides[†] ($\mu\text{g g}^{-1}$) en las 42 líneas de maíz amarillo.

C [†] \ k [‡]	LUT	ZEAX	β -CX	13 cis β -C	β -C	9 cis β -C	PVA
LUT	1	0.74**	0.4**	0.21ns	-0.04ns	0.32*	0.17ns
ZEAX	0.89**	1	0.51**	0.24ns	0.12ns	0.31*	0.25ns
β -CX	0.62**	0.72**	1	0.41**	0.26ns	0.43**	0.47**
13 cis β -C	-0.13ns	-0.22ns	-0.39**	1	0.84**	0.87**	0.99**
β -C	-0.15ns	-0.28ns	-0.6**	0.78**	1	0.59**	0.85**
9 cis β -C	0.06ns	0ns	-0.12ns	0.86**	0.53**	1	0.85**
PVA	0.04ns	0.01ns	0.02ns	0.78**	0.53**	0.81**	1

‡Coeficientes de correlación entre valores k de degradación (k) de los carotenoides (arriba de la diagonal).
 †Coeficientes de correlación entre concentración de los carotenoides (C) presentadas en $\mu\text{g g}^{-1}$ (debajo de la diagonal). *,** significativa a $P < 0.05$ y $P < 0.01$, respectivamente; ns: no significativo. LUT= luteína; ZEAX= zeaxantina; β -CX= β -criptoxantina; β -C= β -caroteno; PVA= Provitamina-A.

Las correlaciones entre los valores k de β -criptoxantina y las concentraciones de β -criptoxantina, luteína y zeaxantina fueron positivas y significativas ($p > 0.05$), indicando que a mayores concentraciones de β -criptoxantina, luteína y zeaxantina, la degradación de β -criptoxantina también aumenta. Asimismo, se observó que cuando la concentración de PVA, β -caroteno y sus isómeros fue alta, también la degradación fue alta (Cuadro 1.2). También se hace notar que a mayores concentraciones de β -criptoxantina es menor la degradación de β -caroteno; y la degradación de PVA no fue significativa (Cuadro 1.2).

Cuadro 1.2 Correlación entre los valores k de degradación y concentraciones de carotenoides.

	LUT ^a	ZEAX ^a	β -CX ^a	13 cis β -C ^a	β -C ^a	9 cis β -C ^a	PVA ^a
LUT ^b	0.26ns	0.33*	0.26ns	0.11ns	-0.1ns	0.28ns	0.23ns
ZEAX ^b	0.12ns	0.23ns	0.18ns	0.03ns	-0.11ns	0.16ns	0.23ns
β -CX ^b	0.52**	0.51**	0.41**	0.24ns	0.07ns	0.41**	0.43**
13 cis β -C ^b	-0.05ns	-0.12ns	-0.3ns	0.89**	0.69**	0.83**	0.83**
β -C ^b	-0.12ns	-0.22ns	-0.52**	0.77**	0.91**	0.55**	0.63**
9 cis β -C ^b	0.07ns	0.02ns	-0.12ns	0.71**	0.39**	0.77**	0.72**
PVA ^b	-0.05ns	-0.12ns	-0.29ns	0.86**	0.69**	0.8**	0.84**

^a $\mu\text{g g}^{-1}$; ^b valor k ; *, ** significativo a $P < 0.05$ y $P < 0.01$, respectivamente; ns: no significativo. LUT= luteína; ZEAX= zeaxantina; β -CX= β -criptoxantina; β -C= β -caroteno; PVA= Provitamina-A.

1.4.4 Expresión genética de CCD1 en diferentes genotipos de maíz.

Resultados de la calidad y pureza de las muestras de ARN y ARNc se muestran en el material anexo a este *Capítulo* (Anexo 1.6.1). La cuantificación de transcritos se realizó en los granos de maíz muestreados en el experimento de degradación. Se seleccionaron once líneas de maíz que previamente habían sido identificadas por presentar alta o baja degradación (Cuadro 1). Se encontró que el efecto de genotipo fue la única fuente de variación altamente significativa según el ANOVA ($p < 0.01$; Cuadro 1.3). Las líneas 30, 33 y 47⁴ presentaron la menor cantidad relativa de ARN mensajero (ARNm), mientras

⁴ Línea 30= ((KUI409/SC55/KUI409)-S2-12-1-B-B)-B*4; Línea 33= ((DTPYC9-F65-2-3-1-1-B-BXDTPYC9-F65-2-2-1-1-B-B); Línea 47=([[[NAW5867/P30SR]-40-1/[NAW5867/P30SR]-114-2]-16-2-2-B-2-B/CML395-6]-B-20-1-B-3-#[[BETASYN]BC1-3-1-1-#/CML300)-3-3-2-B*4.

que los genotipos 31, 43 y 48⁵ presentaron las mayores cantidades relativas de ARNm de CCD1 (Figura 1.3; Cuadro 1).

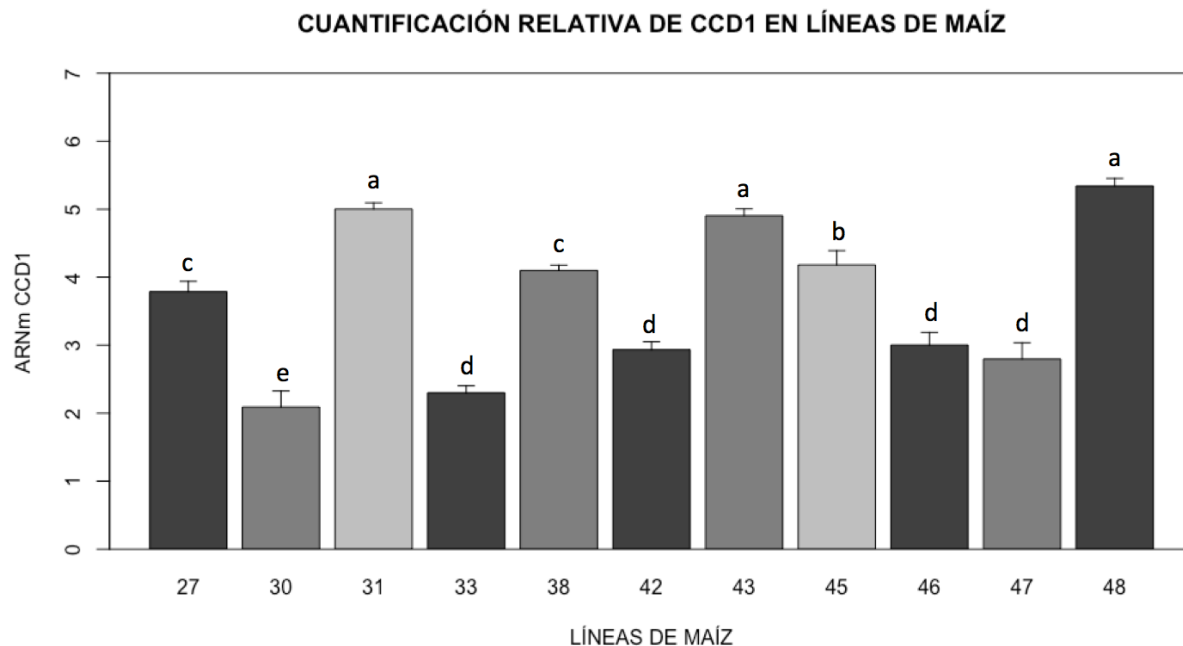


Figura 1.3 Expresión relativa del gen CCD1 en once líneas de maíz. Las letras representan el agrupamiento realizado en la comparación de medias (prueba de Fisher) del promedio de la expresión relativa de cada línea. Barras de error representan el error estándar de los mínimos cuadrados de la cuantificación de los transcritos.

Cuadro 1.3 Análisis de varianza de la cuantificación relativa del ARNm de CCD1 de once líneas de maíz.

	GL	Expresión relativa
Genotipo	10	13.95**
Repetición	11	0.34ns
Error	97	0.26

*,** significativo a $P < 0.05$ y $P < 0.01$, respectivamente; ns: no significativo.

⁵ Línea 31= (CML305/CML486)-8-1-1-B*6; Línea 43= MAS[206/312]-23-2-1-1-B-B-B/[BETASYN]BC1-9-3-1-1-2-B*6; Línea 48= (CML300/CML486)-7-2-1-B*4. (Cuadro 1).

1.4.5 Correlación entre el valor k de degradación de carotenos PVA y expresión relativa de CCD1

Aunque solo se hizo la correlación en once líneas de maíz, se encontró una correlación entre la cuantificación relativa de ARNm de CCD1 y el valor k de degradación de β -criptoxantina y k de β -caroteno ($r^2=0.80$, $p<0.01$; $r^2=0.70$, $p<0.05$ respectivamente) (Figura 1.5; Figura 1.5). Estos resultados muestran que líneas con mayor cuantificación relativa del ARNm de CCD1 presente en la semilla, tendieron a presentar mayor degradación de β -criptoxantina y β -caroteno.

La correlación de los valores k para luteína y zeaxantina con la expresión de transcritos de CCD1, presentó una correlación baja ($r^2=0.38$ y 0.45 , respectivamente; número de observaciones=11) y carecen de significancia estadística.

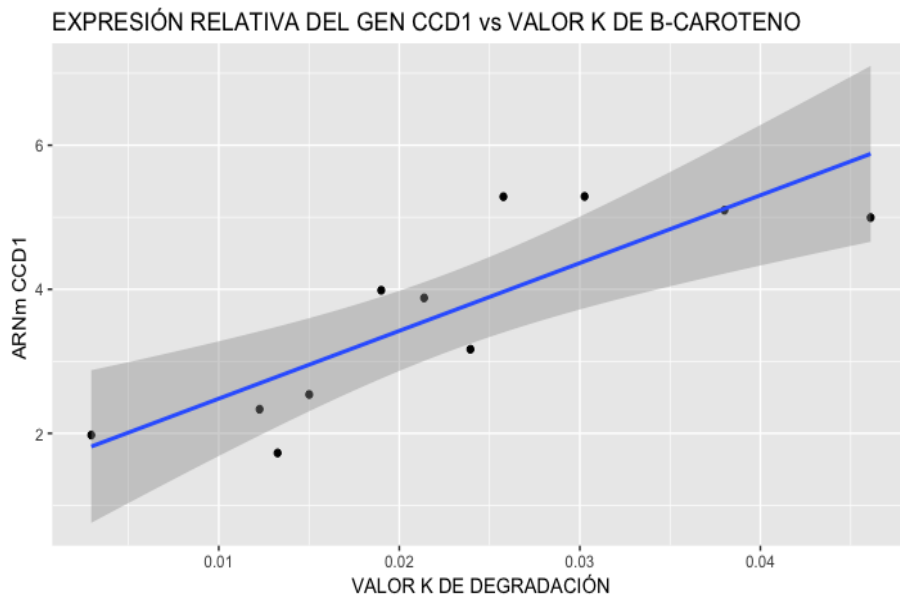


Figura 1.4 Diagrama de dispersión de la expresión relativa del gen CCD1 y el valor K de degradación de β -caroteno en once líneas de maíz.

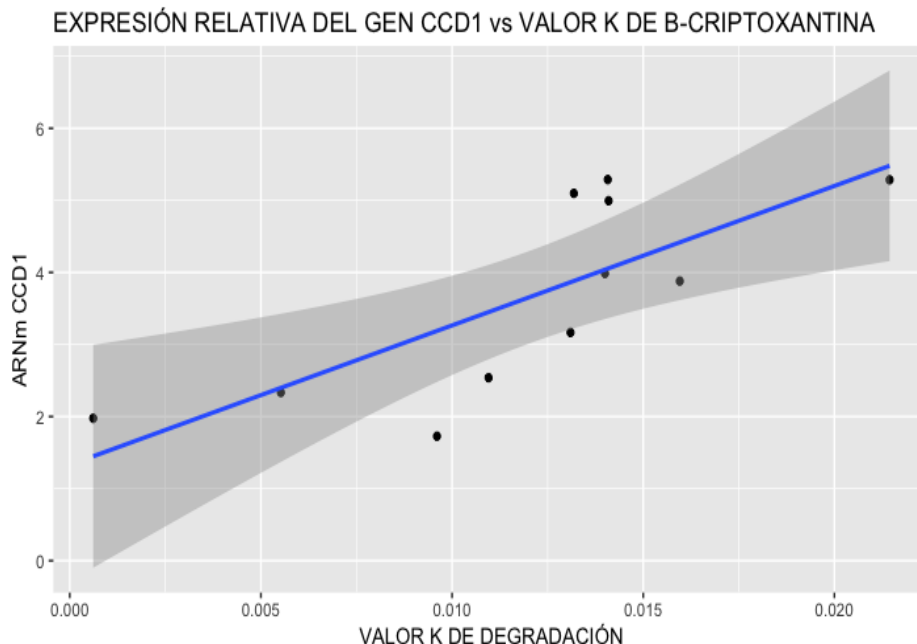


Figura 1.5 Diagrama de dispersión de la expresión relativa del gen CCD1 y el valor K de degradación de β -criptoxantina en once líneas de maíz.

1.4.6 Correlación del número de copias del gen CCD1, con la expresión de CCD1 y con el valor k de degradación de carotenos PVA.

Resultados de la calidad y pureza de las muestras de ADN para la obtención del número de copias del gen CCD1 se muestran en el material anexo (Anexo 1.6.3). Las líneas de maíz 12, 47 y 98⁶ presentaron más de una copia relativa del gen CCD1 en el genoma 1.27, 1.27 y 2.32, respectivamente.

La correlación entre el número copias del gen CCD1 y la expresión relativa del gen CCD1 en el genoma se realizó con once observaciones; aunque en la cuantificación del número de copias se usaron 42 observaciones, en la cuantificación de la expresión relativa del gen CCD1 solo se analizaron once líneas de maíz. El número de copias del gen CCD1 no se correlacionó con la mayor expresión de transcritos ($r^2 = -0.01$; $p > 0.05$; número de observaciones=11).

⁶ Línea 12 = B-CryptoxanthinSynF1-#-72-1-2-1-B; Línea 47 = ([[[NAW5867/P30SR]-40-1/[NAW5867/P30SR]-114-2]-16-2-2-B-2-B/CML395-6]-B-20-1-B-3-#[[BETASYN]BC1-3-1-1-#/CML300)-3-3-2-B*4; Línea 98 = CML537/[BETASYN]BC1-10-3-#-B*12. (Cuadro 1).

Sin embargo, hubo correlación baja pero significativa del valor k de degradación de β -criptoxantina y la concentración de β -criptoxantina con el número de copias relativas del gen CCD1 en el genoma de las 42 líneas de maíz analizadas (Cuadro 1.4).

Cuadro 1.4 Correlación del número de copias, con la expresión de CCD1 y con valor k de degradación de carotenos provitamina-A en cuarenta y dos genotipos de maíz amarillo.

Caroteno	Número de copias relativas	Número observaciones
PVA ^a	0.02 ^{ns}	42
PVA ^b	-0.09 ^{ns}	42
β C ^a	-0.09 ^{ns}	42
β C ^b	0.18 ^{ns}	42
β CX ^a	0.31 [*]	42
β CX ^b	0.31 [*]	42
Carotenos totales	0.12 ^{ns}	42

^a $\mu\text{g g}^{-1}$; ^b valor k degradación; *,** significativo a $p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente; ns: no significativo; β CX, β -criptoxantina; β C, β -caroteno; PVA, Provitamina-A.

1.4.7 Predicción del efecto de las variantes.

Después de comprobar los parámetros de buena calidad de las secuencias de las 42 líneas de maíz (Anexo 1.6.4) se analizaron las variantes en las secuencias genéticas de las dos enzimas evaluadas. Se encontraron 170 y 12 variantes en CCD1 y CCD4 que corresponden a 130 y 10 SNP, 27 y 0 inserciones y 13 y 2 deleciones, respectivamente. Mientras que la densidad de variantes en la secuencia de CCD4 en promedio fue de una variante por cada 185 nucleótidos, para CCD1 fue de 35 nucleótidos.

La relación de Transiciones (Ts)/ transversiones (Tv) fue cercano a 1.9 para CCD1 y para CCD4 la relación alcanzo los 2.5. Las variantes produjeron efectos de diferente *tipo*, en diferentes *regiones* del genoma (Cuadro 1.5). De acuerdo con “SnpEff”, la mayor variación para la secuencia de CCD1, se ubica en la región “UPSTREAM” del gen 63.8% y 27.9% en la región INTRONICA. “Upstream” se define como hasta 5 kilobases (kb) arriba del sitio de inicio de la transcripción. En la región EXONICA se observa un 4.4% de variantes. Aunque se registraron SNP dentro de la región codificadora pudiendo afectar la transcripción del gen, estos efectos son predictivos y por lo tanto necesitan de su validación. El *tipo* de variante presente en estas *regiones* es intrón (28.5 %),

“upstream” (63.1 %) y sinónimas (3.2 %). Algunos *tipos* de efectos pueden afectar *regiones* que tienen el mismo nombre.

En el caso de CCD4, el mayor efecto se presentó en la *región* INTERGÉNICA (40 %) seguida de la *región* “DOWNSTREAM” (25 %). “Downstream” se define como hasta 5 kb abajo del sitio final de la transcripción. Los *tipos* de variantes presente en estas *regiones* fueron *región* intergénica (40 %) y variante “downstream” (25 %).

Cuadro 1.5 Número de efectos de variantes por tipo y por *región* de las secuencias de CCD1 y CCD4 en las cuarenta y dos líneas de maíz.

Tipo	CCD1		CCD4	
	Conteo	Porcentaje	Conteo	Porcentaje
Variante en 3' UTR	23	2.40%	0	0%
Variante “downstream”	1	0.10%	5	25%
Región intergénica	0	0%	8	40%
Variante de intrón	272	28.50%	0	0%
Variante “missense”	13	1.30%	2	10%
Variante en la región “splice”	11	1.10%	0	0%
Variante sinónima	31	3.20%	2	10%
Variante “upstream”	601	63.10%	3	15%
Promedio	941	100%	20	100%
Región				
“DOWNSTREAM”	1	0.10%	5	25%
EXÓN	42	4.40%	4	20%
INTERGÉNICA	0	0%	8	40%
INTRÓN	263	27.90%	0	0%
Región del sitio “SPLICE”	11	1.10%	0	0%
“UPSTREAM”	601	63.80%	3	15%
UTR_3'	23	2.40%	0	0%
Promedio	941	100%	20	100%

UTR=región no traducida del gen; *variante “missense”*= es una variante de la secuencia que cambia una o más bases, lo que resulta en una secuencia de aminoácidos diferente pero donde se conserva la longitud; “*downstream*”= sitio de la secuencia hasta 5 kb aguas abajo del sitio final de la transcripción; “*Upstream*” = sitio de la secuencia hasta 5 kb aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción; “splice” = región de empalme de dos secuencias.

1.4.8 Polimorfismos en secuencias de CCD1 y CCD4 en líneas altas en PVA.

De acuerdo con el Cuadro 1.6, hay SNP significativos dentro del cromosoma 9 entre la posición 155,236,366 y la posición 155,237,652. La mayor asociación significativa ($p=0.004$) fue entre los valores k de β -criptoxantina y el SNP de la posición física 155,237,245.

También se observó una fuerte evidencia de asociación en la posición 155,237,537, el segundo SNP más significativo del cromosoma 9 y solo a unos 292 pb (pares de bases) de 9:155,237,245 ($r^2= 0.96$). Esta correlación sugiere que los dos SNPs y el fenotipo son parte del mismo bloque de haplotipos. Sin embargo, la visualización de los SNPs en el diagrama Manhattan refleja baja fuerza de asociación medida por log (Figura 1.6).

En la posición física 155,237,245 las líneas 8, 9, 17, 20, 25, 42 y 47 poseen el alelo alternativo (alelo de referencia= A; alelo alternativo= G) un cambio no sinónimo. Los efectos de los SNPs no sinónimos pueden generar un cambio en el aminoácido del alelo normal y por lo tanto un impacto en la función biológica de la proteína. Cabe destacar que las líneas 42 y 47 presentaron la menor expresión de transcritos de la enzima CCD1 (Figura 1.3). Por otro lado, las líneas 8, 9, 17 y 20 pertenecen al grupo de genotipos altos en β -criptoxantina y mostraron los menores valores de k PVA (Cuadro 1; Cuadro 1.8).

Cuadro 1.6 Análisis de asociación de k de degradación y polimorfismos en las secuencias de las enzimas CCD1 y CCD4.

Cromosoma	SNP- Posición física	R2	Wald test p-value*
----- CCD1 y β -criptoxantina -----			
9	155237245	0.1993	0.004389
9	155237537	0.197	0.004653
9	155237652	0.1417	0.01819
9	155236366	0.113	0.03638
9	155236441	0.1063	0.04282
----- CCD4 y β -caroteno -----			
4	162739320	0.5783	1.94E-08
4	162739288	0.5782	7.43E-08
4	162739403	0.4269	6.51E-06
4	162739407	0.4269	6.51E-06
4	162737341	0.6828	1.30E-05
4	162737360	0.6828	1.30E-05

*Predicciones y asociaciones estadísticas pueden ser incorrectas, por lo que los resultados de cualquier algoritmo de predicción deben ser analizados y validados de forma independiente mediante experimentos de laboratorio.

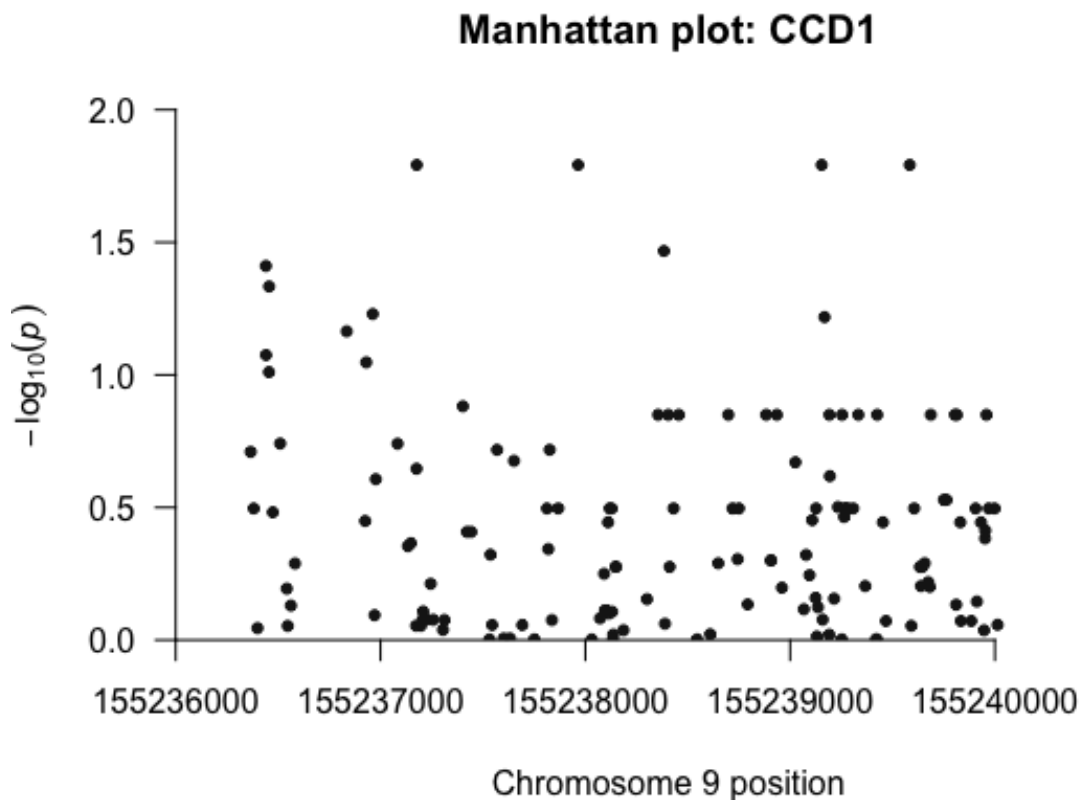


Figura 1.6 Diagramas Manhattan de la secuencia de la enzima CCD1. El eje x muestra las posiciones físicas de los SNP. El eje y muestra el log negativo de los valores P. Cada punto representando un SNP individual.

Asociaciones altamente significativas con valores log que sobrepasan el umbral se observaron en el cromosoma 4 entre el valor k de β -caroteno y SNPs de CCD4 de las posiciones 162,739,320 y 162,739,288 (Figura 1.7). Correlaciones medio-altas ($r^2= 0.57$; $p >0.01$) de desequilibrio de ligamiento (DL) se observaron para los SNPs en las mismas posiciones, lo que sugiere una probabilidad medio-alta de que los SNPs en cuestión están en DL con el SNP causal. En la posición física 162,739,320 del cromosoma 4, las líneas 24, 44 y 45 presentaron homocigosis para el alelo alternativo (alelo de referencia= A; alelo alternativo= G) un cambio no sinónimo. Los valores k de β -caroteno de estas tres líneas fueron los más altos y forman parte del grupo de genotipos derivados de líneas con alelos mutantes para *LcyE* y/o *CrtRB1*. Así mismo, el dendrograma para la secuencia

de CCD4 confirmó la alta homología genotípica de la secuencia entre estas tres líneas (Figura 1.8).

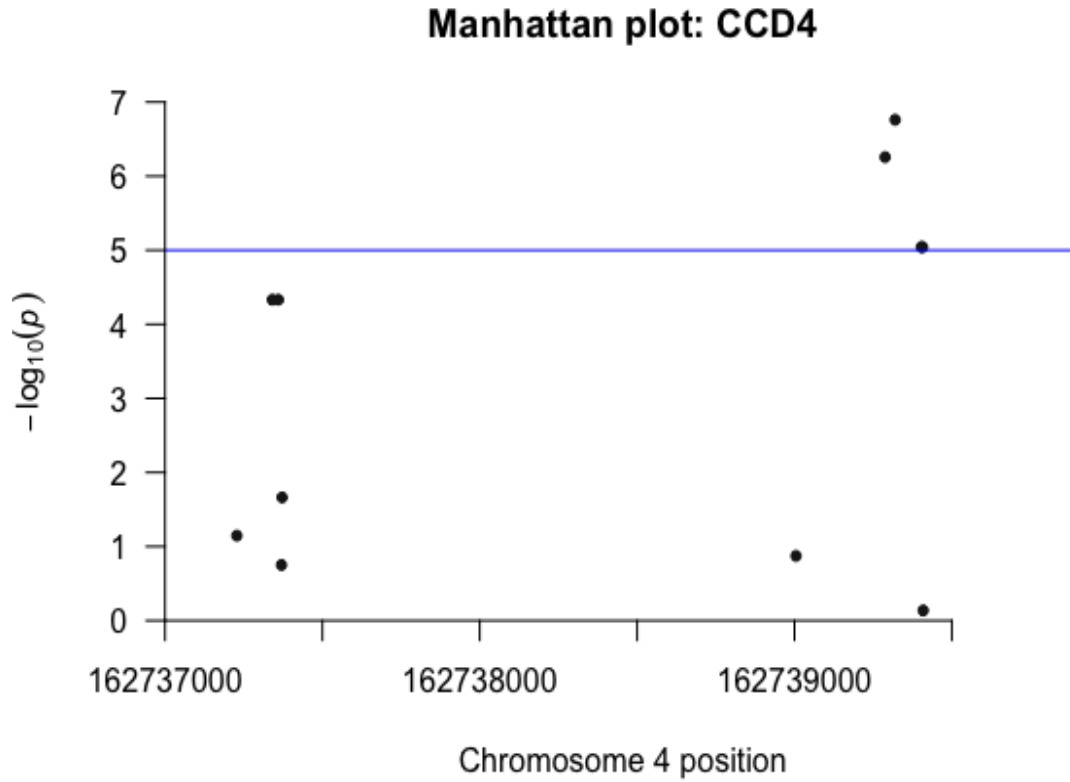


Figura 1.7 Diagramas Manhattan de la secuencia de las enzima CCD4. El eje x muestra las posiciones físicas de los SNP. El eje y muestra el log negativo de los valores P. Cada punto representando un SNP individual.

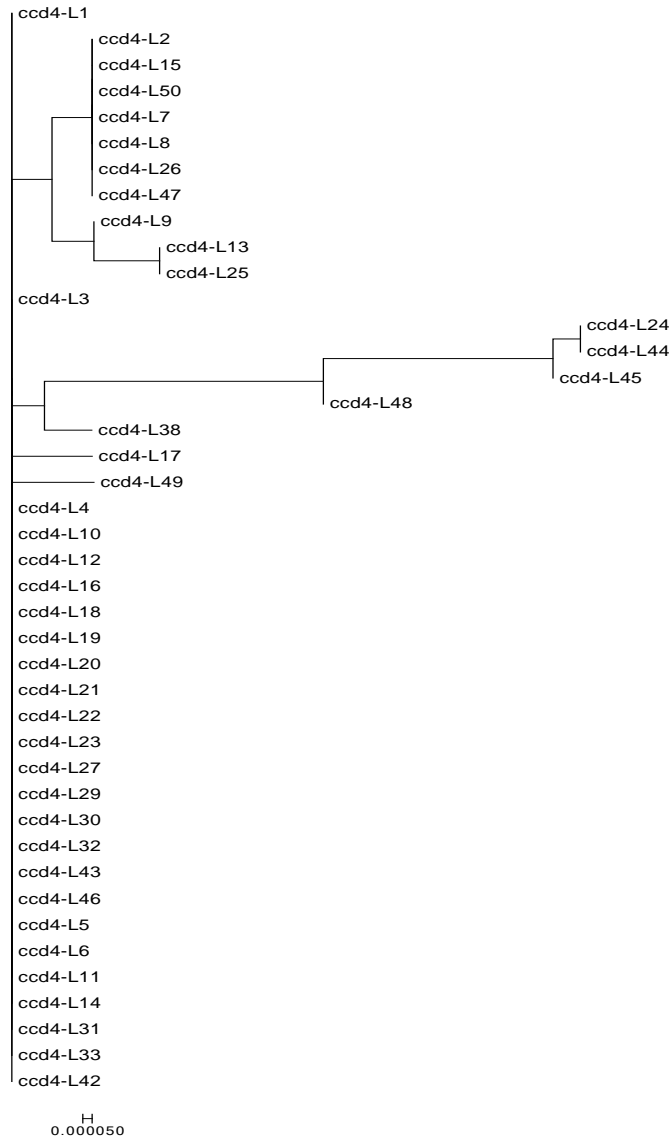


Figura 1.8 Dendrograma de la secuencia de la enzima CCD4. L=línea de maíz.

1.5 DISCUSIÓN

Las xantofilas (zeaxantina, luteína y β -criptoxantina) se encontraron en mayores proporciones y su estabilidad fue alta y sin diferencias significativas entre los genotipos en el experimento de degradación (Cuadro 1.9). Las xantofilas por tener grupos funcionales oxigenados, son menos propensos a la degradación causada por el ambiente (Burri, 2016). β -criptoxantina es una xantofila con actividad de PVA. Su alto contenido en

muchos de los genotipos analizados se reflejó en una mayor proporción hacia la PVA total. En algunos genotipos como 14, 16 y 47 las proporciones fueron hasta 19 veces mayor en relación al β -caroteno.

También se analizaron genotipos como 22, 24 y 44 que fueron derivados de líneas que poseen alelos favorables de *LcyE* y *CrtRB1* para altas concentraciones de β -caroteno. Estos genotipos presentaron $>20 \mu\text{g g}^{-1}$ ps de β -caroteno y bajas concentraciones de β -criptoxantina ($<0.74 \mu\text{g g}^{-1}$ ps). β -caroteno es precursor de β -criptoxantina, reacción mediada por *CrtRB1*. La mutación del gen *CrtRB1* impide su transcripción y por consiguiente permite la acumulación de β -caroteno (Yan *et al.*, 2010; Babu *et al.*, 2012). Por lo anterior, es de esperarse que a mayor concentración de β -criptoxantina es menor la concentración de β -caroteno.

Aunque β -caroteno y β -criptoxantina fueron propensos a la degradación ($k= 0.024$ y $k= 0.012$ respectivamente), la degradación fue mayor en β -caroteno a lo largo de los tres meses del almacenamiento. Los carotenoides en especial β -caroteno, debido a su estructura antioxidante son inestables y de fácil oxidación. De acuerdo a la correlación positiva y altamente significativa observada entre la cantidad inicial de β -caroteno en el grano y el valor k de degradación, se puede sugerir que la pérdida de β -caroteno esta mayormente afectada por factores ambientales como el oxígeno (Schaub *et al.*, 2017; Taleon *et al.*, 2017).

Las tasas de degradación de PVA encontradas fueron mucho mayores a las reportadas en la literatura (PVA > 0.02 , β -caroteno > 0.024 , β -criptoxantina > 0.012). Por ejemplo, Taleon *et al.*, (2017) observaron la retención de carotenos PVA en granos de maíz en diferentes tipos de contenedores. Estos investigadores reportan valores $k < 0.005$ para ambos carotenos PVA. La alta degradación de PVA en el presente estudio, puede justificarse por la alta concentración inicial de carotenos PVA de los genotipos ($11.72 \mu\text{g g}^{-1}$ ps de PVA) en comparación con lo observado en el trabajo de Taleon *et al.* ($4.72 \mu\text{g g}^{-1}$ ps de PVA). De igual forma Taleon *et al.* reportaron que la tasa de degradación fue mayor en β -caroteno en comparación con β -criptoxantina. Corroborando con ello la mayor inestabilidad de β -caroteno y en su estudio se atribuye a la gran influencia del oxígeno.

Se ha demostrado que la transcripción del ARNm de la enzima CCD1 se realiza durante el desarrollo del grano en el maíz (18 - 25 días después de la antesis), decreciendo hacia la madurez fisiológica (Vallabhaneni *et al.*, 2010; Silva-Messias *et al.*, 2014; Tan *et al.*, 2017). La nula diferencia estadística en la cuantificación de transcritos de CCD1 observada a través del tiempo, corrobora que no hay transcripción del gen CCD1 en semilla post-cosecha. Aunque el ARN y el ADN son propensos a la oxidación, entre otras causas de pérdida, ambos son estables al paso de los años (Fleming *et al.*, 2018), explicando también con ello la alta estabilidad de los transcritos de CCD1 durante los meses que duró este experimento.

La diferencia en la cuantificación de transcritos entre los genotipos analizados en el ANOVA resultó estadísticamente significativa ($P > 0.01$). Esta variación de ARNm de la enzima CCD1 en los genotipos de maíz puede estar influenciada por la modulación en el flujo de carotenoides en cada genotipo. Esta relación se ha observado en frutos y flores donde la alta abundancia de transcritos de genes bio-sintéticos, se correspondía con la alta acumulación de carotenoides (Cunningham, 2002). Contrastando esta modulación de sustrato con los resultados aquí encontrados, se podría sugerir que genotipos que sintetizan una gran cantidad de β -caroteno también tienden a sintetizar por lo tanto, gran cantidad de transcritos de CCD1 para favorecer la homeostasis de los carotenoides en el grano.

La variación genotípica de los genes que participan en la ruta de síntesis de carotenoides ha sido sugerida por otros investigadores. El efecto de los genes como las CCDs en el comportamiento de los carotenoides, varía en magnitud dependiendo del genotipo (Vallabhaneni *et al.*, 2010; Suwarno *et al.*, 2015). Por ejemplo, estudios previos de Vallabhaneni *et al.*, (2010) mostraron una diferencia en la cuantificación relativa de transcritos entre los genotipos durante el desarrollo de los granos de maíz. En su estudio sugieren que la diferencia de transcritos entre las líneas de maíz se debe a la carga genética. Proponen que a mayor número de copias del gen en el genoma, se presentará la mayor expresión de los transcritos CCD1 y la menor cantidad de carotenoides totales. En el presente estudio las líneas de maíz que presentaron más de una copia relativa del gen CCD1 en el genoma no se relacionaron con la expresión de transcritos ni con la cantidad de los carotenos PVA ni carotenos totales. La frecuencia en número de copias

del locus “White cap” (Wc) que posee la secuencia de CCD1 en el genoma es mayor en variedades de maíz de endospermo blanco (*y1*). El estado homocigoto recesivo del gen *y1* no permite la síntesis de la enzima PSY, enzima que desencadena la síntesis en la ruta de los carotenoides. Tan *et al.* (2017) sugieren que Wc intensifica el fenotipo blanco de las variedades *y1*. Para este estudio se seleccionaron líneas de maíz con endospermo amarillo o naranja, todas previamente seleccionadas por el alto contenido de carotenos. Además presentaban diferentes tasas de degradación y contenido de carotenoides. Probablemente por este motivo no se encontró mayor variación en el número de copias del gen CCD1.

Las CCDs juegan un papel importante en la catálisis de carotenos durante el desarrollo del grano (Auldridge *et al.*, 2006; Vallabhaneni *et al.*, 2010). La acción conjunta de las enzimas CCD1 y CCD4 se ha relacionado con la generación de apocarotenoides incluidos compuestos volátiles en múltiples reportes de la literatura (Gonzalez-Jorge *et al.*, 2013; Vogel *et al.*, 2008; Baldermann *et al.*, 2010; Lashbrooke *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013). En el presente estudio se encontró una correlación positiva entre la degradación tanto de β -caroteno como β -criptoxantina con la cuantificación de transcritos de CCD1 en el almacenamiento post-cosecha de los granos de maíz. Sería recomendable el poder cuantificar los compuestos volátiles que se pueda estar generando a consecuencia de dicha degradación. En el análisis de asociación, se encontraron polimorfismos en la secuencias de CCD1 y CCD4 asociados a las degradaciones de β -criptoxantina y β -caroteno, respectivamente. El uso de marcadores moleculares para seleccionar genotipos que presentan alelos favorables para el mejoramiento de cultivos, es una alternativa rápida para el avance de la ganancia genética en los programas de mejoramiento de plantas. Así, es preciso validar el efecto observado de estas regiones genómicas en la estabilidad de carotenos PVA, para poder proponer una alternativa en la selección molecular de genotipos con estabilidad de sus compuestos con actividad de PVA.

La diversidad en contenido y degradación de carotenoides del maíz PVA analizado en este estudio, ayudó a distinguir entre los genotipos más estables. Se encontró que la línea 47 tiene una concentración de carotenos totales de $22.60 \mu\text{g g}^{-1}$ ps, carotenos PVA de $9.08 \mu\text{g g}^{-1}$ ps, y la concentración de β -criptoxantina de $12.5 \mu\text{g g}^{-1}$ ps, ocho veces

más alta que β -caroteno. La misma línea de maíz obtuvo las menores degradaciones para β -caroteno y PVA de 0.002 y 0.0008 respectivamente y presenta síntesis de luteína. También presenta cantidades bajas de transcritos de CCD1 y en el análisis de asociación presentó el polimorfismo en la secuencia de CCD1 asociado a la estabilidad de β -criptoxantina, por poseer el alelo alternativo. Esta línea es un excelente ejemplo de la estabilidad de PVA y puede ser un candidato para realizar más estudios y para ser seleccionada dentro del programa de mejoramiento de maíces biofortificados con PVA, para elucidar aún más los mecanismos de catálisis de carotenos.

Cabrera-Soto *et al.*, (2018) reportaron que el pico de acumulación de carotenoides, ocurre en la madurez fisiológica del grano y comienza a decrecer hacia la madurez de cosecha. En esta etapa, la biosíntesis de los carotenoides puede haberse detenido, pero las enzimas de catálisis de carotenos pueden activarse. Ocurriendo la degradación enzimática y no enzimática de carotenoides. Esta degradación continúa en el primer mes de almacenamiento después de la cosecha decreciendo la degradación gradualmente (Sowa *et al.*, 2017).

Aunque hay evidencia de la degradación de carotenos por causas no enzimáticas en granos maduros de distintos cereales, se observó una relación entre la pérdida de carotenos PVA y la enzima CCD1. La inestabilidad de los carotenoides es una característica que ha sido estudiada en distintos cultivos y bajo distintas condiciones. La presencia de vitamina E (Muzhingi *et al.*, 2016; (Schaub *et al.* 2017), enzimas como LOX (Gayen *et al.* 2015), la expresión del gen ORANGE (Bai *et al.*, 2016) y las enzimas que participan abajo de la ruta de síntesis de carotenoides como ZEP1, CCDs son ejemplos de otras características de las cuales la estabilidad de carotenoides depende.

Si bien, el ambiente afecta en gran medida la estabilidad de los carotenos dentro del grano de maíz, las bases genéticas de los genotipos de maíz pueden permitir manipularlos para contribuir a la retención de carotenos en el grano.

Es necesario complementar el entendimiento de la estabilidad de carotenos PVA continuando con la investigación de las actividades de otras enzimas de las cuales la estabilidad también depende; en este estudio se comprobó que la enzima CCD1 tiene un impacto sobre la estabilidad de carotenos PVA.

1.6 LITERATURA CITADA

- Auldridge, M.E., D.R. McCarty, and H.J. Klee. 2006. Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9(3): 315–321.
- Babu, R., N.P. Rojas, S. Gao, J. Yan, and K. Pixley. 2012. Validation of the effects of molecular marker polymorphisms in *LcyE* and *CrtRB1* on provitamin A concentrations for 26 tropical maize populations. *Theor. Appl. Genet.* 126(2): 389–99 Available at <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3555234&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (verified 28 May 2014).
- Bai C, Capell T, Berman J, Medina V, Sandmann G, Christou P. 2016. Bottlenecks in carotenoid biosynthesis and accumulation in rice endosperm are influenced by the precursor-product balance. *Plant Biotechnol J* 14:195–205
- Baldermann, S., M. Kato, M. Kurosawa, Y. Kurobayashi, A. Fujita, P. Fleischmann, and N. Watanabe. 2010. Functional characterization of a carotenoid cleavage dioxygenase 1 and its relation to the carotenoid accumulation and volatile emission during the floral development of *Osmanthus fragrans* Lour. *J. Exp. Bot.* 61(11): 2967–2977
- Berman, J., U. Zorrilla-López, V. Medina, G. Farré, G. Sandmann, T. Capell, P. Christou, and C. Zhu. 2017. The Arabidopsis ORANGE (AtOR) gene promotes carotenoid accumulation in transgenic corn hybrids derived from parental lines with limited carotenoid pools. *Plant Cell Rep.* 36(6): 933–945.
- Bouis, H.E., C. Hotz, B. McClafferty, J.V. Meenakshi, and W.H. Pfeiffer. 2011. Biofortification: A new tool to reduce micronutrient malnutrition. *Food Nutr. Bull.* 32:S31–S40.
- Burri, B.J. 2015. Beta-cryptoxanthin as a source of vitamin A. *J. Sci. Food Agric.* 95(9): 1786–1794.
- Cabrera-Soto, L., K. V. Pixley, A. Rosales-Nolasco, L.A. Galicia-Flores, and N. Palacios-Rojas. 2018. Carotenoid and Tocochromanol Profiles during Kernel Development Make Consumption of Biofortified “Fresh” Maize an Option to Improve Micronutrient Nutrition. *J. Agric. Food Chem.* 66(36): 9391–9398 Available at <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.8b01886>.
- Da Silva Messias, R., V. Galli, S. Delmar, and C. Valmor Rombaldi. 2014. Carotenoid Biosynthetic and Catabolic Pathways: Gene Expression and Carotenoid Content in Grains of Maize Landraces. *Nutrients* 1(6): 546–563.
- Dhliwayo, T., N. Palacios-Rojas, J. Crossa, and K. Pixley. 2014. Effects of S1 Recurrent Selection for Provitamin-A Carotenoid Content for Three Open-Pollinated Maize Cultivars. *Crops.Org* (december): 2449–2460 Available at <https://www.crops.org/publications/cs/view/first-look/c13-11-0764.pdf>.
- Fleming, M.B., E.L. Patterson, P.A. Reeves, C.M. Richards, T.A. Gaines, and C. Walters. 2018. Exploring the fate of mRNA in aging seeds: protection, destruction, or slow decay? *J. Exp. Bot.* 69(18): 4309–4321 Available at <https://academic.oup.com/jxb/advance-article/doi/10.1093/jxb/ery215/5036167>.
- Floss, D.S., W. Schliemann, J. Schmidt, D. Strack, and M.H. Walther. 2008. RNA interference-mediated repression of MtCCD1 in mycorrhizal roots of *Medicago truncatula* causes accumulation of C27 apocarotenoids, shedding light on the functional role of CCD1. *Plant Physiol.* 148(3): 1267–1282.

- Fu, Z., Y. Chai, Y. Zhou, X. Yang, M.L. Warburton, S. Xu, Y. Cai, D. Zhang, J. Li, and J. Yan. 2013. Natural variation in the sequence of PSY1 and frequency of favorable polymorphisms among tropical and temperate maize germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 126(4): 923–935.
- Frusciante, S., G. Diretto, M. Bruno, P. Ferrante, M. Pietrella, A. Prado-Cabrero, A. Rubio-Moraga, P. Beyer, L. Gomez-Gomez, S. Al-Babili, and G. Giuliano. 2014. Novel carotenoid cleavage dioxygenase catalyzes the first dedicated step in saffron crocin biosynthesis. *PNAS* 111(33): 12246–12251 Available at <http://www.pnas.org/content/early/2014/08/05/1404629111.abstract%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25097262>.
- Gayen, D., N. Ali, S. Nath Sarkar, S.K. Datta, and K. Datta. 2015. Down-regulation of lipoxygenase gene reduces degradation of carotenoids of golden rice during storage. *Planta* 242: 353–363.
- Harjes C. E.; Rocheford T. R.; Bai L.; Brutnell T. P.; Kandianis C. B.; Sowinski S. G.; Stapleton A. E.; Vallabhaneni R.; Williams M.; Wurtzel E. T.; Yan J.; Buckler E. S. Natural genetic variation in lycopene epsilon cyclase tapped for maize biofortification. *Science* 319: 330–333; 2008.
- Howitt, C.A., and B.J. Pogson. 2006. Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant, Cell Environ.* 29(3): 435–445.
- Kandianis, C.B., R. Stevens, W. Liu, N. Palacios, K. Montgomery, K. Pixley, W.S. White, and T. Rocheford. 2013. Genetic architecture controlling variation in grain carotenoid composition and concentrations in two maize populations. *Theor. Appl. Genet.* 126(11): 2879–2895.
- Kloer, D.P., and G.E. Schulz. 2006. Structural and biological aspects of carotenoid cleavage. *Cell. Mol. Life Sci.* 63(19–20): 2291–2303.
- Larkin, M.A., G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. Mcgettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson, and D.G. Higgins. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23(21): 2947–2948.
- Lashbrooke, J.G., P.R. Young, S.J. Dockrall, K. Vasanth, and M.A. Vivier. 2013. Functional characterisation of three members of the *Vitis vinifera* L. carotenoid cleavage dioxygenase gene family. *BMC Plant Biol.* 13(156) Available at <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3854447&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Li, L., Yuan, H., Zeng, Y., and Xu, Q. (2016). Plastids and carotenoid accumulation. *Subcell. Biochem.* 79:273–293.
- Li ZH, Matthews PD, Burr B, Wurtzel ET (1996) Cloning and characterization of a maize cDNA encoding phytoene desaturase, an enzyme of the carotenoid biosynthetic pathway. *Plant Mol Biol* 30: 269–279.
- Li, H., B. Handsaker, A. Wysoker, T. Fennell, J. Ruan, N. Homer, G. Marth, G. Abecasis, and R. Durbin. 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25(16): 2078–2079.
- Moise, A.R., S. Al-Babili, and E.T. Wurtzel. 2014. Mechanistic aspects of carotenoid biosynthesis. *Chem Rev* 114(1): 164–193.
- Muzhingi, T., N. Palacios-Rojas, A. Miranda, M.L. Cabrera, K.J. Yeum, and G. Tang.

2016. Genetic variation of carotenoids, vitamin E and phenolic compounds in Provitamin A biofortified maize. *J. Sci. Food Agric.* (February).
- Naqvi S, Zhu C, Farre G, Sandmann G, Capell C, Christou P (2011) Synergistic metabolism in hybrid corn indicates bottlenecks in the carotenoid pathway and leads to the accumulation of extraordinary levels of the nutritionally important carotenoid. *Zeaxanthin Plant Biotechnol J* 9:384–393
- Ortiz-Monasterio, J.I., N. Palacios-Rojas, E. Meng, K. Pixley, R. Trethowan, and R.J. Peña. 2007. Enhancing the mineral and vitamin content of wheat and maize through plant breeding. *J. Cereal Sci.* 46(3): 293–307.
- Ortiz, D., T. Rocheford, and M.G. Ferruzzi. 2016. Influence of temperature and humidity on the stability of carotenoids in biofortified maize (*Zea mays* L.) genotypes during controlled post-harvest storage. *Agric. Food Chem.* 64(13): 2727–2736 Available at <http://pubs.acs.org>.
- Palacios-Rojas, N. 2018. Calidad nutricional e industrial de maíz “Evangelina Villegas”. CDMX, México: CIMMYT.
- Paine, J.A. *et al.* (2005) Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. *Nat. Biotechnol.* 23, 482–487
- Priya, R., and R. Siva. 2014. Phylogenetic analysis and evolutionary studies of plant carotenoid cleavage dioxygenase gene. *Gene* 548(2): 223–233 Available at <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.07.037>.
- Protocolos de laboratorio. 2006. Laboratorio de genética molecular aplicada del CIMMYT. 92 pages. Mexico. CIMMYT. Series: CIMMYT Laboratorio de Genética Molecular Aplicada.
- R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Ruiz-Sola, M.Á., and M. Rodríguez-Concepción. 2012. Carotenoid Biosynthesis in *Arabidopsis*: A Colorful Pathway. *Arab. B.* 10(e0158): 1–28.
- Schaub, P., F. Wüst, J. Koschmieder, Q. Yu, P. Virk, J. Tohme, and P. Beyer. 2017. Nonenzymatic β -Carotene Degradation in Provitamin A-Biofortified Crop Plants. *J. Agric. Food Chem.* 65(31): 6588–6598.
- Schwartz, S.H., B.C. Tan, D.A. Gage, J.A.D. Zeevaart, and D.R. Mccarty. 1997. Specific Oxidative Cleavage of Carotenoids by VP14 of Maize. *Science* (80-). 276(5320): 1872–1874.
- Simkin AJ, Underwood BA, Auldridge M, Loucas HM, Shibuya K, Schmelz E *et al.* (2004). Circadian regulation of the PhCCD1 carotenoid cleavage dioxygenase controls emission of b-ionone, a fragrance volatile of petunia flowers. *Plant Physiol.* 136, 3504– 3514.
- Suwarno, W.B. 2012. Combining Ability, Association Mapping, and Genomic Predictions for Provitamin A Carotenoid Concentrations in Tropical Maize (*Zea mays* L.).
- Suwarno, W.B., K. V. Pixley, N. Palacios-Rojas, S.M. Kaeppler, and R. Babu. 2015. Genome-wide association analysis reveals new targets for carotenoid biofortification in maize. *Theor. Appl. Genet.* Available at <http://link.springer.com/10.1007/s00122-015-2475-3>.
- Sowa, M., J. Yu, N. Palacios-Rojas, S.R. Goltz, J.A. Howe, C.R. Davis, T. Rocheford, and S.A. Tanumihardjo. 2017. Retention of Carotenoids in Biofortified Maize Flour and

- β -Cryptoxanthin-Enhanced Eggs after Household Cooking. ACS Omega 2(10): 7320–7328.
- Taleon, V., L. Mugode, L. Cabrera-Soto, and N. Palacios-Rojas. 2017. Carotenoid retention in biofortified maize using different post-harvest storage and packaging methods. Food Chem. 232: 60–66.
- Tan, B., J. Guan, S. Ding, S. Wu, J.W. Saunders, K.E. Koch, and D.R. McCarty. 2017. Structure and origin of the White Cap locus and its role in evolution of grain color in maize. Genetics 206: 135–150.
- Vallabhaneni, R., L.M.T. Bradbury, and E.T. Wurtzel. 2010. The carotenoid dioxygenase gene family in maize, sorghum, and rice. Arch. Biochem. Biophys. 504(1): 104–111 Available at <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2957549&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (verified 28 May 2014).
- Vogel, J.T., B.C. Tan, D.R. McCarty, and H.J. Klee. 2008. The carotenoid cleavage dioxygenase 1 enzyme has broad substrate specificity, cleaving multiple carotenoids at two different bond positions. J. Biol. Chem. 283(17): 11364–11373.
- Wurtzel, E.T. 2004. Genomics, genetics, and biochemistry of maize carotenoid biosynthesis.
- Wurtzel, E.T., A. Cuttriss, and R. Vallabhaneni. 2012. Maize Provitamin A Carotenoids, Current Resources, and Future Metabolic Engineering Challenges. Front. Plant Sci. 3(February): 1–12 Available at <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2012.00029/abstract>.
- Yan, J., C.B. Kandianis, C.E. Harjes, L. Bai, E.-H. Kim, X. Yang, D.J. Skinner, Z. Fu, S. Mitchell, Q. Li, M.G.S. Fernandez, M. Zaharieva, R. Babu, Y. Fu, N. Palacios, J. Li, D. Dellapenna, T. Brutnell, E.S. Buckler, M.L. Warburton, and T. Rocheford. 2010. Rare genetic variation at *Zea mays* *CrtRB1* increases beta-carotene in maize grain. Nat. Genet. 42(4): 322–7 Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20305664> (verified 21 May 2014).
- Zhai, S., X. Xia, and Z. He. 2016. Carotenoids in Staple Cereals: Metabolism, Regulation, and Genetic Manipulation. Front. Plant Sci. 7(1197): 1–13 Available at <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2016.01197>.

1.7 ANEXOS

Cuadro 1.7 Medidas de tendencia central y de dispersión de la concentración inicial y valor k de degradación de carotenoides en las 42 líneas de maíz analizadas.

	LUT	ZEAX	β -CX	13cis β -C	β -C	9cis β -C	PVA
	----- $\mu\text{g g}^{-1}$ -----						
Promedio	3.94	9.75	7.97	1.32	4.87	1.58	11.72
Mínimo	0.15	0.49	0.26	0.27	0.36	0.27	1.08
Máximo	17.15	27.3	18.12	3.51	18.18	5.94	24.44
DE	3.12	6.69	4.7	0.79	4.37	1.11	4.65
CV (%)	19.78	25.94	7.85	9.6	9.61	9.61	7
	----- Valor <i>k</i> -----						
Promedio	0.0049	0.0088	0.0124	0.0168	0.0247	0.0123	0.0201
Mínimo	-0.0092	-0.0013	0.0006	-0.0019	-0.0007	-0.0034	-0.0014
Máximo	0.0245	0.028	0.0256	0.0497	0.075	0.0458	0.0647
DE	0.0077	0.0063	0.0054	0.0126	0.0165	0.0107	0.0137
CV (%)	225.24	121.11	68.75	52.09	32.79	109.61	38.35

LUT= luteína; ZEAX= zeaxantina; β -CX= β -criptoxantina; β -C= β -caroteno; PVA= Provitamina-A.

Cuadro 1.8 Concentración inicial en la semana cero de el experimento de degradación de los carotenoides en 42 línea de maíz analizada (presentada como $\mu\text{g g}^{-1}$ en peso seco).

ID	LUT	ZEA	β -CX	13cis β C	β -C	9cis β C	PVA
1	4.02 ± 0.02 d	10.59 ± 0.37 c	6.70 ± 0.23 f	1.39 ± 0.07 d	5.76 ± 0.39 d	1.32 ± 0.07 h	11.83 ± 0.63 g
2	3.91 ± 0.29 d	9.51 ± 0.07 c	5.42 ± 0.53 g	1.41 ± 0.01 d	5.23 ± 0.23 d	1.38 ± 0.33 h	10.75 ± 0.84 h
3	17.14 ± 0.90 a	2.84 ± 0.10 i	5.33 ± 0.13 g	1.39 ± 0.05 d	5.00 ± 0.33 d	1.40 ± 0.05 h	10.47 ± 0.48 i
4	4.57 ± 0.20 c	11.93 ± 0.55 b	5.16 ± 0.25 i	1.05 ± 0.03 e	3.63 ± 0.09 e	1.24 ± 0.05 i	8.52 ± 0.27 k
5	2.30 ± 0.07 h	7.17 ± 0.23 e	5.27 ± 0.17 h	1.23 ± 0.08 d	4.04 ± 0.19 e	1.56 ± 0.06 g	9.48 ± 0.38 j
6	2.86 ± 0.15 g	7.48 ± 0.26 e	5.67 ± 0.41 g	1.33 ± 0.03 d	5.85 ± 0.07 d	1.81 ± 0.05 f	11.84 ± 0.36 g
7	6.84 ± 0.39 c	18.13 ± 1.13 b	8.91 ± 0.86 d	0.93 ± 0.06 f	3.91 ± 0.32 e	1.46 ± 0.12 g	10.77 ± 0.92 h
8	5.18 ± 0.05 c	13.03 ± 0.32 b	11.23 ± 0.38 b	1.82 ± 0.18 d	6.46 ± 0.30 d	1.53 ± 0.06 g	15.42 ± 1.44 e
9	2.26 ± 0.04 h	5.08 ± 0.12 f	7.97 ± 2.74 e	1.58 ± 0.48 d	5.21 ± 0.23 d	1.55 ± 0.06 g	12.29 ± 1.99 f
10	5.92 ± 0.25 c	15.00 ± 0.90 b	8.68 ± 0.35 d	1.35 ± 0.02 d	5.95 ± 0.30 d	2.01 ± 0.01 e	13.66 ± 0.40 f
11	1.91 ± 0.21 i	5.98 ± 0.53 f	11.91 ± 0.39 b	0.61 ± 0.02 i	1.99 ± 0.14 i	0.82 ± 0.06 l	9.40 ± 0.37 j
12	3.82 ± 0.29 d	11.34 ± 1.25 b	12.03 ± 0.35 b	0.67 ± 0.01 i	2.37 ± 0.09 h	0.96 ± 0.01 k	10.03 ± 0.29 j
13	4.55 ± 0.13 c	12.03 ± 0.60 b	10.60 ± 0.69 c	0.70 ± 0.04 i	2.50 ± 0.12 g	1.09 ± 0.05 j	9.60 ± 0.54 j
14	2.50 ± 0.14 g	7.33 ± 0.26 e	13.40 ± 0.60 b	1.55 ± 0.18 d	1.68 ± 0.13 j	5.94 ± 0.73 a	15.89 ± 1.34 e
15	4.56 ± 0.18 c	15.15 ± 0.61 b	13.32 ± 0.08 b	1.40 ± 0.01 d	1.64 ± 0.02 j	5.20 ± 0.06 b	14.91 ± 0.06 e
16	5.64 ± 0.58 c	16.29 ± 1.61 b	18.11 ± 0.86 a	0.99 ± 0.07 e	0.97 ± 0.09 l	3.48 ± 0.20 c	14.50 ± 0.63 f
17	4.63 ± 0.48 c	13.67 ± 1.65 b	12.49 ± 0.44 b	0.88 ± 0.04 g	2.78 ± 0.20 g	1.05 ± 0.16 j	10.97 ± 0.56 h
18	2.74 ± 0.57 g	8.35 ± 1.26 de	12.50 ± 0.53 b	0.80 ± 0.02 h	2.28 ± 0.02 h	0.93 ± 0.01 k	10.27 ± 0.31 i
19	4.81 ± 0.28 c	12.55 ± 0.44 b	13.85 ± 0.67 b	0.82 ± 0.07 h	2.35 ± 0.17 h	1.00 ± 0.23 j	11.10 ± 0.79 h
20	2.13 ± 0.04 h	5.19 ± 0.32 f	14.09 ± 0.08 b	0.88 ± 0.03 g	2.80 ± 0.20 g	1.07 ± 0.05 j	11.77 ± 0.63 g
22	0.49 ± 0.07 k	1.41 ± 0.17 j	0.48 ± 0.08 m	2.16 ± 0.38 c	8.83 ± 1.41 c	1.85 ± 0.16 f	13.09 ± 1.99 f
23	9.69 ± 1.80 b	27.05 ± 4.85 a	10.79 ± 0.66 c	1.00 ± 0.10 e	2.93 ± 0.30 g	1.38 ± 0.13 h	10.71 ± 0.84 h
24	0.99 ± 0.07 j	2.16 ± 0.07 i	0.74 ± 0.10 m	3.51 ± 0.22 a	17.19 ± 1.23 a	2.54 ± 0.12 d	23.61 ± 1.42 a
25	1.71 ± 0.01 i	3.52 ± 0.07 h	0.84 ± 0.09 l	3.09 ± 0.13 a	13.74 ± 0.72 b	2.96 ± 0.13 c	20.22 ± 0.67 c
26	5.35 ± 0.05 c	16.00 ± 1.32 b	12.25 ± 1.47 b	1.34 ± 0.19 d	4.88 ± 1.06 d	1.45 ± 0.05 g	13.79 ± 2.05 f

LUT= luteína; ZEAX= zeaxantina; β -CX= β -criptoxantina; β -C= β -caroteno; PVA= Provitamina-A. Diferentes letras dentro de una columna indican una diferencia significativa según la prueba Fisher HSD ($p < 0.05$). Media \pm desviación estándar de 3 repeticiones.

Continuación Cuadro 1.8 Concentración inicial en la semana cero de el experimento de degradación de los carotenoides en 42 línea de maíz analizada (presentada como $\mu\text{g g}^{-1}$ en peso seco).

ID	LUT	ZEAX	β -CX	13cis β C	β -C	9cis β C	PVA
27	0.37 \pm 0.06 k	1.11 \pm 0.19 j	3.11 \pm 0.17 j	0.44 \pm 0.00 j	1.12 \pm 0.01 k	0.41 \pm 0.03 o	3.54 \pm 0.07 n
29	4.35 \pm 2.24 c	13.03 \pm 8.02 b	7.68 \pm 1.74 e	0.97 \pm 0.11 e	3.17 \pm 0.26 e	0.93 \pm 0.08 k	8.91 \pm 1.35 j
30	3.62 \pm 1.61 d	10.64 \pm 5.96 b	7.01 \pm 1.83 e	0.9 \pm 0.15 fg	2.94 \pm 0.24 f	0.81 \pm 0.08 l	8.15 \pm 1.40 k
31	2.89 \pm 0.19 f	7.34 \pm 0.89 e	11.52 \pm 0.38 b	0.84 \pm 0.04 g	2.81 \pm 0.21 g	0.78 \pm 0.11 l	10.19 \pm 0.56 i
32	7.39 \pm 0.06 c	18.09 \pm 1.13 b	7.57 \pm 0.02 e	0.83 \pm 0.03 g	2.12 \pm 0.02 h	1.12 \pm 0.04 j	7.86 \pm 1.40 k
33	1.51 \pm 0.28 i	4.30 \pm 0.41 g	6.44 \pm 0.57 f	0.97 \pm 0.04 e	2.89 \pm 0.21 g	1.14 \pm 0.04 j	8.23 \pm 0.50 k
38	3.25 \pm 3.50 e	10.99 \pm 12.04 b	7.59 \pm 0.02 e	0.62 \pm 0.07 i	1.74 \pm 0.22 j	0.71 \pm 0.24 m	6.86 \pm 0.52 l
42	4.47 \pm 0.07 c	12.85 \pm 1.35 b	10.75 \pm 0.32 c	0.9 \pm 0 fghij	2.82 \pm 0.07 g	1.00 \pm 0.00 j	10.11 \pm 0.25 i
43	1.80 \pm 0.04 i	4.97 \pm 0.09 f	4.56 \pm 0.27 i	1.38 \pm 0.08 d	4.85 \pm 0.60 d	1.27 \pm 0.07 h	9.78 \pm 0.88 j
44	0.14 \pm 0.04 l	0.47 \pm 0.00 j	0.25 \pm 0.10 m	2.58 \pm 0.29 b	13.71 \pm 1.00 b	1.37 \pm 0.02 h	17.80 \pm 1.27 d
45	0.84 \pm 0.15 j	2.18 \pm 0.20 i	0.94 \pm 0.09 l	3.45 \pm 0.16 a	18.17 \pm 0.49 a	2.33 \pm 0.00 d	24.43 \pm 0.69 a
46	6.63 \pm 0.36 c	20.16 \pm 1.43 a	10.92 \pm 1.04 c	0.82 \pm 0.00 g	2.60 \pm 0.12 g	0.88 \pm 0.01 k	9.77 \pm 0.62 j
47	1.77 \pm 0.18 i	5.29 \pm 0.12 f	12.52 \pm 1.12 b	0.59 \pm 0.03 i	1.61 \pm 0.19 j	0.62 \pm 0.01 n	9.08 \pm 0.81 j
48	2.29 \pm 0.24 h	7.00 \pm 0.65 e	7.13 \pm 0.80 e	1.31 \pm 0.09 d	4.79 \pm 0.19 d	1.20 \pm 0.06 i	10.88 \pm 0.44 h
50	1.07 \pm 0.19 j	2.62 \pm 0.42 i	0.36 \pm 0.02 m	0.25 \pm 0.01 k	0.34 \pm 0.01 m	0.25 \pm 0.00 p	1.03 \pm 0.04 o
96	1.17 \pm 0.27 j	2.54 \pm 0.52 i	0.74 \pm 0.03 m	3.20 \pm 0.37 a	15.13 \pm 0.27 b	2.32 \pm 0.19 e	21.03 \pm 0.43 b
98	0.36 \pm 0.08 l	0.85 \pm 0.15 j	2.22 \pm 0.13 k	0.87 \pm 0.06 g	2.78 \pm 0.23 g	1.08 \pm 0.05 j	5.85 \pm 0.41 m

LUT= luteína; ZEAX= zeaxantina; β -CX= β -criptoxantina; β -C= β -caroteno; PVA= Provitamina-A. Diferentes letras dentro de una columna indican una diferencia significativa según la prueba Fisher HSD ($p < 0.05$). Media \pm desviación estándar de 3 repeticiones.

Cuadro 1.9 Valor *k* de degradación de los carotenoides en 42 líneas de maíz.

ID	LUT	ZEA	β-CX	13cis βC	β-C	9cis βC	PVA
1	0.004 ± 0.005 a	0.005 ± 0.002 a	0.011 ± 0.000 a	0.022 ± 0.003 a	0.039 ± 0.002 b	0.012 ± 0.004 a	0.024 ± 0.001 b
2	0.008 ± 0.002 a	0.006 ± 0.007 a	0.004 ± 0.002 a	0.020 ± 0.010 a	0.028 ± 0.030 c	0.012 ± 0.002 a	0.020 ± 0.003 c
3	0.003 ± 0.002 a	0.001 ± 0.007 a	0.011 ± 0.006 a	0.016 ± 0.003 a	0.026 ± 0.002 c	0.011 ± 0.001 a	0.018 ± 0.001 d
4	0.003 ± 0.001 a	0.007 ± 0.002 a	0.013 ± 0.003 a	0.014 ± 0.003 b	0.021 ± 0.004 d	0.008 ± 0.002 a	0.015 ± 0.003 d
5	0.004 ± 0.001 a	0.007 ± 0.003 a	0.007 ± 0.004 a	0.010 ± 0.001 c	0.019 ± 0.002 e	0.009 ± 0.003 a	0.012 ± 0.003 d
6	0.004 ± 0.005 a	0.009 ± 0.004 a	0.011 ± 0.002 a	0.016 ± 0.001 a	0.030 ± 0.001 b	0.009 ± 0.0008 a	0.019 ± 0.001 c
7	0.007 ± 0.003 a	0.011 ± 0.001 a	0.017 ± 0.002 a	0.017 ± 0.003 a	0.029 ± 0.003 c	0.012 ± 0.002 a	0.020 ± 0.003 c
8	0.005 ± 0.001 a	0.010 ± 0.002 a	0.013 ± 0.000 a	0.022 ± 0.003 a	0.030 ± 0.001 b	0.010 ± 0.004 a	0.020 ± 0.0006 c
9	-0.004 ± 0.002 a	-0.005 ± 0.002 a	-0.001 ± 0.002 a	0.014 ± 0.003 b	0.020 ± 0.004 d	0.001 ± 0.010 a	0.000 ± 0.004 f
10	0.0009 ± 0.002 a	0.004 ± 0.0006 a	0.013 ± 0.0007 a	0.015 ± 0.001 a	0.031 ± 0.002 b	0.007 ± 0.001 a	0.019 ± 0.000 c
11	0.001 ± 0.006 a	0.003 ± 0.003 a	0.005 ± 0.003 a	0.003 ± 0.004 d	0.010 ± 0.004 g	0.002 ± 0.005 a	0.006 ± 0.003 f
12	0.005 ± 0.001 a	0.008 ± 0.001 a	0.015 ± 0.003 a	0.007 ± 0.003 c	0.015 ± 0.004 e	0.006 ± 0.002 a	0.013 ± 0.003 d
13	0.003 ± 0.003 a	0.003 ± 0.003 a	0.010 ± 0.001 a	0.006 ± 0.001 c	0.011 ± 0.003 f	0.006 ± 0.002 a	0.009 ± 0.001 e
14	0.017 ± 0.001 a	0.018 ± 0.003 a	0.022 ± 0.002 a	0.023 ± 0.002 a	0.015 ± 0.004 e	0.033 ± 0.001 a	0.025 ± 0.001 b
15	0.005 ± 0.011 a	0.005 ± 0.007 a	0.012 ± 0.007 a	0.015 ± 0.005 a	0.004 ± 0.002 h	0.026 ± 0.005 a	0.016 ± 0.005 d
16	0.020 ± 0.004 a	0.022 ± 0.007 a	0.023 ± 0.004 a	0.021 ± 0.004 a	0.012 ± 0.008 f	0.033 ± 0.007 a	0.024 ± 0.005 b
17	0.003 ± 0.023 a	0.007 ± 0.021 a	0.016 ± 0.010 a	0.014 ± 0.004 b	0.021 ± 0.006 d	0.017 ± 0.007 a	0.017 ± 0.008 d
18	0.009 ± 0.005 a	0.010 ± 0.004 a	0.009 ± 0.003 a	0.007 ± 0.005 c	0.011 ± 0.005 f	0.005 ± 0.006 a	0.009 ± 0.004 e
19	0.003 ± 0.010 a	0.008 ± 0.010 a	0.018 ± 0.003 a	0.010 ± 0.002 c	0.013 ± 0.003 f	0.001 ± 0.010 a	0.015 ± 0.003 d
20	0.003 ± 0.002 a	0.008 ± 0.010 a	0.009 ± 0.002 a	0.020 ± 0.010 a	0.034 ± 0.002 b	0.020 ± 0.009 a	0.010 ± 0.000 d
22	-0.004 ± 0.004 a	-0.0005 ± 0.007 a	0.010 ± 0.006 a	0.034 ± 0.002 a	0.048 ± 0.001 a	0.017 ± 0.002 a	0.039 ± 0.00009 a
23	0.019 ± 0.030 a	0.017 ± 0.025 a	0.025 ± 0.025 a	0.029 ± 0.042 a	0.026 ± 0.030 c	0.045 ± 0.072 a	0.028 ± 0.034 b

LUT= luteína; ZEAX= zeaxantina; β-CX= β-criptoxantina; β-C= β-caroteno; PVA= Provitamina-A. Diferentes letras dentro de una columna indican una diferencia significativa según la prueba Fisher HSD ($p < 0.05$). Media ± desviación estándar de 3 repeticiones.

Continuación Cuadro 1.9 Valor *k* de degradación de los carotenoides en 42 líneas de maíz.

ID	LUT	ZEA	β-CX	13cis βC	β-C	9cis βC	PVA
24	0.007 ± 0.012 a	0.012 ± 0.004 a	0.015 ± 0.025 a	0.042 ± 0.009 a	0.058 ± 0.006 a	0.021 ± 0.009 a	0.049 ± 0.007 a
25	0.007 ± 0.017 a	0.010 ± 0.013 a	0.006 ± 0.003 a	0.034 ± 0.007 a	0.047 ± 0.008 a	0.017 ± 0.002 a	0.038 ± 0.006 a
26	0.002 ± 0.006 a	0.004 ± 0.003 a	0.015 ± 0.001 a	0.014 ± 0.005 a	0.023 ± 0.006 c	0.006 ± 0.001 a	0.016 ± 0.003 d
27	-0.002 ± 0.011 a	0.010 ± 0.009 a	0.006 ± 0.024 a	-0.0004 ± 0.007 d	0.006 ± 0.020 g	0.005 ± 0.016 a	0.005 ± 0.019 f
29	0.005 ± 0.003 a	0.003 ± 0.006 a	0.009 ± 0.001 a	0.007 ± 0.002 c	0.011 ± 0.000 f	0.005 ± 0.002 a	0.009 ± 0.0007 e
30	-0.0005 ± 0.002 a	0.002 ± 0.005 a	0.010 ± 0.010 a	0.008 ± 0.003 c	0.016 ± 0.008 e	0.002 ± 0.003 a	0.011 ± 0.006 d
31	0.006 ± 0.0005 a	0.013 ± 0.012 a	0.013 ± 0.008 a	0.010 ± 0.001 b	0.022 ± 0.011 c	0.008 ± 0.003 a	0.015 ± 0.008 d
32	0.005 ± 0.002 a	0.011 ± 0.001 a	0.013 ± 0.000 a	0.010 ± 0.001 c	0.015 ± 0.000 e	0.020 ± 0.009 a	0.013 ± 0.003 d
33	0.006 ± 0.0004 a	0.009 ± 0.006 a	0.010 ± 0.002 a	0.010 ± 0.000 c	0.015 ± 0.000 e	0.003 ± 0.004 a	0.011 ± 0.000 d
38	0.010 ± 0.002 a	0.014 ± 0.003 a	0.009 ± 0.002 a	0.006 ± 0.002 c	0.012 ± 0.002 f	0.006 ± 0.004 a	0.009 ± 0.002 e
42	0.024 ± 0.036 a	0.027 ± 0.030 a	0.017 ± 0.004 a	0.014 ± 0.003 a	0.022 ± 0.003 c	0.007 ± 0.003 a	0.017 ± 0.002 d
43	-0.006 ± 0.009 a	0.006 ± 0.007 a	0.014 ± 0.008 a	0.015 ± 0.004 a	0.030 ± 0.001 b	0.006 ± 0.001 a	0.020 ± 0.0006 c
44	-0.007 ± 0.006 a	0.000 ± 0.007 a	0.003 ± 0.000 a	0.049 ± 0.009 a	0.074 ± 0.010 a	0.029 ± 0.002 a	0.064 ± 0.010 a
45	0.002 ± 0.008 a	0.010 ± 0.003 a	0.014 ± 0.007 a	0.027 ± 0.007 a	0.046 ± 0.004 a	0.013 ± 0.000 a	0.037 ± 0.003 a
46	-0.003 ± 0.011 a	0.011 ± 0.001 a	0.013 ± 0.000 a	0.011 ± 0.002 b	0.023 ± 0.003 c	0.010 ± 0.003 a	0.015 ± 0.000 d
47	-0.009 ± 0.001 a	-0.001 ± 0.004 a	0.0006 ± 0.003 a	-0.0001 ± 0.004 d	0.002 ± 0.007 h	0.000 ± 0.006 a	0.000 ± 0.004 f
48	0.003 ± 0.031 a	0.012 ± 0.032 a	0.013 ± 0.011 a	0.020 ± 0.010 a	0.038 ± 0.017 b	0.009 ± 0.006 a	0.022 ± 0.004 b
50	0.003 ± 0.007 a	0.007 ± 0.005 a	0.000 ± 0.004 a	-0.001 ± 0.0005 d	-0.0007 ± 0.003 i	-0.003 ± 0.002 b	-0.001 ± 0.001 g
96	0.018 ± 0.012 a	0.015 ± 0.013 a	0.012 ± 0.005 a	0.049 ± 0.009 a	0.050 ± 0.008 a	0.025 ± 0.005 a	0.046 ± 0.005 a
98	-0.003 ± 0.008 a	0.002 ± 0.009 a	0.012 ± 0.004 a	0.011 ± 0.005 b	0.020 ± 0.004 d	0.010 ± 0.004 a	0.015 ± 0.003 d

LUT= luteína; ZEAX= zeaxantina; β-CX= β-criptoxantina; β-C= β-caroteno; PVA= Provitamina-A. Diferentes letras dentro de una columna indican una diferencia significativa según la prueba Fisher HSD ($p < 0.05$). Media ± desviación estándar de 3 repeticiones.

1.6.1 Determinación de la calidad e integridad de ARN y ADNc.

El grado de pureza del ARN se determinó haciendo una relación de la absorbancia $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$ resultando en un cociente de aproximadamente 2-2.2, de buenas condiciones para los objetivos de este estudio.

La integridad del ARN también se comprobó con la intensidad de las bandas de las subunidades ribosomales 28S/18S observándose en un gel de agarosa al 1% (Figura 1.9a).

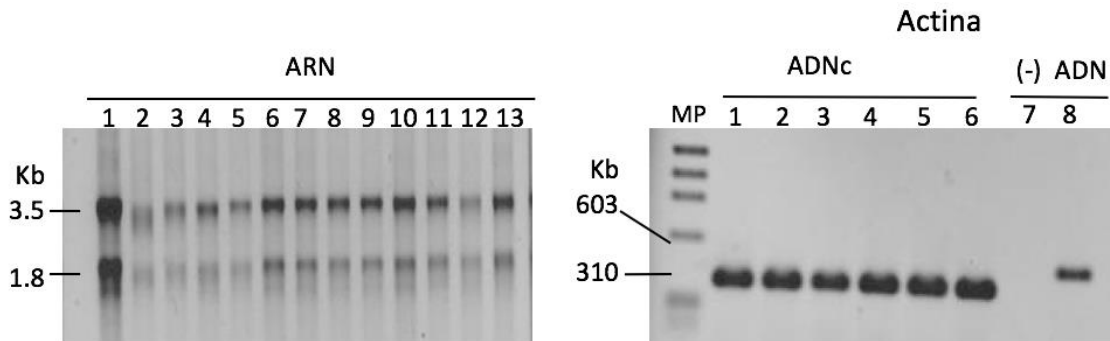


Figura 1.9 a) Patrones de bandeo de ARN con muestras representativa de los genotipos estudiados; b) Producto de PCR del gen Actin1 en geles de agarosa al 1% de muestras de ADNc maíz. MP. marcador de peso molecular es X174/HaeIII. (-) control negativo .

Una vez teniendo un ARN con grado de pureza e integridad adecuadas se realizó la síntesis del ADNc y posterior amplificación en PCR tiempo final con iniciadores del gen Actina1, obteniendo su banda característica (Figura 1.9b).

Antes de amplificar el ADNc en PCR tiempo real, se amplificó en PCR tiempo final con iniciadores CCD1 donde se observó un producto entre 118 y 194 pb (Figura 1.10). El producto de la PCR virtual⁷ muestra un fragmento lineal de 153 pb usando la secuencia de ZmCCD1 e iniciadores de CCD1 (https://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_products.html) >153 pb producto del fragmento lineal de ZmCCD1, base 1454 a base 1606.

⁷ La PCR virtual es una herramienta bioinformática usada para checar teóricamente la amplificación de un cierto fragmento con iniciadores específicos.

ctggagaagaagatgacggctatttgatattctttgtacacgacgagaacacagggaaatctgaagtaaattgtatcgatg
 caaagacaatgtctgctgatccagttgctggtggttgagcttcctaataagggttccttatggattccatgcct].

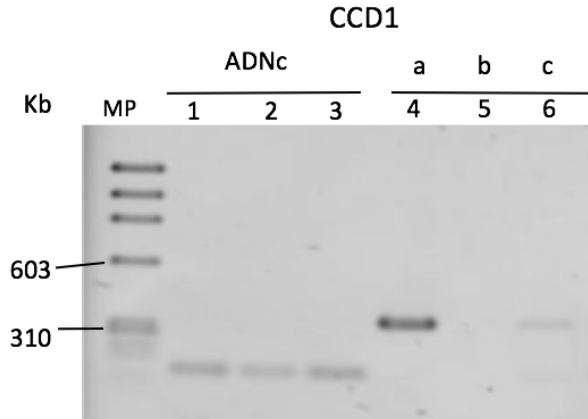


Figura 1.10 Producto PCR del gen CCD1 en gel de agarosa al 1% de tres muestras de ADNc de maíz. a =ADN; b =control negativo (muestra sin ADN); c =ADNc sin tratamiento de ADNasa; MP =marcador de peso molecular es X174/HaeIII.

1.6.2 Cuantificación de la expresión génica.

El *software* CFX Manager™, versión 3.1 muestra tres gráficos en los cuales podemos observar el punto donde inicia la amplificación de los transcritos de CCD1, la curva de fusión de los iniciadores del mismo gen y la curva patrón de la dilución seriada de una muestra de maíz control. El punto de amplificación da comienzo o empieza a ser máximo dependiendo del genotipo, entre los ciclos 25 y 38 (Figura 1.11a), en estos ciclos la fluorescencia aumenta significativamente con respecto a la fluorescencia basal. El gráfico de la curva de fusión (Figura 1.11b) permitió confirmar la homogeneidad del fragmento amplificado, observándose por un pico estrecho sugiriendo una amplificación específica. La curva patrón (Figura 1.11c) cuantificó la cantidad de transcritos que se generaron en el experimento, extrapolando en la pendiente de la curva estándar obtenida a partir de la dilución seriada de una muestra de maíz control.

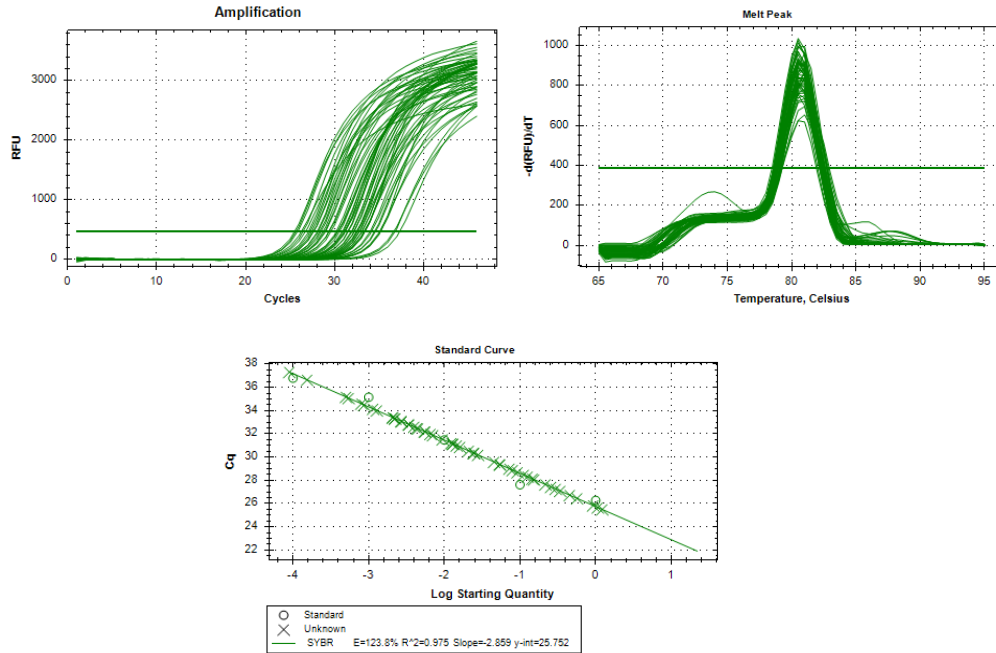


Figura 1.11 Gráficos de la curva de amplificación (a), de fusión (b) y la curva patrón (c) del *software* CFX Manager™, versión 3.1.

1.6.3 Determinación de la calidad e integridad de ADN.

La calidad de ADN usado para la cuantificación del número de copias del gen CCD1 en el genoma de los genotipos evaluados se comprobó mediante gel de agarosa y espectrofotometría. Las relaciones de absorbancia $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$ muestran un cociente de aproximadamente 1.8- 2 y bandas nítidas e integras en el gel de agarosa, suficientemente buenas para realizar el análisis de PCR en tiempo real (Figura 1.12).

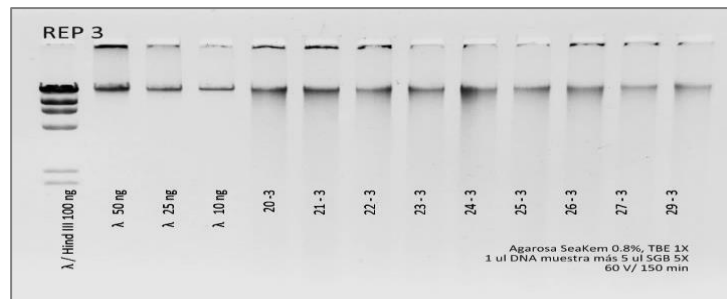


Figura 1.12 Patrones de bandeo de ADN con muestras representativa de los genotipos de maíz estudiados; gel de agarosa al 0.8%; MP. marcador de peso molecular λ /HindIII.

1.6.4 Parámetros estadísticos de calidad de las secuencias genéticas de CCD1 y CCD4.

Se obtuvieron parámetros estadísticos de buena calidad individual y grupal de las secuencias de los genes en las cuarenta y dos líneas de maíz. En la Figura 1.13a, se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos en el control de calidad con la herramienta “FastQC”. En estos ejemplos se observa un satisfactorio control de calidad exceptuando el modulo “Kmer content” en los datos crudos de algunas líneas de maíz, el cual es debido al aumento de secuencias duplicadas.

Adicionalmente, resultados del chequeo estadístico mediante “bamtools” (Figura 1.13b) muestra distintos parámetros estadísticos de buena calidad, como el número total de lecturas, la cuenta de las lecturas en ambos sentidos, el número de duplicados, etc. Los resultados se muestran como el promedio de las 42 secuencias de líneas de maíz.

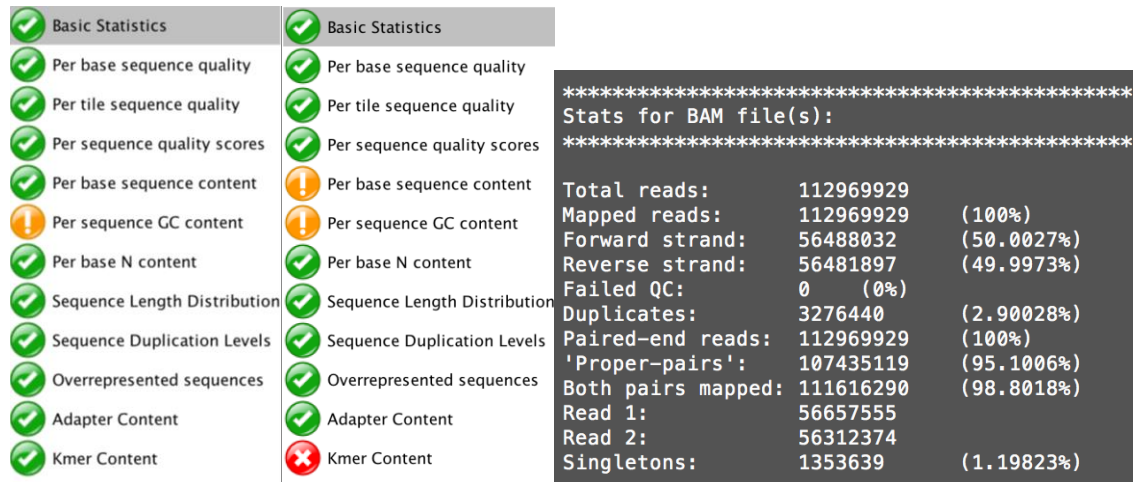


Figura 1.13 a) Ejemplos del control de calidad arrojados por el *software* “FastQC” de las secuencias crudas de dos líneas de maíz. b) Parámetros estadísticos de datos crudos del conjunto de 42 líneas de maíz con “bamtools”.

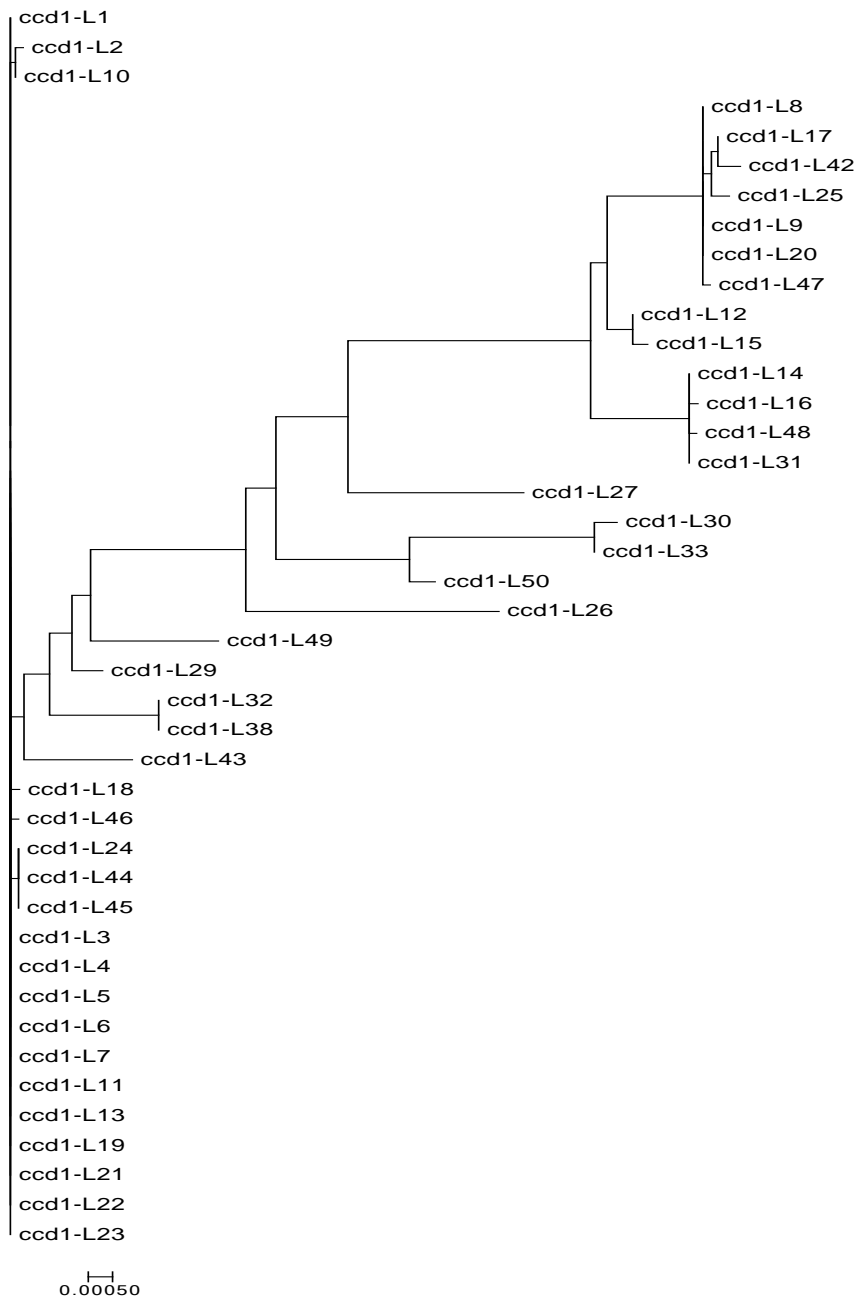


Figura 1.14 Dendrograma de la secuencia de enzima CCD1. L=línea de maíz.

CAPÍTULO 2. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DEL GRANO DE MAÍZ INFLUYEN EN LA RETENCIÓN DE CAROTENOIDE DURANTE EL ALMACENAMIENTO.

2.1 RESUMEN

El objetivo planteado en este estudio fue determinar las características físicas y químicas del grano que influyen en la retención de carotenos durante el almacenamiento del grano. Para ello se utilizaron ocho líneas con alto contenido de β -criptoxantina y se a) comparó la cinética de degradación de los carotenoides en el grano entero frente a los granos degerminados, durante 16 semanas de almacenamiento; b) se determinó el posible efecto de las características físicas del grano y la concentración de los TCCM en la degradación de los carotenoides durante el almacenamiento y c) se evaluó la actividad antioxidante en las muestras. Los resultados mostraron que las tasas de degradación de los carotenoides fueron más bajas en grano entero en comparación con grano degerminado. La alta capacidad antioxidante se observó en los granos enteros. Posiblemente la baja degradación de carotenoides en grano entero resultó por los compuestos antioxidantes en el germen de maíz y por la protección que le brinda al endospermo evitando su contacto con el medio ambiente. Además, las mayores concentraciones de β -caroteno se encontraron en el endospermo harinoso ($r^2 = 0.75$, $p < 0.05$) y la mayor concentración inicial de β -caroteno, condujo a la mayor tasa k de degradación. Esta diferenciación en la deposición del β -caroteno puede jugar un papel importante en su estabilidad, haciéndola más susceptible al medio ambiente. La información aquí presentada puede ser necesaria para tomar en cuenta en la selección de genotipos más estables en el desarrollo de maíz biofortificado con PVA. Y se recomiendan las líneas 13, 14, 16 y 18 por la mayor estabilidad de los carotenos PVA durante su almacenamiento.

Palabras clave: Degradación, β -caroteno, maíz, endospermo harinoso.

2.2 INTRODUCCIÓN

La deficiencia de micronutrientes es actualmente uno de los problemas de malnutrición que afectan a más de 2 mil millones de personas en todo el mundo (Pfeiffer y McClafferty, 2007). Una de las intervenciones agrícolas para ayudar a combatir este tipo de deficiencia ha sido el desarrollo de cultivos biofortificados (Bouis y Saltzman, 2017). El maíz biofortificado con PVA se ha desarrollado mediante mejoramiento convencional y actualmente se comercializan híbridos en siete países de África (Pixley *et al.*, 2011; Andersson *et al.*, 2017; Menkir *et al.*, 2018). El conocimiento y difusión de los beneficios por el consumo de maíz PVA está aumentando a pesar de varios retos como la aceptabilidad del color del grano y la estabilidad de β -caroteno vs β -criptoxantina durante el almacenamiento (Cabrera-Soto *et al.*, 2018; Simpungwe *et al.*, 2017).

Los carotenoides no son compuestos estables y su descomposición puede ocurrir debido a procesos no enzimáticos, o debido al catabolismo mediado por las enzimas CCD (CCD, del inglés carotenoid cleavage dioxygenases; Schaub *et al.*, 2017). Además, por la estructura de polieno que presentan los carotenoides, los hace actuar como antioxidantes, lo que conduce a su propia degradación. Los ambientes oxidantes, la temperatura, la luz, el contenido de agua y los catalizadores metálicos pueden fomentar dicha propiedad (De Moura *et al.*, 2015).

La luteína y la zeaxantina están presentes en proporciones mayores en el grano de maíz amarillo, en contraste con β -criptoxantina, β -caroteno y alfa-caroteno que están presentes en proporciones más bajas (Ortiz-Monasterio *et al.*, 2007). El maíz biofortificado con PVA tiene mayores cantidades de β -caroteno y β -criptoxantina en comparación con el maíz amarillo normal (Babu *et al.*, 2013; Muzhingi *et al.*, 2016; Taleon *et al.*, 2017). En el maíz PVA se ha encontrado que β -criptoxantina es más estable durante el almacenamiento en comparación con β -caroteno (Ortiz *et al.*, 2016; Taleon *et al.*, 2017; Sowa *et al.*, 2017). El grado de dicha estabilidad varía según el genotipo, la forma de almacenamiento (grano o harina), el tamaño de las partículas de la harina y la concentración de oxígeno (O_2) en el contenedor de almacenamiento (Ortiz *et al.*, 2016; Taleon *et al.*, 2017; Schaub *et al.*, 2017, 2018).

Los carotenoides y tococromanos (TCCM) son los dos grupos más abundantes de antioxidantes liposolubles que están presentes en los amiloplastos de los granos de

maíz. Los carotenoides en el maíz se pueden encontrar en la aleurona y en el germen, pero las mayores cantidades se encuentran en el endospermo, mientras que los TCCM (tocoferoles y tocotrienoles) se encuentran en el germen (Masisi *et al.*, 2015; Muzhingi *et al.*, 2017). Los TCCM desempeñan un papel importante en la estabilidad de los carotenoides y han sido utilizados por la industria para extender la vida útil de los productos con β -caroteno (Che *et al.*, 2016). Che *et al.* (2016) demostraron que PVA se puede estabilizar en el sorgo mediante el aumento de TCCM a través de la expresión ectópica del geranilgeraniltransferasa (HGGT) y además los TCCM pueden mejorar la estabilidad de los PVA en la planta.

El “Golden rice”, arroz dorado posee alto contenido de β -caroteno y fue desarrollado utilizando la tecnología de ARN de interferencia (ARNi) para disminuir la regulación del gen de la enzima lipoxigenasa endógena (LOX, del inglés lipoxygenase). En este arroz se reporta una reducción en el envejecimiento de la semilla y un aumento en la estabilidad de β -caroteno en la semilla después de un tratamiento de envejecimiento artificial (Gayen *et al.* 2015). La acción de enzimas como LOX generan una co-oxidación lipídica hacia β -caroteno, generando así su pérdida. La baja concentración de compuestos precursores como los isoprenoides limitan la acumulación de los carotenoides en los granos de arroz, el alto suministro y la alta transcripción de *fitoeno sintasa* (*PSY*) genera estabilidad, debido a que la sobre-producción de carotenoides es mayor que la degradación (Bai *et al.*, 2016).

Adicionalmente, se ha encontrado que la generación de estructuras que secuestran carotenoides a través de la expresión del gen ORANGE (*OR*) en granos de arroz transgénicos aumenta la acumulación de carotenoides (Bai *et al.*, 2016). Esto se debe a que la mutación del gen *OR* promueve la diferenciación de proplastidos en cromoplastos. La primera observación se hizo en coliflor (*Brassica oleracea* L var. botrytis) donde los carotenoides se encontraron en inclusiones cristaloides de color naranja (Paolillo *et al.*, 2004).

Estudios recientes (Dhliwayo *et al.*, 2014, Taleon *et al.*, 2017; Simpungwe *et al.*, 2017) han sugerido que el mejoramiento de maíz con altos contenidos de PVA debería buscar el aumento de β -criptoxantina más que de β -caroteno. Lo anterior, debido a la evidencia creciente de baja estabilidad del β -caroteno (Sowa *et al.*, 2017; Taleon *et al.*,

2017; Ortiz *et al.*, 2016), la mayor biodisponibilidad de β -criptoxantina en comparación con β -caroteno, y la bioconversión y bioeficacia similares de β -criptoxantina y β -caroteno (Schmaelzle *et al.*, 2014). Además de la diversidad genética encontrada para la concentración de β -criptoxantina (Suwarno *et al.*, 2015; Menkir *et al.*, 2018). Así, se han iniciado esfuerzos de mejoramiento en este sentido y se han desarrollado líneas endogámicas altas en β -criptoxantina que están siendo utilizadas actualmente en el desarrollo híbridos. Para lograr un mayor progreso en el maíz biofortificado con PVA, el conocimiento del destino de los carotenoides y la posible influencia de las características del grano en la reducción de las pérdidas de PVA son de importancia considerable. Por lo tanto, en este estudio, se han utilizado líneas con alto contenido de β -criptoxantina con el objetivo de: 1) comparar la cinética de degradación de los carotenoides en el grano entero frente a los granos degerminados, durante 16 semanas de almacenamiento; 2) determinar el posible efecto de las características físicas del grano y la concentración de los TCCM en la degradación de los carotenoides durante el almacenamiento y 3) medir la actividad antioxidante en las muestras almacenadas.

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1 Material vegetal.

Se seleccionaron ocho líneas de maíz (Cuadro 1) con alto contenido de β -criptoxantina ($> 10 \mu\text{g g}^{-1}$ ps) y diferentes valores k de degradación de carotenoides ($k= 0.009 \text{ semana}^{-1}$ a 0.04 semana^{-1}) del programa de biofortificación de maíz con PVA del CIMMYT.

Las líneas se sembraron con 2 repeticiones en la estación de investigación del CIMMYT en Agua Fría, Puebla, México ($20^{\circ} 32' \text{ N}$, $97^{\circ} 28' \text{ W}$, 110 msnm, temperatura promedio anual de 22° C , precipitación promedio anual de 1200 mm) durante ciclo de verano del 2017. Se hicieron autopolinizaciones y se tomaron de diez a doce mazorcas por repetición, por genotipo; con una humedad de grano de $\sim 18\%$. Las mazorcas se desgranaron manualmente y se mantuvieron a 4° C hasta que se estableció el experimento de almacenamiento.

2.3.2 Características físicas del grano.

El tamaño y el porcentaje de estructuras del grano (pericarpio, germen, pico, endospermo vítreo y endospermo harinoso) se midieron por duplicado, siguiendo la metodología descrita por Salinas-Moreno y Vázquez-Carrillo (2006).

2.3.3 Experimento de almacenamiento de grano.

Se usaron granos enteros (GE) y granos degerminados (GD) para el experimento de degradación durante el almacenamiento. El germen o embrión del grano fue removido manualmente utilizando un bisturí. Tres repeticiones por muestra, de cincuenta granos cada una, se colocaron en un sobre de papel oscuro y se almacenaron a temperatura ambiente (promedio de 25° C), durante 20 semanas. Se tomaron muestras para el análisis químico a las 0, 4, 6, 8, 12 y 20 semanas de almacenamiento y se guardaron a -80° C hasta que se realizaron los análisis químicos.

2.3.4 Análisis de carotenoides y tococromanoles.

Todos los reactivos y productos químicos utilizados fueron para HPLC y de grado analítico. Los estándares de *all-trans*- β -caroteno (β -caroteno), 9-cis- β -caroteno, 13-cis- β -caroteno, β -criptoxantina, luteína y zeaxantina se adquirieron de Carotene Nature (Ostermundigen, Suiza). Se adquirió un patrón interno de β -apo-8-carotenal de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Los estándares de α -Tocotrienol (α -T3), α -Tocoferol (α -TF), γ -Tocoferol (γ -TF) se obtuvieron de Merck. También se obtuvieron metil-terc-butil éter (MTBE), tetrahidrofurano (THF), metanol, acetonitrilo, alcohol etílico, hidróxido de sodio de Merck KGaH (Darmstadt, Alemania). La extracción y análisis de carotenoides se realizó por triplicado en todas las muestras y como se describe en Palacios-Rojas, N. (2018). El total de carotenos PVA se calculó como β -caroteno + (1/2 13-cis- β -caroteno) + (1/2 9-cis- β -caroteno) + (1/2 β -criptoxantina) (Palacios-Rojas, N. 2018).

La extracción y el análisis de TCCM se realizaron solo en muestras de GE porque los TCCM están presentes en el germen. La metodología utilizada fue la misma descrita por Palacios-Rojas, N. (2018).

2.3.5 Tasa de degradación de carotenoides y cálculo de la retención de carotenoides.

La tasa de degradación de carotenoides (k) durante el almacenamiento se calculó como:

$$\ln x / x_0 = -kt$$

Dónde, x es la concentración de carotenoide en el tiempo t (semana), x_0 es la concentración de carotenoide al inicio del almacenamiento, y k es la tasa constante de degradación de carotenoides (semana).

La retención real (% RR) se calculó como:

% RR = (PVA por g de maíz después del almacenamiento en peso seco (ps) / PVA por g de maíz al inicio del almacenamiento en ps) * 100

2.3.6 Determinación de la capacidad de absorción de radicales oxidantes.

La determinación de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC, del inglés Oxygen Radical Absorbance Capacity), de los componentes lipofílicos (carotenoides y TCCM) e hidrofílicos, se realizó por triplicado en las ocho líneas de maíz en ambos tratamientos, GE y GD. La metodología se llevó a cabo como se describe en Palacios-Rojas (2018). Los resultados se expresaron en micromoles de Trolox equivalente por 100 gramos de peso seco de la muestra ($\mu\text{MTE } 100 \text{ g}^{-1} \text{ ps}$).

2.3.7 Análisis estadístico.

ANOVA y Fisher test-LSD (con ajuste de p de Bonferroni) se utilizaron para genotipos y tratamientos. Las diferencias entre las medias se consideraron significativas a $p < 0.05$. Los resultados se presentan como la media \pm desviación estándar. Se realizaron correlaciones de Spearman para todos los rasgos analizados. Se hizo un análisis de componentes principales a partir de la matriz de correlaciones de los caracteres evaluados. Se elaboró un diagrama de dispersión con los dos primeros componentes para mostrar la relación de los caracteres evaluados. Todo el análisis se realizó utilizando el paquete estadístico R.

2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1 Características físicas, concentración de carotenoides y TCCM de los granos de maíz.

En este estudio, las líneas 1 y 3 tuvieron la mayor proporción de endospermo harinoso (> 21.9%; Cuadro 2.1), mientras que las líneas 7, 13 y 14 tuvieron el mayor porcentaje de endospermo vítreo (> 68.8%; Cuadro 2.1). Las líneas 7, 10 y 16 tuvieron el mayor porcentaje de germen (> 13%).

Entre las 8 líneas analizadas se observaron diferencias significativas en el contenido de carotenoides y TCCM (Cuadro 2.1). Como se esperaba, el contenido de zeaxantina fue mayor en comparación con los otros carotenoides analizados. El contenido de PVA varió de 9 a 15.8 $\mu\text{g g}^{-1}$ ps, β -criptoxantina varía de 5.1 a 18.1 $\mu\text{g g}^{-1}$ ps mientras que β -caroteno varió de 2.2 a 5.9 $\mu\text{g g}^{-1}$ ps (Cuadro 2.1). El γ -TF fue el TCCM predominante en las ocho líneas de este estudio (6.2 a 28.4 $\mu\text{g g}^{-1}$ ps), seguido de α -TF (3.8 a 20.4 $\mu\text{g g}^{-1}$ ps). Estos resultados están de acuerdo con reportes previos en los que γ -TF ha sido identificado como el TCCM más abundante en maíz (Muzhing *et al.*, 2016; Lipka *et al.*, 2013). No obstante, las concentraciones encontradas en los materiales de maíz de estos reportes superan por más de cuatro veces la cantidad reportada en el presente estudio (Muzhing *et al.*, 2016).

Este es el primer informe donde se analizan concentraciones de carotenoides y TCCM en líneas altas en β -criptoxantina. Se pudo comprobar que los contenidos de TCCM no fueron modificados por el aumento de β -criptoxantina en el grano de estas líneas. Las líneas 10, 13, 14, 16 y 18 tienen las más altas concentraciones de β -criptoxantina (> 10 $\mu\text{g g}^{-1}$ ps). De ellas la línea 10, 13 y 18 tuvieron el contenido más alto de γ -TF (> 28.4 $\mu\text{g g}^{-1}$ ps; Cuadro 2.1). La línea 1 mostró la mayor concentración de β -caroteno, α -T3 y el mayor porcentaje de endospermo harinoso (Cuadro 2.1). La línea 16 mostró la mayor concentración de β -criptoxantina y bajo porcentaje de endospermo harinoso.

Cuadro 2.1 Promedio de la concentración de carotenoides, tocoferoles, capacidad antioxidante[†] y proporción de estructuras constituyentes del grano en las ocho líneas de maíz con altas concentraciones de β-criptoxantina.

	Genotipo [§]							
	1	3	7	10	13	14	16	18
LUT ^a	4.00±0.07b	4.13±0.26b	5.95±0.37a	5.27±0.23a	4.08±0.12b	2.50±0.14d	5.64±0.58a	3.07±0.14c
ZEAX ^a	10.73±0.55b	10.31±0.70b	16.79±0.93a	13.81±0.37a	10.85±0.40b	7.33±0.26c	16.29±1.61a	9.04±0.61b
βCX ^a	6.71±0.31d	5.16±0.19d	9.34±0.94c	8.86±0.18c	10.2±0.60c	13.4±0.60b	18.1±0.86a	12.5±0.53b
βC ^a	5.99±0.34a	4.78±0.23b	3.50±0.32c	5.54±0.27a	2.28±0.08d	5.94±0.73a	3.48±0.20c	2.28±0.02d
PVA ^a	12.2±0.55d	10.0±0.42e	10.4±0.97de	13.4±0.29b	9.12±0.45e	15.8±1.34a	14.5±0.63ab	10.2±0.31d
α-T3 ^a	3.83±0.77a	3.65±1.48a	3.7±0.71a	3.28±0.2ab	4.97±1.11a	2.09±0.42b	2.02±0.49b	2.1±0.24b
γ-TF ^a	6.53±0.59d	9.49±1d	16.3±2.13b	28.4±1.75a	19.2±2.65b	6.07±0.84d	13.8±2.43c	20.1±1.37b
α-TF ^a	4.31±1.01d	8.82±0.71b	4.23±0.48d	6.75±0.54c	20.4±2.53a	11.9±1.73b	4.02±0.47d	3.96±0.92d
Pico ^b	4.55±3.10a	4.61±1.32a	2.54±0.09a	4.79±0.57a	5.61±1.46a	1.96±0.16a	4.74±0.22a	2.32±0.25a
Pericarpio ^b	4.82±0.87c	5.14±0.30c	6.47±0.49a	5.5±0.18c	6.57±0.22a	8.39±0.58ab	7.04±0.10a	9.15±1.25a
Germen ^b	11.91±0.58a	11.85±0.21a	13.35±0.34a	14.04±1.01a	12.35±0.25a	10.53±0.09c	13.42±0.23a	10.93±0.37b
E.Vítreo ^b	54.17±5.38b	56.48±1.15a	68.83±0.42a	65.04±1.68a	68.82±0.35a	68.07±0.08a	66.65±1.31a	62.85±4.44a
E.Harinoso ^b	24.54±3.73a	21.92±0.34a	8.81±0.17b	10.63±1.94b	6.65±1.77b	11.06±0.91b	8.15±1.20b	5.21±0.37b
ORAC [†]	931±259a	835±286b	733±135c	956±182a	1032±148a	1078±262a	1080±288a	1116±109a

^a µg g⁻¹; ^b porcentaje; ^c µMTE 100g⁻¹; [†] El valor de la capacidad antioxidante es el promedio de grano entero y grano degerminado en cada línea de maíz; Media ± desviación estándar (*n* = 3) letras distintas en la misma fila son diferentes y estadísticamente significativas (*P* < 0.05). LUT, luteína; ZEA, zeaxantina; βCX, β-criptoxantina; βC, β-caroteno; PVA, Provitamina A; α-TF, α-tocopherol; γ-TF, γ-tocopherol; α-T3, α-tocotrienol. [§] La genealogía de los genotipos se encuentran en el Cuadro 1.

2.4.2 Concentración y tasas k de degradación de carotenoides en granos enteros y degerminados de maíz biofortificado.

La concentración de carotenoides, en el tiempo cero, tanto en GE como en GD no fue estadísticamente diferente ($p > 0.05$) para luteína, zeaxantina, β -criptoxantina y 9-cis- β -caroteno. Sin embargo, β -caroteno y 13-cis- β -caroteno mostraron diferencias pequeñas pero significativas ($p < 0.05$; Cuadro 2.2). Los carotenoides se acumulan principalmente en el endospermo del grano y los carotenoides principales son luteína y zeaxantina. La detección de β -caroteno y sus isómeros cis en el germen es generalmente difícil debido a su baja concentración. Ndolo y Beta (2013) estudiaron tres genotipos de maíz amarillo y reportaron mayores cantidades de carotenoides totales en endospermo (21.4 mg kg^{-1}) en comparación con el germen (3.78 mg kg^{-1}) y el pericarpio (0.46 mg kg^{-1}). De manera similar, Masisi *et al.* (2015) reportaron que solo alrededor del 5% de la luteína y zeaxantina se encuentran en el germen. La diferencia en el contenido de carotenos en GE y GD detectada en este estudio podría deberse a que se extrajo y se comparó estos dos tipos de grano y en los GE se cuantificaron también los carotenoides presentes en la capa de aleurona y el pericarpio.

Cuadro 2.2 ANOVA y comparación de medias de la concentración inicial de carotenoides en los tratamientos de grano entero y grano degerminado en ocho líneas de maíz.

Fuente	GL	LUT	ZEAX	β CX	β C	9 cis β C	13 cis β C	PVA
----- Cuadrados medios de carotenoides -----								
Genotipo	7	9.55**	62.41**	50.38**	12.32**	0.73**	0.55**	9.16*
Tratamiento (trt)	1	1.32**	2.64ns	11.79	5.76**	0.08ns	0.34**	24.78**
Repetición (rep)	2	0.08ns	1.42ns	0.07ns	0.11ns	0.00ns	0.00ns	0.31ns
trt * rep	2	0.13ns	0.43ns	0.71ns	0.17ns	0.00ns	0.00ns	0.88ns
Error	31	0.319	3.46	4.71	0.64	0.032	0.029	4.578
----- Concentración inicial -----								
GE		4.67a	12.31a	10.55a	4.22a	1.29a	1.18a	11.99a
GD		4.38a	11.71a	9.55a	3.53b	1.21a	1.02b	10.55b

*, ** Significativo al $P < 0.05$ y $P < 0.01$, respectivamente; ns: no significativo; GL, grados de libertad; letras distintas en la misma columna son diferentes y estadísticamente significativas ($P < 0.05$). GE, grano entero; GD, grano degerminado; LUT, luteína; ZEAX, zeaxantina; β CX, β -criptoxantina; β C, β -caroteno; PVA, Provitamina A.

La retención y la tasa k de degradación de carotenoides se calcularon durante 20 semanas (140 días) de almacenamiento, a temperatura ambiente, de los GE y GD. La retención de luteína, tanto en GE como en GD, durante el período de almacenamiento, fue la más alta (86.4% y 84.4% respectivamente) seguida de zeaxantina (83.3 y 84%, respectivamente), β -criptoxantina (75.7 y 73.3%, respectivamente) y β -caroteno (64.5 y 61.5% respectivamente; Cuadro 2.5).

Las tasas de degradación de los carotenoides fueron diferentes para GE en comparación con GD y se observaron valores k más altos en GD (Figura 2.1). Para luteína y zeaxantina los valores k de degradación fueron muy bajos y no significativos entre los tratamientos de GE y GD (Cuadro 2.2). Sin embargo los valores k fueron significativos para los carotenos PVA ($p < 0.01$; Cuadro 2.3).

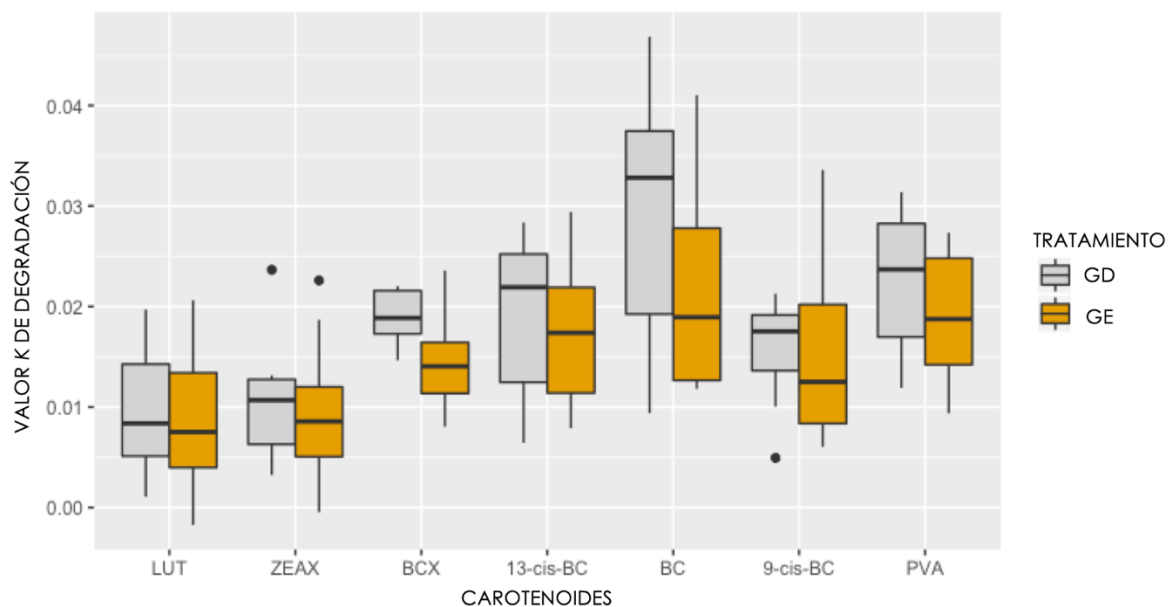


Figura 2.1 Diagrama de caja de las tasas de degradación de los carotenoides analizados en las ocho líneas de maíz. LUT, luteína; ZEAX, zeaxantina; β CX, β -criptoxantina; β C, β -caroteno; PVA, Provitamina-A; GD, grano degerminado; GE, grano entero.

Al igual que los resultados presentados en el *Capítulo 1*, (Cuadro 1.9) hubo diferencias significativas entre los genotipos para las tasas k de degradación de cada uno de los carotenoides y la k fue más alta para β -caroteno que para β -criptoxantina (Cuadro 2.3;

Figura 2.1). Estos resultados concuerdan con los informes recientes sobre la degradación de carotenoides en los cereales (Ortiz *et al.*, 2016; Sowa *et al.*, 2017; Schaub *et al.*, 2017; Taleon *et al.*, 2017). Tanto mecanismos enzimáticos como no enzimáticos son responsables de las pérdidas de carotenoides (Schaub *et al.*, 2017 y 2018). Las pérdidas de carotenoides comienzan en la etapa de madurez fisiológica del grano de maíz (Cabrera-Soto *et al.*, 2018). Sin embargo, los granos de cereales maduros están secos y el endospermo está formado por células muertas, por lo que los mecanismos no enzimáticos podrían predominar. Schaub *et al.* (2017), en una serie de experimentos en arroz dorado (con alto contenido de β -caroteno) que incluyen la expresión de CCDs y el almacenamiento de granos, concluyeron que la presencia de O_2 es determinante para la estabilidad de β -caroteno. Taleon *et al.* (2017) también encontraron que el β -caroteno es más estable cuando el maíz se almacena en bolsas de polietileno multicapa y silos metálicos con bajos niveles de O_2 . En éste trabajo, el endospermo en GD, está más expuesto al O_2 y por consiguiente más propenso a la pérdida de los carotenoides. Además, están privados del ambiente antioxidante que proporcionan los TCCM presentes en el germen (Goffman *et al.*, 2001).

Cuadro 2.3 ANOVA y comparación de medias de los valores k de carotenoides en los tratamientos en grano entero y grano degerminado en ocho líneas de maíz.

Fuente	GL	LUT	ZEAX	β CX	β C	9cis β C	13cis β C	PVA
----- Cuadrados medios de carotenoides -----								
Genotipo	7	2.36E-04**	2.16E-04**	4.54E-05ns	7.5E-04**	3.00E-04**	3.08E-04**	2.09E-04**
Trt	1	4.51E-05ns	2.94E-05ns	2.20E-04**	6.3E-04**	6.5E-06ns	3.3E-05ns	1.39E-04**
Rep	2	1.18E-04ns	1.1E-04ns	2.5E-05ns	3.9E-05n	4.1E-05ns	5.0E-05ns	3.5E-05ns
Error	37	7.17E-05	5.82E-05	4.05E-05	3.80E-05	5.32E-05	2.90E-05	3.06E-05
----- Valor k -----								
GE		0.0098a	0.0112a	0.0190a	0.0292a	0.0157a	0.0192a	0.0225a
GD		0.0079a	0.0097a	0.0147b	0.0219b	0.0164a	0.0175a	0.0191b

*,** Significativo al $P < 0.05$ y $P < 0.01$, respectivamente; ns: no significativo; letras distintas en la misma columna son diferentes y estadísticamente significativas ($P < 0.05$). Trt, Tratamiento; Rep, repetición; GE, grano entero; GD, grano degerminado; LUT, luteína; ZEAX, zeaxantina; β CX, β -criptoxantina; β C β -caroteno; PVA, Provitamina A.

2.4.3 Actividad antioxidante en granos enteros y granos degerminados.

En este estudio, se evaluó la capacidad antioxidante de la parte lipofílica y lipofóbica de los granos de maíz. Sin embargo, solo se reportan los resultados de la fracción lipofílica, pues en esta fracción se ubican los compuestos carotenoides y TCCM. El promedio de la capacidad antioxidante de los compuestos lipofílicos en GE de los 8 genotipos fue de 1068.4 $\mu\text{MTE } 100 \text{ g}^{-1}$ superando el promedio observado en GD, 872.9 $\mu\text{MTE } 100 \text{ g}^{-1}$. La menor capacidad antioxidante analizada por ORAC se observó en la línea 3, en GE, la cual fue de 818.8 $\mu\text{MTE } 100 \text{ g}^{-1}$ y en la línea 7, en GD, que fue de 635.7 $\mu\text{MTE } 100 \text{ g}^{-1}$. Mientras que la mayor capacidad antioxidante se observó en la línea 16 en GE (1340.9 $\mu\text{MTE } 100 \text{ g}^{-1}$) y en la línea 18 en GD (1087.3 $\mu\text{MTE } 100 \text{ g}^{-1}$). Estas líneas 16 y 18 también presentan la mayor concentración de β -criptoxantina (Cuadro 2.1).

El promedio del contenido total de carotenoides (CTC) de las 8 líneas fue de 34.3 $\mu\text{g g}^{-1}$ ps (rango mínimo 27.0 $\mu\text{g g}^{-1}$ ps y máximo 46.8 $\mu\text{g g}^{-1}$ ps) con valores máximos de ORAC de 1068.4 $\mu\text{MTE } 100\text{g}^{-1}$. Corrales-Buñuelos *et al.* (2016) evaluaron el CTC y actividad antioxidante en maíces de razas mexicanas. Observaron altos valores de la capacidad antioxidante (347.2 $\mu\text{MTE g}^{-1}$) a pesar de que el CTC en las razas de maíz fue de máximo 5.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ ps. Aunque los carotenoides son compuestos lipofílicos con actividad antioxidante, los compuestos con mayor actividad antioxidante se ubican en el germen. Así, resultados obtenidos ORAC fueron estadísticamente ($p < 0.01$) mayores en GE (1068.4 $\mu\text{MTE } 100\text{g}^{-1}$) comparados con los obtenidos en los GD (872.9 $\mu\text{MTE } 100\text{g}^{-1}$). Los TCCM son compuestos localizados en el germen de maíz, y se han reportado como una fuente alta de antioxidantes en vegetales y frutas (Cho *et al.*, 2007). Sin embargo, las correlaciones entre los TCCM y los valores del ORAC no fueron significativos ($p > 0.05$) en GE de las ocho líneas estudiadas. Aunque en concentraciones muy bajas, otros compuestos antioxidantes presentes en el grano de maíz son los compuestos fenólicos y los ácidos grasos (Zhang *et al.*, 2017); sin embargo, en este estudio dichos compuestos no se analizaron pero sería importante incluirlos en futuros estudios de capacidad antioxidante en el grano de maíz y quizá utilizar otras metodologías para medición de capacidad antioxidante como poder antioxidante reductor del hierro (FRAP del inglés, ferric reducing antioxidant power), capacidad

antioxidante equivalente de Trolox (TEAC, del inglés Trolox equivalent antioxidant capacity) y rendimiento total antioxidante (TAP, del inglés total antioxidant performance).

2.4.4 Correlaciones entre carotenoides PVA, su tasa de degradación, TCCM, ORAC y características físicas del grano.

Como se reportó en el *Capítulo 1*, en este estudio particular con las 8 líneas también se observó una correlación de la concentración de β -caroteno y su degradación ($r^2 = 0.82$, $p < 0.01$; Cuadro 2.6; Cuadro 1.2). A mayor concentración inicial de β -caroteno, mayor fue la tasa k de degradación. Por ejemplo, las líneas 13 y 18 tuvieron los valores k de β -caroteno más bajos (0.01 para ambas líneas; Cuadro 1.3, *Capítulo 1*; Cuadro 1.9) y menos de $2.5 \mu\text{g g}^{-1}$ ps β -caroteno, en comparación con las líneas 1 y 10 que tuvieron tasas k de β -caroteno de hasta 0.04 y la concentración es mayor que $5 \mu\text{g g}^{-1}$ ps. Dicha diversidad fenotípica en la estabilidad de los carotenoides se ha observado en las líneas de maíz PVA y da la oportunidad de utilizar las líneas más estables para el desarrollo de maíz biofortificado con PVA (Menkir *et al.*, 2018). Igualmente, estas líneas son una buena fuente de germoplasma de investigación para estudios bioquímicos más detallados hacia una mejor comprensión de la estabilidad de los carotenoides (*Capítulo 1*).

Aunque el número de líneas analizadas en este estudio fue limitado ($n = 8$), se observó una correlación positiva entre el porcentaje de endospermo harinoso y la concentración de β -caroteno ($r^2 = 0.75$, $p < 0.05$; Figura 2.2). Por el contrario, se obtuvo una correlación negativa entre la concentración de β -criptoxantina y el porcentaje de endospermo harinoso ($r^2 = -0.86$, $p < 0.01$; Figura 2.3). Estas observaciones concuerdan con otros estudios en los que la concentración de β -caroteno fue más alta en los granos más suaves, los cuales tienen mayores proporciones de endospermo harinoso en comparación con el endospermo vítreo (*Capítulo 3*, Cuadro 3.7). Pero son contrarios a la afirmación de que los carotenoides se acumulan principalmente en el endospermo vítreo (Ortiz *et al.*, 2016).

Nogueira *et al.* (2013) encontraron diferentes proporciones de carotenoides en el pericarpio, pulpa y placenta de tomates sobre expresando las enzimas fitoeno sintasa (CRTB) y fitoeno desaturasa (CTRI). En comparación con el tipo silvestre, las líneas de tomate CRTBI tuvieron un mayor contenido de β -caroteno en la columela (Nogueira *et*

al., 2013), lo que sugiere que la acumulación de carotenoides depende de varios factores relacionados tanto con el tejido como con el tipo de células, la composición y la cantidad de membranas. Así, Nogueira *et al.*, (2013) sugieren que en el caso del tomate hay un límite de saturación para un carotenoide específico en un tejido determinado y después se debe usar otro tejido de la fruta. También se han reportado alteraciones en la estructura de los plástidos especializados para acumular carotenoides, como los cromoplastos y amiloplastos, en cultivos como tomate y cítricos (Nogueira *et al.*, 2013; Cao *et al.*, 2012). Además, en las células de cítricos se forman cristales de carotenoides en las membranas de los amiloplastos. Cao *et al.*, (2012) demostraron que dicha cristalización no parece proteger al β -caroteno de la degradación foto-oxidante, aunque puede proteger a los carotenoides del catabolismo enzimático. Por el contrario, Berman *et al.* (2017) demostraron recientemente que la expresión del gen *ORANGE* de *A. thaliana* (*AtOR*) en el maíz mejora los niveles de carotenoides al promover la formación de plastoglobulos, pero solo cuando la reserva de carotenoides es limitada. Sin embargo, no se observaron efectos adicionales cuando los carotenoides ya eran abundantes. Por lo tanto, podría ser posible que en las líneas mejoradas de manera convencional con altas cantidades de β -criptoxantina y utilizadas en este estudio, se produzcan particiones en la deposición o acumulación de los carotenos dentro del grano, y las alteraciones de la estructura de los amiloplastos podrían ser limitadas para almacenarlos.

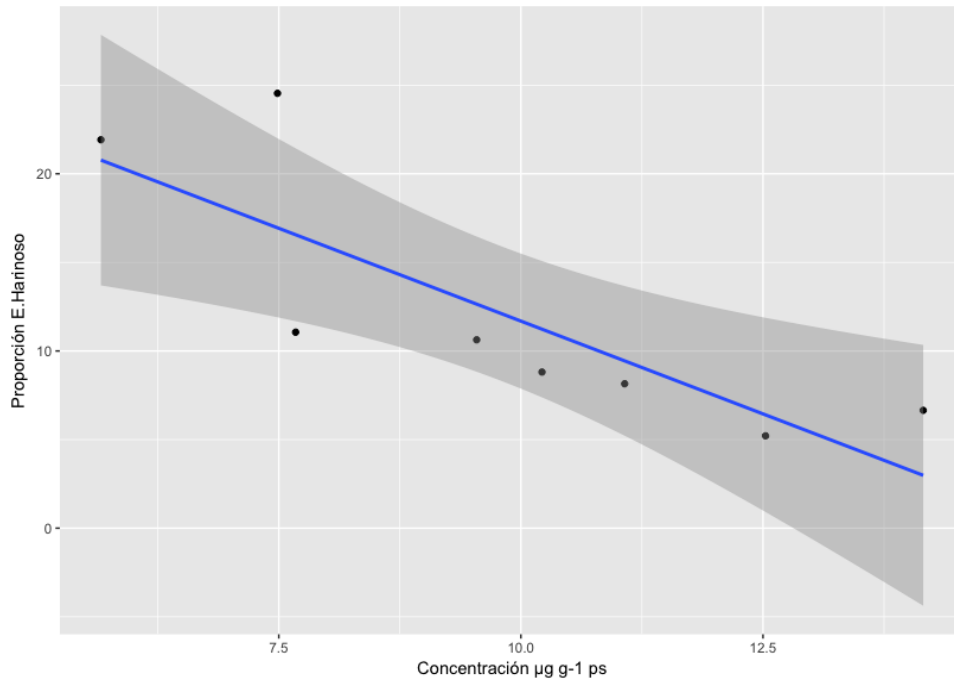


Figura 2.2 Diagrama de dispersión de la relación entre el porcentaje de endospermo harinoso y el contenido inicial de β -criptoxantina de 8 líneas de maíz con alto contenido en β -criptoxantina.

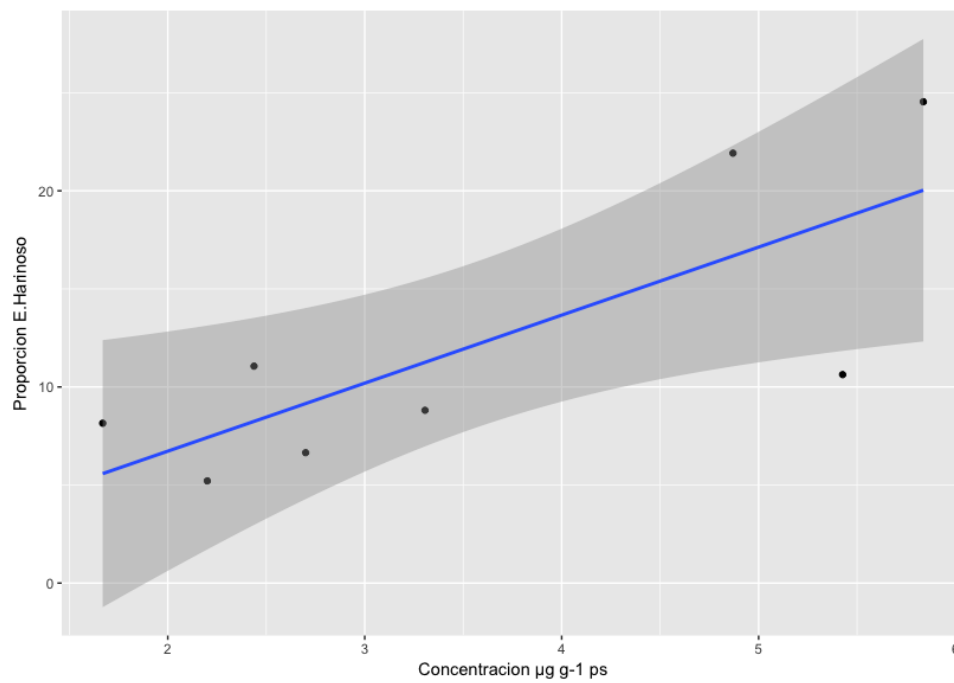


Figura 2.3 Diagrama de dispersión de la relación entre el porcentaje de endospermo harinoso y el contenido inicial de β -caroteno de 8 líneas de maíz con alto contenido en β -criptoxantina.

La correlación de los valores k de β -caroteno y la proporción del endospermo harinoso, también fue positiva (Cuadro 2.4). En genotipos con mayor proporción de endospermo harinoso, se observó una degradación mayor de β -caroteno.

Además, hubo una correlación entre el valor k de β -caroteno y la proporción del pericarpio en el grano (Cuadro 2.4). A mayor degradación de β -caroteno, fue menor la proporción del pericarpio en el grano. Se conoce que la proporción del pericarpio disminuye a medida que el grano de maíz tiende a ser suave. La suavidad de los granos de maíz se debe principalmente a la mayor proporción del endospermo harinoso. Las anteriores dos correlaciones apoyan la idea de que posiblemente el lugar de almacenamiento de β -caroteno dentro del grano en el endospermo harinoso, influye en su degradación. La baja compactación de las moléculas de almidón y proteína dentro del endospermo harinoso puede facilitar la acción del O_2 y la consecuente degradación de carotenos.

Muzhingi *et al.*, (2016) reportaron correlación entre la concentración de β -caroteno y α -TF. Los autores sugieren que α -TF puede estabilizar a los carotenoides en el almacenamiento, evitando la oxidación de la harina, sin embargo su trabajo fue únicamente en grano sin incluir periodos de almacenamiento. En el presente estudio, la única correlación entre carotenoides y TCCM se observó entre luteína y α -T3. El valor k de luteína fue bajo cuando la concentración de α -T3 fue alta. Esta interpretación resulta de la correlación negativa y significativa observada (Cuadro 2.4). Sin embargo, se necesitarían más estudios para corroborar que la estabilidad se genere a causa de los TCCM y no por la estabilidad *per se* de las xantófilas. Este es el primer estudio donde se correlaciona la estabilidad de xantófilas con las concentraciones de TCCM.

Se observó correlación positiva y significativa entre la concentración inicial β -criptoxantina y ORAC ($r^2= 0.82$, $p < 0.01$; Figura 2.4). Así como una correlación positiva y significativa entre los valores k de degradación de luteína, zeaxantina y β -criptoxantina con ORAC (Cuadro 2.4). Estos resultados muestran que la concentración de β -criptoxantina puede estar contribuyendo con la capacidad antioxidante observada, aunque se ha sugerido que la mayor concentración de β -caroteno y β -criptoxantina en el maíz biofortificado con PVA no es suficiente para justificar la alta capacidad antioxidante (Muzhingi *et al.*, 2016). La discrepancia de estos resultados con los estudios previos,

puede atribuirse a la alta concentración de β -criptoxantina de estos genotipos. Adicionalmente, la capacidad antioxidante aportada por la β -criptoxantina se afirma también con la correlación positiva de los valores k de xantófilas y los valores del ORAC. A mayor degradación de luteína, zeaxantina y β -criptoxantina, la mayor cuantificación de la actividad antioxidante (Cuadro 2.4).

Cuadro 2.4 Correlación de la concentración tococromanoles y proporción de las estructuras del grano con los valores k de degradación de carotenoides en ocho líneas de maíz altas en β -criptoxantina.

	LUT ^d	ZEAX ^d	β CX ^d	β C ^d	13 cis β C ^d	9 cis β C ^d	PVA ^d
α -T3 ^a	-0.75 *	-0.57 ns	-0.52 ns	0.44 ns	-0.16 ns	-0.55 ns	-0.2 ns
γ -TF ^a	-0.05 ns	-0.23 ns	-0.29 ns	-0.09 ns	-0.42 ns	-0.44 ns	-0.47 ns
α -TF ^a	-0.15 ns	-0.14 ns	-0.09 ns	-0.29 ns	-0.36 ns	-0.18 ns	-0.31 ns
Pericarpio ^b	0.73 *	0.39 ns	0.31 ns	-0.76 *	-0.35 ns	0.29 ns	-0.29 ns
Germen ^b	-0.17 ns	0.03 ns	0.03 ns	0.31 ns	0.1 ns	-0.08 ns	0.13 ns
E.Vitreo ^b	0.54 ns	0.5 ns	0.48 ns	-0.57 ns	-0.28 ns	0.34 ns	-0.13 ns
E.Harinoso ^b	-0.6 ns	-0.33 ns	-0.25 ns	0.7 *	0.51 ns	-0.1 ns	0.42 ns
ORAC ^c	0.87 **	0.78 *	0.75 *	-0.63 ns	0.11 ns	0.68 ns	0.23 ns

^a $\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco; ^b Porcentaje; ^c $\mu\text{MTE } 100\text{g}^{-1}$; ^d Valor k ; *,** Significativo al $P < 0.05$ y $P < 0.01$, respectivamente; ns: no significativo; α -T3, α -tocotrienol; γ -TP, γ -tocoferol; α -TF, α -tocoferol; LUT, luteína; ZEA, zeaxantina; β CX, β -criptoxantina; β C, β -caroteno; PVA, Provitamina A.

Sin embargo, un dato interesante es que la capacidad antioxidante no tuvo diferencias significativas a lo largo del tiempo del experimento (datos no mostrados). Por lo que si esta relación se debe al poder antioxidante de las xantófilas, la capacidad antioxidante de estas es pequeña pero significativa. El poder antioxidante de los carotenoides fue reportado por Zilic *et al.* (2012), quienes sugieren que β -caroteno influye en la capacidad antioxidante medida en el maíz amarillo normal usando el reactivo 2,2'-azino-bis (3-de etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico).

2.4.5 Análisis de componentes principales.

El diagrama de dispersión de los dos primeros componentes principales en los doce caracteres evaluados se muestran en la Figura 2.4. El segundo componente principal explica el 29.7 % de la varianza total existente. Se observó una agrupación de la concentración de luteína y zeaxantina con la proporción de germen.

Adicionalmente, el primer componente principal explica el 44.2 % de la varianza total existente. Se observó que caracteres como la proporción de pericarpio, endospermo vítreo, ORAC y la concentración de β -criptoxantina, se agruparon en donde predominan

las líneas 13, 14, 16 y 18 que presentaron los valores k de β -caroteno más bajos. Por su alto contenido en β -criptoxantina baja degradación de β -caroteno y la alta capacidad antioxidante (Cuadro 2.1), estas cuatro líneas de maíz podrían ser utilizadas en el programa de mejoramiento de maíces biofortificados con PVA, a fin de contribuir a una mayor estabilidad de los carotenos PVA.

A la derecha de la Figura 2.4 en el eje horizontal del primer componente principal, se agrupa la concentración inicial de β -caroteno con la proporción del endospermo harinoso y la concentración inicial de α -T3. Este agrupamiento corrobora lo ya visto en las correlaciones (Figura 2.3).

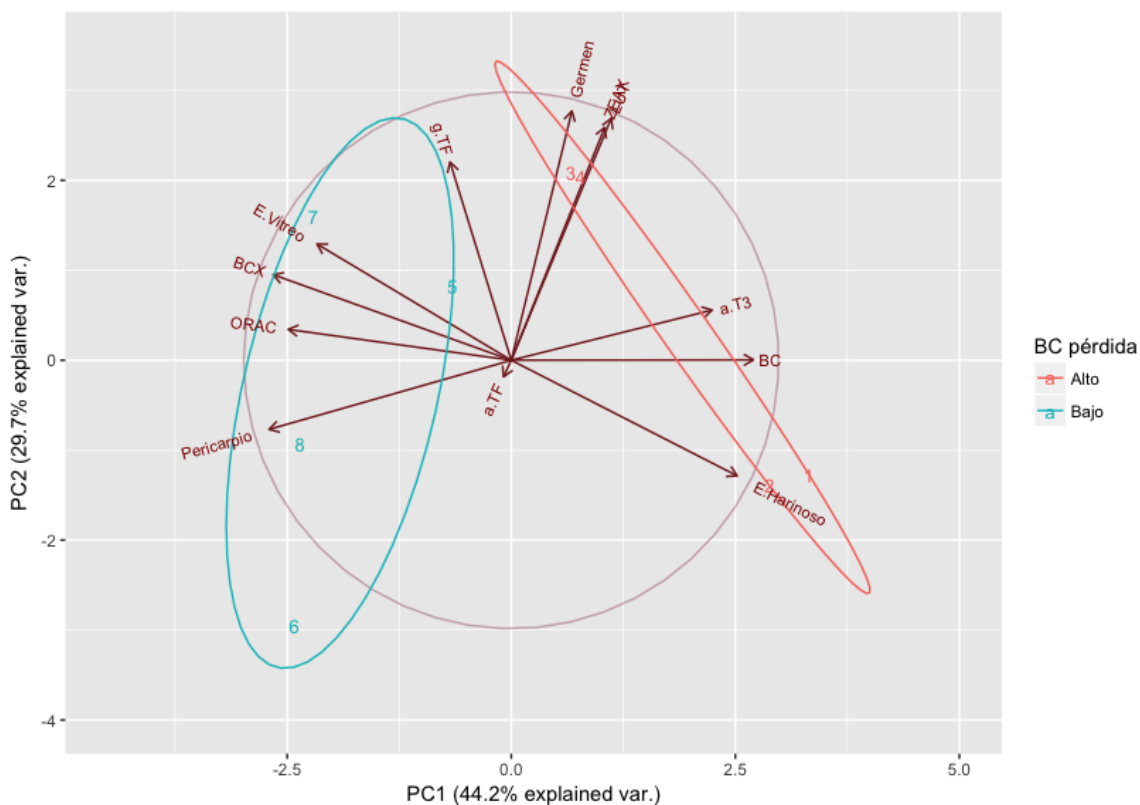


Figura 2.4 Diagrama de componentes principales de características de físicas de grano, ORAC, concentraciones iniciales de tococromanoles y carotenoides en las ocho líneas de maíz analizadas. α -T3, α -tocotrienol; γ -TP, γ -tocoferol; α -TF, α -tocoferol; LUT, luteína; ZEAX, zeaxantina; β CX, β -criptoxantina; β C, β -caroteno; PVA, Provitamina A.

2.5 CONCLUSIONES

La proporción de los TCCM no fue modificada por el aumento de β -criptoxantina en el grano de las líneas aquí estudiadas.

La retención de β -criptoxantina fue más alta que la de β -caroteno, y ambos compuestos fueron más retenidos en grano entero en almacenamiento comparado con grano desgerminado bajo y almacenado. La mayor cantidad de compuestos que generan la actividad antioxidante en el maíz se ubican en el germen. Posiblemente esto generó que la tasa de degradación de carotenoides PVA fuera significativamente más baja en grano entero en comparación con el grano degerminado.

Sin embargo, la concentración de β -criptoxantina en el endospermo también puede estar contribuyendo con la capacidad antioxidante observada.

Las mayores concentraciones de β -caroteno se encontraron en el endospermo harinoso, mientras la β -criptoxantina se acumuló mayoritariamente en el endospermo vítreo. Esta diferenciación en la deposición de los carotenos PVA puede jugar un papel importante en su estabilidad. Por lo tanto sería importante investigar más a fondo, con estudios de microscopía, a fin de determinar si dichos carotenos se encuentran a su vez acumulados en estructuras específicas que puedan brindarles aún más estabilidad.

La información aquí presentada puede ser necesaria para tomar en cuenta en la selección de genotipos más estables en el desarrollo de maíz biofortificado con PVA. Y se recomiendan las líneas 13, 14, 16 y 18 por la mayor estabilidad de los carotenos PVA durante su almacenamiento.

2.6 LITERATURA CITADA

Andersson, M.S., A. Saltzman, V. P.S., and W.H. Pfeiffer. 2017. Progress update: Crop development of biofortified staple food crops under harvestplus. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development* 17: 11905-11935. doi:10.18697/ajfand.78.HarvestPlus05.

Babu, Raman, Natalia Palacios Rojas, Shibin Gao, Jianbing Yan, and Kevin Pixley. 2012. "Validation of the Effects of Molecular Marker Polymorphisms in LcyE and CrtRB1 on Provitamin A Concentrations for 26 Tropical Maize Populations." *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik* 126 (2): 389–99. doi:10.1007/s00122-012-1987-3.

Bai, Chao, Teresa Capell, Judit Berman, Vicente Medina, Gerhard Sandmann, Paul

- Christou, and Changfu Zhu. 2016. "Bottlenecks in Carotenoid Biosynthesis and Accumulation in Rice Endosperm Are Influenced by the Precursor-Product Balance." *Plant Biotechnology Journal* 14 (1): 195–205. doi:10.1111/pbi.12373.
- Berman, Judit, Uxue Zorrilla-López, Vicente Medina, Gemma Farré, Gerhard Sandmann, Teresa Capell, Paul Christou, and Changfu Zhu. 2017. "The Arabidopsis ORANGE (AtOR) Gene Promotes Carotenoid Accumulation in Transgenic Corn Hybrids Derived from Parental Lines with Limited Carotenoid Pools." *Plant Cell Reports* 36 (6). Springer Berlin Heidelberg: 933–45. doi:10.1007/s00299-017-2126-z.
- Bouis, Howarth E, and Amy Saltzman. 2017. "Improving Nutrition through Biofortification: A Review of Evidence from HarvestPlus, 2003 through 2016." *Global Food Security* 12. Elsevier B.V.: 49–58. doi:10.1016/j.gfs.2017.01.009.
- Cabrera-Soto, Luisa, Kevin V. Pixley, Aldo Rosales-Nolasco, Luis A. Galicia-Flores, and Natalia Palacios-Rojas. 2018. "Carotenoid and Tocochromanol Profiles during Kernel Development Make Consumption of Biofortified 'Fresh' Maize an Option to Improve Micronutrient Nutrition." Research-article. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66 (36). American Chemical Society: 9391–98. doi:10.1021/acs.jafc.8b01886.
- Che, Ping, Zuo-Yu Zhao, Kimberly Glassman, David Dolde, Tiger X. Hu, Todd J. Jones, Silas Obukosia, Florence Wambugu, and Marc C. Albertsen. 2016. "Elevated Vitamin E Content Improves All- *Trans* β -Carotene Accumulation and Stability in Biofortified Sorghum." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (39): 11040–45. doi:10.1073/pnas.1605689113.
- Cho YS, Yeum KJ, Chen CY, Beretta G, Tang G, Krinsky NI *et al.*, Phytonutrients affecting hydrophilic and lipophilic antioxidant activities in fruits, vegetables and legumes. *J Sci Food Agric* 87: 1096–1107 (2007)
- Corrales-Bañuelos, Ana Belinda, Edith Oliva Cuevas-Rodríguez, Janet Alejandra Gutiérrez-Urbe, Evelia María Milán-Noris, Cuauhtémoc Reyes-Moreno, Jorge Milán-Carrillo, and Saraid Mora-Rochín. 2016. "Carotenoid Composition and Antioxidant Activity of Tortillas Elaborated from Pigmented Maize Landrace by Traditional Nixtamalization or Lime Cooking Extrusion Process." *Journal of Cereal Science* 69: 64–70. doi:10.1016/j.jcs.2016.02.009.
- De Moura, Fabiana F., Alexander Miloff, and Erick Boy. 2013. "Retention of Provitamin A Carotenoids in Staple Crops Targeted for Biofortification in Africa: Cassava, Maize and Sweet Potato." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1269 (July 2016): 130801154147002. doi:10.1080/10408398.2012.724477.
- Dhliwayo, T, N Palacios-Rojas, J Crossa, and Kv Pixley. 2014. "Effects of S1 Recurrent Selection for Provitamin-A Carotenoid Content for Three Open-Pollinated Maize Cultivars." *Crops.Org*, no. december: 2449–60. doi:doi:10.2135/cropsci2013.11.0764.
- Gayen, Dipak, Nusrat Ali, Sailendra Nath Sarkar, Swapan K. Datta, and Karabi Datta. 2015. "Down-Regulation of Lipoxigenase Gene Reduces Degradation of Carotenoids of Golden Rice during Storage." *Planta* 242: 353–363. doi:10.1007/s00425-015-2314-4.
- Goffman FD and Böhme T, Relationship between fatty acid profile and vitamin E content in maize hybrids (*Zea mays* L.). *J Agric Food Chem* 49: 4990–4994 (2001).
- Lipka, Alexander E., Michael A. Gore, Maria Magallanes-Lundback, Alex Mesberg,

- Haining Lin, Tyler Tiede, Charles Chen, *et al.* 2013. "Genome-Wide Association Study and Pathway-Level Analysis of Tocochromanol Levels in Maize Grain." *G3: Genes/Genomes/Genetics* 3 (8): 1287–99. doi:10.1534/g3.113.006148.
- Masisi, K., Diehl-Jones, W. L., Gordon, J., Chapman, D., Moghadasian, M. H., & Beta, T. (2015). Carotenoids of aleurone, germ, and endosperm fractions of barley, corn and wheat differentially inhibit oxidative stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 2715–2724.
- Menkir, Abebe;, Natalia; Palacios-Rojas, Oladeji; Alamu, Maria Cristina; Dias Paes, Thanda; Dhliwayo, Bussie; Maziya-Dixon, Wende; Mengesha, *et al.* 2018. "Vitamin A-Biofortified Maize: Exploiting Native Genetic Variation for Nutrient Enrichment." *SCIENCE BRIEF: BIOFORTIFICATION*. Vol. 2.
- Muzhingi, Tawanda, Natalia Palacios-Rojas, Alejandra Miranda, Maria L. Cabrera, Kyung J. Yeum, and Guangwen Tang. 2016. "Genetic Variation of Carotenoids, Vitamin E and Phenolic Compounds in Provitamin A Biofortified Maize." *Journal of the Science of Food and Agriculture*, no. February. doi:10.1002/jsfa.7798.
- Ndolo, Victoria U, and Trust Beta. 2013. "Distribution of Carotenoids in Endosperm, Germ, and Aleurone Fractions of Cereal Grain Kernels." *Food Chemistry* 139. Elsevier Ltd: 663–71. doi:10.1016/j.foodchem.2013.01.014.
- Nogueira, M., L. Mora, E. M. A. Enfissi, P. M. Bramley, and P. D. Fraser. 2013. "Subchromoplast Sequestration of Carotenoids Affects Regulatory Mechanisms in Tomato Lines Expressing Different Carotenoid Gene Combinations." *The Plant Cell* 25 (11): 4560–79. doi:10.1105/tpc.113.116210.
- Ortiz-Monasterio, J. I., N. Palacios-Rojas, E. Meng, K. Pixley, R. Trethowan, and R. J. Peña. 2007. "Enhancing the Mineral and Vitamin Content of Wheat and Maize through Plant Breeding." *Journal of Cereal Science* 46 (3): 293–307. doi:10.1016/j.jcs.2007.06.005.
- Ortiz, Darwin, Torbert Rocheford, and Mario G Ferruzzi. 2016. "Influence of Temperature and Humidity on the Stability of Carotenoids in Biofortified Maize (*Zea Mays* L.) Genotypes during Controlled Post-Harvest Storage." *Agricultural and Food Chemistry* 64 (13): 2727–36. doi:10.1021/acs.jafc.5b05698.
- Paolillo DJ, Garvin DF, Parthasarathy MV (2004) The chromoplasts of Or mutants of cauliflower (*Brassica oleracea* L var. botrytis). *Protoplasma* 224:245–253
- Pfeiffer, Wolfgang H., and Bonnie McClafferty. 2007. "HarvestPlus: Breeding Crops for Better Nutrition." *Crop Science* 47 (SUPPL. DEC.). doi:10.2135/cropsci2007.09.0020IPBS.
- Pixley, Kevin, Natalia Palacios-Rojas, Raman Babu, Raphael Mutale, Rebecca Surles, and Eliab Simpungwe. 2013. "Biofortification of Maize with Provitamin A Carotenoids." In *Carotenoids and Human Health SE-17. Humana Press*, In: S.A. T, 271–92. New York, NY. doi:10.1007/978-1-62703-203-2.
- R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Salinas-Moreno, Y., & Vázquez-Carrillo, G. (2006). Folleto Técnico No. 23, Metodologías de análisis de la calidad nixtamalera- tortillera en maíz (91 pp.). Chapingo, Edo de México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.

- Schaub, Patrick, Florian Wüst, Julian Koschmieder, Qiuju Yu, Parminder Virk, Joe Tohme, and Peter Beyer. 2017. "Nonenzymatic β -Carotene Degradation in Provitamin A-Biofortified Crop Plants." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65 (31): 6588–98. doi:10.1021/acs.jafc.7b01693.
- Schmaelzle, S., B. Gannon, S. Crawford, S.A. Arcsott, S. Goltz, N. Palacios-Rojas, K.V. Pixley, P.W. Simon, and S.A. Tanumi-hardjo. 2014. Maize genotype and food matrix affect the provitamin A carotenoid bioefficacy from staple and carrot-fortified feeds in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *J. Agric. Food Chem.* 62:136–143. doi:10.1021/jf403548w
- Simpungwe, E., T. Dhliwayo, M. Palenberg, V. Taleon, E. Birol, A. Oparinde, A. Saltzman, and M.T. Diressie. 2017. Orange maize in zambia: Crop development and delivery experience. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development* 17: 11973-11999. doi:10.18697/ajfand.78.HarvestPlus08.
- Sowa, Margaret, Jiaoying Yu, Natalia Palacios-Rojas, Shellen R. Goltz, Julie A. Howe, Christopher R. Davis, Torbert Rocheford, and Sherry A. Tanumihardjo. 2017. "Retention of Carotenoids in Biofortified Maize Flour and β -Cryptoxanthin-Enhanced Eggs after Household Cooking." *ACS Omega* 2 (10): 7320–28. doi:10.1021/acsomega.7b01202.
- Suwarno, Willy B., Kevin V. Pixley, Natalia Palacios-Rojas, Shawn M. Kaeppler, and Raman Babu. 2015. "Genome-Wide Association Analysis Reveals New Targets for Carotenoid Biofortification in Maize." *Theoretical and Applied Genetics*. doi:10.1007/s00122-015-2475-3.
- Taleon, Víctor, Luke Mugode, Luisa Cabrera-Soto, and Natalia Palacios-Rojas. 2017. "Carotenoid Retention in Biofortified Maize Using Different Post-Harvest Storage and Packaging Methods." *Food Chemistry* 232: 60–66. doi:10.1016/j.foodchem.2017.03.158.
- Zhang, Ruifen, Long Huang, Yuanyuan Deng, Jianwei Chi, and Yan Zhang. 2017. "Phenolic Content and Antioxidant Activity of Eight Representative Sweet Corn Varieties Grown In." *International Journal of Food Properties* 20 (12). Taylor & Francis: 3043–55. doi:10.1080/10942912.2016.1270964.
- Žilic S, Serpen A, Akillio glu G, Gökmen V and Vancetovic J, Phenolic compounds, carotenoids, anthocyanins, and antioxidant capacity of colored maize (*Zea mays* L.) kernels. *J Agric Food Chem* 60: 1224–1231 (2012).

2.7 ANEXOS

Cuadro 2.5 Porcentaje de retención de carotenoides en ocho genotipos de maíz durante el almacenamiento.

GE	Genotipo								Media	Min	Max
	1	2	3	4	5	6	7	8			
LUT	93.17	91.07	86.53	89.53	86.90	78.43	77.22	88.80	86.45	77.22	93.17
ZEAX	89.60	90.96	79.73	80.21	87.44	77.00	70.89	91.06	83.36	70.89	91.06
β CX	76.69	79.04	76.87	71.82	77.14	71.92	66.48	85.82	75.72	66.48	85.82
β C	43.05	56.41	58.90	47.65	76.95	72.64	78.79	81.90	64.54	43.05	81.90
13cis β C	54.08	68.91	71.65	61.58	83.11	62.94	67.26	87.11	69.58	54.08	87.11
9cis β C	73.19	79.49	77.24	77.17	85.20	49.44	52.54	89.65	72.99	49.44	89.65
PVA	57.05	66.95	70.37	61.41	78.42	62.71	62.97	85.39	68.16	57.05	85.39
GD											
LUT	92.89	88.84	93.18	88.91	75.95	68.52	90.73	76.93	84.49	68.52	93.18
ZEAX	82.50	85.41	93.91	93.00	83.40	65.04	86.58	82.41	84.03	65.04	93.91
β CX	71.75	67.08	74.67	67.02	79.12	71.59	79.38	75.66	73.28	67.02	79.38
β C	43.71	51.23	60.95	47.70	77.14	55.28	74.58	81.80	61.55	43.71	81.80
13cis β C	63.96	63.29	74.67	59.06	86.50	65.68	83.97	86.47	72.95	59.06	86.50
9cis β C	75.09	69.42	78.97	68.69	88.19	68.26	80.71	87.66	77.12	68.26	88.19
PVA	57.98	59.52	70.84	58.73	80.14	65.67	78.84	78.90	68.83	57.98	80.14

GE, Grano entero; GD, grano degerminado; LUT, luteína; ZEA, zeaxantina; β CX, β -criptoxantina; β C, β -caroteno; PVA, Provitamina A.

Cuadro 2.6 Correlación de los valores k de degradación y concentración inicial de carotenos analizado en el promedio de las ocho genotipos de maíz.

	LUT ^b	ZEAX ^b	β CX ^b	β C ^b	13 cis β -C ^b	9 cis β -C ^b	PVA
LUT ^a	-0.25 ns	-0.2 ns	0.24 ns	0.14 ns	0.05 ns	0.14 ns	0.16 ns
ZEAX ^a	-0.24 ns	-0.18 ns	0.36 ns	0.22 ns	0.17 ns	0.23 ns	0.3 ns
BCX ^a	0.74 **	0.49 *	0.28 ns	-0.76 **	-0.46 ns	0.01 ns	-0.4 ns
BC ^a	-0.83 **	-0.64 **	-0.23 ns	0.82 **	0.51 *	-0.05 ns	0.68 **
13cis β -C ^a	-0.51 *	-0.3 ns	0.2 ns	0.57 *	0.62 **	0.36 ns	0.48 ns
9cis β -C ^a	-0.29 ns	-0.12 ns	0.51 *	0.43 ns	0.66 **	0.63 **	0.75 **

^a μ g g⁻¹ peso seco; ^b Valor k ; *,** Significativo al $P < 0.05$ y $P < 0.01$, respectivamente; ns: no significativo; LUT, luteína; ZEA, zeaxantina; β CX, β -criptoxantina; β C, β -caroteno; PVA, Provitamina A.

CAPÍTULO 3. CONDICIONES DE ESTRÉS POR SEQUÍA Y NITRÓGENO LIMITADO DEL SUELO SOBRE LOS CAROTENOIDES PROVITAMINA-A DEL GRANO DE MAÍZ

3.1 RESUMEN

En diferentes países del África subsahariana se han liberado híbridos de maíz (*Zea mays*, L) con altos contenidos de carotenos provitamina A (PVA). Se desconoce cómo la sequía y estrés por limitación de nitrógeno (N₂) afectan a la PVA y a otros carotenoides esenciales en el grano de maíz. El bajo N₂ del suelo y el estrés por sequía son comunes en campos de pequeños agricultores, por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de estas dos condiciones sobre el contenido de carotenos PVA de híbridos de maíz derivados de un apareamiento dialélico de 11 líneas mejoradas. Los resultados mostraron una concentración en promedio alta de PVA en condiciones óptimas, seguido de estrés por sequía y un promedio bajo en condiciones de N₂ limitado. El análisis de varianza combinado reveló efectos ACG y ACE altamente significativos ($P < 0.01$) para PVA. Sin embargo, los efectos de ACG representaron el 96% de la suma de cuadrados de híbridos para PVA, lo que indica un predominio de la variación genética aditiva sobre la no aditiva. Los efectos de ACG también fueron altamente significativos ($P < 0.01$) para PVA en condiciones de N₂ limitado y estrés por sequía. Los efectos de ACE no fueron estadísticamente significativos bajo el estrés por sequía y solo significativos a $P < 0.05$ bajo estrés de bajo N₂. Las estimaciones de ACG revelaron que aunque la magnitud de los efectos variaban entre los tratamientos, la clasificación de las líneas puras era consistente entre los tratamientos bajo el estrés. Estos resultados sugieren que el tipo de acción génica de los carotenos PVA no se ve afectado por la sequía o el estrés de bajo N₂ y confirman estudios previos que muestran un predominio de los efectos aditivos sobre los no aditivos. Aunque la concentración de PVA fue baja en genotipos sembrados bajo estrés por sequía como en estrés por N₂ limitado, la falta de interacción cruzada de PVA indica que no se requiere usar fuentes de germoplasma distintas en cada tipo de estrés.

Abreviaturas: CIMMYT, Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo; ACG, aptitud combinatoria general; HPLC, cromatografía líquida de alto rendimiento; IITA, Instituto Internacional de Agricultura Tropical; SAM, selección asistida por marcadores; CPA, cultivar de polinización abierta; PVA, Provitamina A; ACE, aptitud combinatoria específica.

3.2 INTRODUCCIÓN

El maíz es un cultivo básico para cientos de millones de personas en África subsahariana y América Latina. Alimentos de maíz proporcionan más del 30% del total de calorías y proteínas en 11 países, entre ellos Guatemala, Lesotho, Malawi, Zambia y Zimbabue (Atlin *et al.*, 2011; Tanumihardjo *et al.*, 2010). Las dietas de algunas poblaciones de estos países consisten predominantemente de maíz. El maíz contiene poca o ninguna vitamina A, además de ser deficiente de otros micronutrientes como hierro y zinc. Los problemas de salud asociados a la deficiencia de vitamina A, son altos en países con alto consumo *per cápita* de maíz, por ejemplo, Zambia, Malawi y Zimbabue. Los programas de suplementación y fortificación de alimentos no han sido suficientes debido a la falta de infraestructura (Pixley *et al.*, 2013). Además, la mayoría de los consumidores en los países de bajo ingreso son agricultores que producen sus propios alimentos, sin acceso rápido a estos alimentos fortificados. La diversificación de la dieta a través del consumo de frutas y verduras es una opción viable. Sin embargo, por si sola ésta estrategia es insuficiente debido a la naturaleza estacional en la producción de dichos alimentos.

La biofortificación está definida como el mejoramiento de cultivos básicos con el objetivo de aumentar la densidad de micronutrientes (Bouis *et al.*, 2011; Bouis y Welch, 2010; Pfeiffer y McClafferty, 2007; Pixley *et al.*, 2013). Esta es una estrategia práctica y económicamente viable para combatir las deficiencias de micronutrientes en los países en desarrollo. HarvestPlus (<http://www.harvestplus.org>) proyecto del grupo consultivo de investigación agrícola internacional (CGIAR, por sus siglas en inglés) está dedicado al mejoramiento de cultivos para elevar los niveles de micronutrientes. Para combatir la deficiencia de vitamina A en África subsahariana, HarvestPlus está invirtiendo en investigación y desarrollo de maíz provitamina A (PVA). A la fecha, han sido liberados

híbridos mejorados, con cantidades de PVA que cumplen con el 50 - 80% del objetivo ($15 \mu\text{g g}^{-1}$), en Zambia, Malawi, Zimbabue y Tanzania (Andersson *et al.*, 2017; Pixley *et al.*, 2013; Simpungwe *et al.*, 2017).

En plantas, la ruta biosintética de carotenoides ha sido bien estudiada y los genes involucrados han sido clonados y caracterizados (Cuttriss *et al.*, 2011; Vallabhaneni *et al.*, 2009; Von Lintig, 2010; Wurtzel *et al.*, 2012). La caracterización de la ruta biosintética facilitó la identificación de genes que controlan pasos críticos en maíz (Harjes *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2010). La selección de alelos favorables de tres loci como *fitoeno sintasa (Psy)*, *licopeno épsilon sintasa (Lcy)* y *caroteno hidroxilasa 1 (CrtRB1)* ha sido eficaz en el aumento del contenido de PVA en el maíz. La estrategia incluyó la selección del alelo mutante de *Psy* para aumentar el flujo hacia la vía de los carotenoides en lugar de otras vías de síntesis (ej. Quinonas o vitamina E). Además de la selección del mutante de *Lcy* que reduce el flujo de síntesis de compuestos de la rama alfa y favorece la síntesis en el lado beta, hacia el β -caroteno y β -criptoxantina que tienen actividad PVA (Chandler *et al.*, 2013; Harjes *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2010). La selección para el alelo favorable en el locus *CrtRB1*, ha resultado en un contenido de PVA cuatro veces mayor que el alelo de tipo salvaje (Babu *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2010). Además, la variación genética de loci claves ha sido explotada para crear diversidad permitiendo, mediante la selección, alcanzar los niveles adecuados de PVA para beneficiar la nutrición humana (Azmach *et al.*, 2013; Dhliwayo *et al.*, 2014; Suwarno *et al.*, 2014).

Estudios anteriores de aptitud combinatoria para PVA y otros carotenoides revela un predominio de los efectos genéticos aditivos sobre los no aditivos. Egesel *et al.* (2003) con un cruzamiento dialélico de 10 líneas puras, observaron que del 72 al 87% de la suma de cuadrados totales de híbridos para todos los carotenoides se debió a la aptitud combinatoria general (ACG). Suwarno *et al.* (2014), en 156 híbridos provenientes de un diseño de apareamiento dialélico parcial entre 21 líneas puras, observaron predominio de ACG, con poco o ningún efecto de ACE para β -criptoxantina y β -caroteno. Varios estudios también muestran que los carotenoides son altamente estables a través de ambientes, con estimaciones de heredabilidad que van desde aproximadamente 0,5 a 0,9 (Chander *et al.*, 2008; Dhliwayo *et al.*, 2014; Senete *et al.*, 2011; Suwarno *et al.*, 2014, 2015). La preponderancia de ACG sobre los efectos de ACE y las estimaciones

generalmente altas de heredabilidad sugieren que se puede hacer un rápido progreso de selección para PVA. Dhliwayo *et al.* (2014), reportaron un aumento lineal del 25% por ciclo de la selección recurrente de S1 para los carotenoides PVA en tres poblaciones. Otra evidencia de un rápido progreso en la selección de carotenoides PVA proviene de los programas de mejoramiento HarvestPlus. Por un lado, a través del mejoramiento convencional, los niveles de PVA en el germoplasma aumentaron de 2-3 $\mu\text{g g}^{-1}$ en 2004 a 7-8 $\mu\text{g g}^{-1}$ en 2012, cerca del 300% en ocho años (Pixley *et al.*, 2013). Por otro lado, la concentración de β -caroteno en líneas de maíz aumentó hasta 12.6 veces cuando se hizo una introgresión de *CrtRB1* basada en la selección asistida por marcadores (SAM; Muthusamy *et al.*, 2014).

El desarrollo y evaluación de híbridos PVA y variedades de polinización abierta (VPA) se realizan principalmente en campos experimentales, con manejo agronómico óptimo, incluyendo la aplicación de fertilizante, así como el riego en caso de períodos secos durante el crecimiento de la planta. En contraste, los agricultores de bajos recursos en África Subsahariana cultivan maíz en condiciones de temporal, con frecuencia de sequías severas (Masih *et al.*, 2014) y sin o con cantidades limitadas de fertilizante (Morris *et al.*, 2007). Los efectos de la sequía y el bajo N_2 en el rendimiento del grano y otros rasgos agronómicos están bien documentados (Bänziger *et al.*, 1999; Bolaños y Edmeades, 1996; Lafitte y Edmeades, 1994; Trachsel *et al.*, 2016a). Sin embargo, se desconocen los efectos de la sequía y el bajo N_2 sobre el contenido de PVA en los híbridos y VPA de maíz. Esta información contribuirá al diseño de programas de mejoramiento eficaces para el desarrollo de híbridos y VPA con altos contenidos de PVA dirigidos a los agricultores de escasos recursos en el África subsahariana.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la sequía y el estrés de N_2 limitado en el contenido de PVA y rasgos de calidad de grano de híbridos de maíz biofortificados.

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1 Germoplasma experimental.

Se cruzaron once líneas endogámicas (Cuadro 3.1) en un esquema de apareamiento dialélico (Griffing, 1956) para formar 55 híbridos. Los parentales se seleccionaron según la variación en el contenido de PVA. Las líneas endogámicas CHPD1601, CHPD1602, CHPD1603, CLHP0366, CLHP0476 y CLHP0372 se derivaron de una línea pura obtenida del Instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA). Dichas líneas tienen el alelo favorable de *CrtRB1* de la línea templada “DE3” (Vallabhaneni *et al.*, 2009) así como el alelo *LycE* (Harjes *et al.*, 2008). Las cinco líneas de maíz se desarrollaron utilizando la SAM para los alelos favorables de los loci *CrtRB1* y *LycE* (Babu *et al.*, 2013). Estas líneas derivadas de “DE3”, que promedian $> 15 \mu\text{g g}^{-1}$, se seleccionaron principalmente para el contenido de PVA aunque algunas no son agrónomicamente competitivas (Cuadro 3.1). CLHP0020, CLHP0022, CLHP0003 y CLHP0068 son derivadas del germoplasma templado obtenido de la Universidad de Illinois. Dichas líneas se seleccionaron por su alto contenido PVA y su adaptación a ambientes tropicales (Pixley *et al.*, 2013). Estas líneas endogámicas contienen entre 7-10 $\mu\text{g g}^{-1}$ de PVA. Dichos contenidos pueden variar dependiendo del tiempo transcurrido entre la cosecha y el análisis de laboratorio y de las condiciones de almacenamiento. Adicionalmente, se utilizó la línea CML451, línea élite tropical de color amarillo con excelente potencial de rendimiento y resistencia a enfermedades. Esta línea contiene entre 2-4 $\mu\text{g g}^{-1}$ de PVA, concentración normal para las líneas de maíz amarillo que no se han mejorado para el contenido de PVA.

Las 11 líneas puras fueron genotipadas en los loci *CrtRB1* (los alelos 3' indel y 5'TE) y *LycE* (*LycE*-5'TE; Harjes *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2010). Los detalles sobre los alelos funcionales de los dos loci fueron descritos inicialmente por Harjes *et al.* (2008) para *LycE* y Yan *et al.* (2010) para *CrtRB1*. El ADN se extrajo de tejido de semilla utilizando el protocolo CTAB (Gao *et al.*, 2008). Las combinaciones de cebadores para los dos loci fueron descritas por Babu *et al.* (2013), y la PCR y la electroforesis en gel se realizaron de acuerdo con los métodos descritos por Yan *et al.* (2010) y Harjes *et al.* (2008).

Cuadro 3.1 Nombres, genealogías, contenido de provitamina A (PVA) y genotipos para los extremos 3 'y 5' del locus *CrtRB1* (*CrtRB1* 3' y *CrtRB1* 5', respectivamente) y el extremo 5 'del locus *LycE* para los 11 líneas cruzadas bajo un diseño dialélico para la formación de 55 híbridos.

Name†	Pedigree	<i>CrtRB1</i> 3'§	<i>CrtRB1</i> 5'§	<i>LycE</i> 5'§	PVA (µg g ⁻¹)
CLHP0020	KUIcarotenoidsyn-FS17-3-2-B*12	2	2	2	12.98
CHPD1601	(KUI carotenoidsyn-FS17-3-2-B-B-B/(KU1409/DE3/KU1409)-S2-18-2-B)-B-4(MAS:L4H1)-2-B*4	1	1	1	32.56
CLHP0022	KUI carotenoidsyn-FS25-3-2-B*10	2	2	1	10.42
CHPD1602	(KUI carotenoidsyn-FS11-1-1-B-B-B/(KU1409/DE3/KU1409)-S2-18-2-B)-B-2(MAS:L4H1)-2-B*4	1	1	1	25.08
CHPD1603	(KUI carotenoidsyn-FS17-3-2-B-B-B/(KU1409/DE3/KU1409)-S2-18-2-B)-B-3(MAS:L4H1)-4-B*5	1	1	1	37.17
CLHP0366	(KUI carotenoidsyn-FS17-3-2-B-B-B-B/(CML297/(KU1409/DE3/KU1409)S2-18-2-B))-B-26-1-B*3	1	1	1	23.90
CLHP0476	(CLQRCWQ97-B////(KUIcarotenoidsyn-FS17-3-2-B-B-B/(KU1409/DE3/KU1409)S2-18-2-B)//CarotenoidSyn3-FS11-4-3-B-B))-B-25-2-B*6	1	1	1	10.38
CLHP0372	(KUI carotenoidsyn-FS17-3-2-B-B-B-B/(CML297/(KU1409/DE3/KU1409)-S2-18-2-B))-B-46-3-B*3	1	1	1	10.70
CLHP0068	[[[NAW5867/P30SR]-43-2/[NAW5867/P30SR]-114-1]-9-3-3-B-1-B/CML395-1]-B-13-1-B-4-#[/BETASYN]BC1-8-1-1-1-B*8	2	2	2	7.06
CLHP0003	CML537/[BETASYN]BC1-10-3-#-B-*12	2	2	2	11.44
CML451	(NPH28-1/G25//NPH28-1)-2-1-1-3-1-B*6	2	2	2	2.37

† Las líneas endogámicas de CLHP se han seleccionado tanto para el rendimiento agronómico como para el contenido PVA; las líneas CHPD son líneas donadoras de alta concentración de PVA y no se seleccionaron para el rendimiento agronómico.

‡ En la genealogía, B * N (por ejemplo, B * 5) representa N veces la autofecundación.

§ Los números denotan el genotipo del locus, donde 1 es homocigoto para el alelo favorable y 2 es homocigoto para el alelo desfavorable.

3.3.2 Diseño de campo de experimentación y manejo agronómico.

Los 55 híbridos y un testigo (cruza de CML451 / CML486) se evaluaron en un diseño alfa látice (0,1) (Patterson *et al.*, 1978) con dos repeticiones en tres localidades. El ensayo se sembró en condiciones óptimas y en estrés de bajo N₂ en Agua Fría, Puebla, México (20° 32'N; lat. 110 msnm) durante la temporada de invierno (noviembre a mayo) en 2013. En condiciones óptimas y en estrés de sequía, los genotipos se sembraron en Tlaltzapán, Morelos, México (18° 41'N; lat. 945 msnm) durante las temporadas de invierno en 2013 y 2014. En condiciones óptimas y estrés por bajo N₂ se realizaron ensayos en Harare, Zimbabue (17° 48'S; lat. 1506 msnm) durante el verano (noviembre a mayo) en 2014. Así, en total se analizaron 8 ambientes de localidad / tratamiento. Los tamaños de las parcelas en Agua Fría y Tlaltzapán fueron dos surcos de 5 m con 0.75 m entre surcos y 0.15 m entre plantas dentro de un surco, para una población de siembra final de 88 000 plantas ha⁻¹. El tamaño de la parcela en Harare fue de un solo surco de 4 m, con 0.75 m entre surcos y 0.25 m entre plantas dentro de un surco, para una población de siembra de 54 000 plantas ha⁻¹.

Los ensayos de condiciones óptimas se manejaron de acuerdo con las prácticas agronómicas recomendadas en cada localidad. Dependiendo del tipo de suelo, etapa de cultivo, temperatura y evapotranspiración resultante, se aplicaron de 4 a 12 horas (correspondientes a 20-60 mm) de agua cada semana hasta la madurez fisiológica. El riego se aplicó en parcelas de Tlaltzapán y Agua Fría para garantizar que las plantas no se sometieran a estrés por humedad en ninguna etapa durante la temporada de crecimiento. En Harare, el ensayo en condiciones óptimas se realizó durante la temporada de lluvia, y se aplicó riego por aspersion a la primera señal de estrés hídrico (por ejemplo, hojas enrolladas). Los experimentos de bajo N₂ se realizaron en campos donde previamente se había agotado el N₂ del suelo. Se cultivó al menos cinco ciclos con cultivares no leguminosos y sin aplicar fertilizante nitrogenado. Además se cortó y eliminó la biomasa después de cada temporada. El manejo agronómico de ensayos con bajo contenido de N₂ siguió las prácticas agronómicas recomendadas, excepto la aplicación de fertilizante nitrogenado. La programación del riego para los ensayos con bajo N₂ se realizó como se describe para los experimentos óptimos en México y

Zimbabwe. Ensayos de bajo N₂ y condiciones óptimas se cultivaron en bloques separados en Agua Fría y Harare.

Los ensayos de sequía en Tlaltizapán se manejaron siguiendo los métodos descritos en Trachsel *et al.* (2016a). Brevemente, el último riego de aproximadamente 40 mm se aplicó a los 12-15 días antes de la floración para alcanzar el punto de marchitez permanente a una profundidad del suelo de 30-40 cm. Se aplicó riego adicional 14 días después de la antesis para asegurar un llenado adecuado del grano. El contenido de humedad del suelo se controló en todos los ensayos a lo largo del ciclo de cultivo utilizando un dispositivo Delta-T (Delta-T Devices, Cambridge, Reino Unido). Los datos de humedad se utilizaron junto con las observaciones de campo para la programación del riego. Ensayos de estrés por sequía y condiciones óptimas se cultivaron en el mismo bloque pero se separaron por seis surcos. El uso del riego por goteo permitió una aplicación más precisa del agua, por lo que no fue necesario plantar los ensayos en bloques separados.

Para el análisis de carotenoides se autopolinizaron 2-3 plantas de cada fila para producir grano F2 de todos los ensayos.

3.3.3 Medición de los datos de campo.

Los datos recolectados fueron, rendimiento de grano en Mg ha⁻¹ (ajustado a un contenido de humedad del 12.5%), días a la antesis (el número de días desde la plantación hasta cuando el 50% de las plantas emitieron el polen), días a la floración femenina (el número de días desde la plantación hasta el 50% de la aparición estigmas), altura de la planta en cm (distancia promedio de la superficie del suelo a la hoja bandera), acame de raíz (porcentaje de plantas inclinadas en un ángulo >30°), acame de tallo (porcentaje de plantas rotas debajo de la mazorca).

3.3.4 Análisis de carotenoides.

Se realizó la cuantificación de carotenoides a los genotipos de todos los ensayos. El grano se almacenó inmediatamente después de la cosecha a -80° C, para minimizar las pérdidas de carotenoides antes del análisis. Para la cuantificación de carotenoides se usó grano F2 obtenido de autopolinizaciones realizadas en cada parcela. Se tomaron

30 semillas por muestra que fueron molidas en molino, para obtener un tamaño de partícula de 0.5 mm. Después se realizó la extracción y análisis de carotenos según el protocolo descrito por Babu *et al.* (2013) por cromatografía líquida de alto rendimiento (UPLC, Waters Chromatography, Milford, MA). Los carotenos cuantificados fueron luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, β -caroteno y sus isómeros 9-cis y 13-cis β -caroteno. Los carotenoides se identificaron a través de sus espectros absorción característicos y la comparación de sus tiempos de retención con las soluciones estándar conocidas. El contenido total de PVA en $\mu\text{g g}^{-1}$ se calculó para cada muestra en base al peso seco, sumando β -caroteno y sus isómeros más el 50% de β -criptoxantina.

3.3.5 Características físicas del grano.

El peso de mil granos (PMG) se estimó pesando 100 granos con 13% de humedad, y multiplicando el peso por 10. PMG es una medida indirecta del tamaño del grano donde los granos pequeños tienen un PMG <330 g, los granos medianos varían entre 330-380 g, y los granos grandes son > 380 g (Vázquez-Carrillo *et al.*, 2016). El índice de flotación se realizó colocando 100 granos en un vaso de precipitados que contenía una solución de NaNO_3 (1.25 g/cm^3). El índice de flotación se determina contando el número de semillas flotantes en la solución y luego expresando el número como un porcentaje. Esta es una medida indirecta de la dureza del grano, descrita como el grado de compactación de los gránulos de almidón en el endospermo (Vázquez-Carrillo *et al.*, 2016). Para la determinación de las proporciones del grano se diseccionaron manualmente 10 granos de maíz. El pico, el pericarpio, el germen y el endospermo se secaron a 60° C , se pesaron y se expresaron como un porcentaje del peso de grano entero.

3.3.6 Análisis estadístico.

Se hicieron análisis de varianza (ANOVA) utilizando PROC MIXED (SAS Institute, 2008), según el modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_l + b_{kl} + v_{ij} + (\alpha v)_{ijl} + e_{ijkl} \quad [1]$$

$$v_{ij} = g_i + g_j + vs_{ij} \quad [2],$$

Donde Y_{ijkl} = valor de la característica observada de cada unidad experimental (parentales i y j ; k , repetición; l , medioambiente); μ = Media de la población; α_l = Efecto del medioambiente; b_{kl} = repetición dentro de medioambiente; v_{ij} = Efecto de híbrido F1 = $g_i + g_j + vs_{ij}$ [Donde g_i o g_j = Efecto de la aptitud combinatoria general (ACG) del parental ith o jth ; s_{ij} = Efecto de la aptitud combinatoria específica (ACE) del $ijth$ híbrido]; $(\alpha v)_{ijl}$ = Efecto de la interacción híbrido y medioambiente; e_{ijkl} = efecto residual.

El modelo utilizado para analizar los datos de cada ensayo se puede obtener de la ecuación [1], y ecuación [2] eliminando el efecto de localidad. El efecto de híbridos se consideró fijo, mientras que la localidad y los efectos de bloque se consideraron aleatorios. Las estimaciones de repetibilidad se calcularon de acuerdo con la fórmula de heredabilidad según lo descrito por Hallauer *et al.* (2010). El análisis dialélico se realizó utilizando DIALLEL-SAS05 (Zhang *et al.*, 2005) para el Modelo 4 de Griffing (Griffing, 1956). La prueba F para el efecto de híbridos y sus sub-particiones (ACG y ACE) se realizaron utilizando sus respectivas interacciones con la localidad como la varianza de error, mientras que las interacciones con el ambiente se evaluaron para determinar su significancia utilizando la varianza residual como el error. Se realizó un ANOVA en ocho ambientes (considerando localidades, años y tratamientos, cada uno como un ambiente) para evaluar la importancia de la interacción genotipo-ambiente. Después se realizaron por separado para cada uno de los tratamientos (óptimo, sequía y bajo N_2). Los coeficientes de correlación fenotípica de Pearson se calcularon para todos los carotenoides, para los rasgos agronómicos y características físicas de grano. Con ello se evaluó la respuesta de cada una de las características en tratamiento óptimo, de sequía y bajo N_2 . Se realizaron análisis estadísticos que incluían estimaciones de ACG para todos los rasgos de carotenoides y rendimiento de grano. Los rasgos agronómicos que no fueron significativos ($P < 0.05$) en el efectos híbridos se eliminaron de los análisis adicionales, y no se informaron sus resultados.

3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1 Contenido de carotenoides.

El promedio de la concentración de PVA en el grano de híbridos del dialelo a través de tratamientos de estrés fue de $12.90 \mu\text{g g}^{-1}$. El rango de promedios para híbridos individuales va desde $3.53 \mu\text{g g}^{-1}$ para CML451 / CLHP0068 a $22.62 \mu\text{g g}^{-1}$ para CHPD1603 / CHPD1601. Estos mismos híbridos coinciden con los valores más bajos y más altos en el contenido de β -caroteno: $1.39 \mu\text{g g}^{-1}$ para CML451 / CLHP0068 y $6.34 \mu\text{g g}^{-1}$ para CHPD1603 / CHPD1601, respectivamente; y los 55 híbridos promedian $7.57 \mu\text{g g}^{-1}$ de β -caroteno. El promedio para β -criptoxantina en los híbridos fue menor que β -caroteno ($3.94 \mu\text{g g}^{-1}$), variando desde $0.74 \mu\text{g g}^{-1}$ en el híbrido CHPD1602 / CHPD1601 a $10.50 \mu\text{g g}^{-1}$ en el híbrido CLHP0020 / CLHP0022. La media de carotenoides PVA de todos los híbridos del dialelo fue significativamente mayor que el control (CML451 / CML486), en cada tratamiento. Mientras que para los híbridos, la media de PVA, β -caroteno y β -criptoxantina fue de 12.90 , 7.57 y $3.94 \mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente, para el control CML451 / CML486 fue de 4.08 , 1.30 y $3.46 \mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente. El promedio del contenido de zeaxantina de los híbridos fue de $7.54 \mu\text{g g}^{-1}$ y luteína $2.92 \mu\text{g g}^{-1}$ y estos no fueron significativamente diferentes a los del híbrido control ($7.37 \mu\text{g g}^{-1}$ y $3.0 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente). Si se considera el híbrido control de grano amarillo como el nivel base, estos resultados sugieren que se ha logrado un progreso significativo en la mejora del maíz de los genotipos analizados. El aumento de carotenos PVA en el grano no afectó la concentración de los carotenoides no objetivo como luteína y zeaxantina. Estudios anteriores sobre el contenido de carotenoides en el germoplasma de maíz encontraron que, en general, el maíz tropical contiene más β -criptoxantina y menos β -caroteno que el maíz templado (Pixley *et al.*, 2013). En este estudio, los niveles mayores de β -caroteno en relación con β -criptoxantina apoyan la afirmación de que se ha aumentado PVA través de introgresión de germoplasma templado con el alelo favorable *CrtRB1* y selección, para aumentar β -caroteno y β -criptoxantina en el programa de mejoramiento de biofortificación de maíz.

El rango de contenido de zeaxantina en los híbridos del dialelo (1.04 a $23.10 \mu\text{g g}^{-1}$) fue consistente con los valores reportados en la literatura para el maíz tropical (Ortiz-Monasterio *et al.*, 2007). Aunque la variación en los métodos y las condiciones puede

afectar los resultados para diferentes estudios, el rango para la luteína (0.45 a 8.06 $\mu\text{g g}^{-1}$) fue más bajo que en otros estudios tanto para el maíz tropical como para el templado (Harjes *et al.*, 2008; Kurilich y Juvik, 1999; Menkir *et al.*, 2008; Ortiz-Monasterio *et al.*, 2007). La concentración reducida de luteína también puede atribuirse a la selección que favorece el flujo hacia la rama beta (más β -caroteno y β -criptoxantina) que hacia la rama alfa (menos α -caroteno y luteína) de la vía carotenoides (Babu *et al.*, 2013; Dhliwayo *et al.*, 2014; Harjes *et al.*, 2008; Meier *et al.*, 2011; Pixley *et al.*, 2013; Wurtzel *et al.*, 2012).

Los efectos ambientales (análisis combinado año*localidad*tratamiento) fueron altamente significativos ($P < 0.01$) para todos los carotenoides (Cuadro 3.2). Esto sugiere que los tratamientos de estrés pueden haber afectado el contenido de carotenoides. Las medias en los tres tratamientos de estrés muestran que PVA fue mayor (14.1 $\mu\text{g g}^{-1}$) en condiciones óptimas, seguido de estrés por sequía (12.9 $\mu\text{g g}^{-1}$), y menor (10.7 $\mu\text{g g}^{-1}$) en condiciones de bajo N_2 (Cuadro 3.2). La reducción del contenido de PVA fue causada por la reducción de los compuestos que la constituyen, como β -caroteno y β -criptoxantina tanto en sequía como en estrés de bajo N_2 (Cuadro 3.2). En comparación con las condiciones óptimas de cultivo, β -caroteno disminuyó 16.5% en sequía y 26.5% en estrés de bajo N_2 . Por otro lado, β -criptoxantina aumentó 22.4% en estrés por sequía y disminuyó 20.6% en estrés de bajo N_2 . La luteína mostró una respuesta menor al estrés en comparación con β -criptoxantina. Luteína aumentó 9.6% bajo estrés por sequía y disminuyó 9.8% en estrés de bajo N_2 . La zeaxantina fue la menos afectada por el estrés, con una disminución marginal tanto por el estrés por sequía (5.6%) como por el bajo nivel de N_2 (9.4%). Aunque bajo el estrés por sequía generó un aumento de β -criptoxantina y disminuyó la concentración de β -caroteno, el estrés de bajo N_2 condujo a una disminución en los niveles de ambos carotenoides. Luteína y zeaxantina, por otro lado, fueron los carotenoides más estables tanto en condiciones de sequía como de estrés de bajo N_2 .

Hay poca información disponible sobre el efecto del estrés en el metabolismo de los carotenoides y, por lo tanto, no se puede explicar adecuadamente el comportamiento de β -caroteno y β -criptoxantina observado en este estudio. Se conoce que los carotenoides forman parte del mecanismo de respuesta de la planta al estrés (Altangerel *et al.*, 2017). En general, en la literatura se reporta un aumento en los antioxidantes como

los carotenoides, cuando las plantas de pimiento, tomate y trigo se sometieron bajo estrés por sequía (Wang y Frei, 2011; Guzmán *et al.* 2016). Por otra parte Benard *et al.* (2009) no encontraron efecto significativo en los niveles de carotenos cuando al cultivo de tomate se le disminuyó el suministro de N₂. Este aumento puede estar asociado a la producción de la hormona ABA que es el compuesto final de la ruta de carotenoides. ABA en condiciones de sequía conduce al cierre de los estomas y a la transcripción de genes de respuesta al estrés (Messing *et al.*, 2010). Bajo estas referencias y conforme a estos resultados la reducción de β-caroteno puede justificarse por la formación de β-criptoxantina y zeaxantina. β-caroteno es precursor de estas dos xantófilas que a su vez son usadas para la síntesis de la hormona ABA (Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción 2012).

Cuadro 3.2 Promedios de las características evaluadas y el error estándar bajo condiciones óptimas, de estrés de sequía y estrés de bajo nitrógeno.

Característica evaluada	Óptimo	Sequía	Bajo Nitrógeno
Rendimiento de grano (Mg ha ⁻¹)	4.80 ± 0.04a	0.96 ± 0.03c	2.50 ± 0.04b
Días a la antesis (d)	79.9 ± 0.09b	75.8 ± 0.08c	82.8 ± 0.09a
ASI (d)	0.78 ± 0.07a	2.00 ± 0.09b	1.79 ± 0.08b
Humedad de grano (%)	13.2 ± 0.05a	10.2 ± 0.02c	12.6 ± 0.05b
Altura de planta (cm)	186. ± 0.59a	157.0 ± 0.57b	142.0 ± 0.80c
Provitamina A (µg g ⁻¹)	14.1 ± 0.04a	12.9 ± 0.11b	10.7 ± 0.07c
β-caroteno (µg g ⁻¹)	8.53 ± 0.12a	7.12 ± 0.10b	6.27 ± 0.06c
β-criptoxantina (µg g ⁻¹)	3.93 ± 0.06b	4.81 ± 0.10a	3.12 ± 0.03c
Luteína (µg g ⁻¹)	2.94 ± 0.05b	3.19 ± 0.07a	2.65 ± 0.04c
Zeaxantina (µg g ⁻¹)	7.97 ± 0.16a	7.52 ± 0.19ab	7.22 ± 0.11b
Endospermo (% del peso de grano entero)	80.8 ± 0.07a	78.5 ± 0.10c	80.3 ± 0.10b
Pericarpio (% del peso de grano entero)	6.38 ± 0.04b	7.92 ± 0.04a	6.18 ± 0.04b
Peso de 100 granos (g)	29.3 ± 0.13a	15.4 ± 0.22c	23.5 ± 0.13b
Índice de flotación (%)	33.2 ± 0.73c	85.9 ± 0.86a	48.9 ± 1.03b

ASI, Intervalo entre la floración masculina y la floración femenina: d, días; %, porcentaje; Media ± desviación estándar (*n* = 2); letras desiguales son diferentes y estadísticamente significativas (*P* < 0.05).

3.4.2 Dureza y tamaño del grano bajo estrés abiótico.

Tanto en condiciones de sequía como en estrés de bajo N₂ la dureza del grano fue menor comparado con condiciones óptimas de cultivo. En condiciones óptimas los granos fueron predominantemente duros (índice de flotación= 33%), mientras que bajo

sequía el índice de flotación fue de 85.9%, lo que los clasifica como suaves; en estrés de bajo N₂ presentaron una dureza intermedia con índice de flotación del 48.9% (Cuadro 3.2). Vázquez-Carrillo *et al.* (2016) también reportaron una reducción en la dureza del grano en genotipos de maíz que experimentaron estrés por frío, estrés por calor y estrés por sequía durante el crecimiento de la planta. Además, el PMG disminuyó de 293 g en condiciones óptimas a 154 g en condiciones de sequía y de 235 g en condiciones de bajo N₂ (Cuadro 3.2). Un déficit moderado de agua en los cereales generalmente conduce a un aumento en la concentración de proteínas y una reducción en la acumulación de almidón de hasta un 40%. La variación en el N₂ del suelo afecta el contenido de proteína y almidón, conduciendo cambios en su composición, estructura y funcionalidad y su relación entre estos dos compuestos (Beckles y Thitisaksakul, 2014). Estos cambios, a su vez, modifican la dureza del grano, el tamaño y el peso.

3.4.3 Rendimiento de grano.

Los efectos híbridos fueron altamente significativos ($P < 0.01$) para el rendimiento de grano en los tres tratamientos de estrés (Cuadro 3.4 y Cuadro 3.5). Los promedios de los híbridos para el rendimiento de grano fueron consistentes con las expectativas. Los mayores rendimientos se observaron en los híbridos sembrados bajo condiciones óptimas (4.80 Mg ha⁻¹), seguidos por los sembrados en estrés de bajo N₂ (2.50 Mg ha⁻¹) y luego los sembrados bajo sequía (0.96 Mg ha⁻¹). El rendimiento de grano varió de 3.35 Mg ha⁻¹ para CLHP0020 / CLHP0022 a 6.58 Mg ha⁻¹ para CML451 / CLHPD1602 en condiciones óptimas. Seis de los diez mejores híbridos para el rendimiento de grano en condiciones óptimas tenían CML451 como uno de los padres (datos no mostrados). Lo anterior confirma una buena capacidad de combinación para el rendimiento de grano. El rendimiento de grano varió de 1.30 Mg ha⁻¹ para CLHP0372 / CHPD1603 a 3.82 Mg ha⁻¹ para CLHP0003 / CML451 en estrés de bajo N₂; los seis mejores híbridos tenían a CLHP0003 como uno de los padres. En estrés por sequía, los rendimientos variaron de 0.38 Mg ha⁻¹ para CLHP0372 / CLHP0366 a 1.87 Mg ha⁻¹ para CLHP0068 / CLHP0476; los diez mejores híbridos tenían a CML451 o CLHP0068 como uno de los padres. Esto sugiere que estas dos líneas puras tienen una buena capacidad de combinación para el rendimiento de grano bajo estrés por sequía (datos no mostrados).

En condiciones óptimas, el 60% de la suma de cuadrados de los híbridos se atribuyó a los efectos aditivos, pero la prueba F para los efectos de ACG no fue significativa (valor de $P=0.055$). Los efectos no aditivos (ACE), que contribuyeron con el 40% de la suma de cuadrados de híbridos, fueron altamente significativos ($P < 0.01$) para el rendimiento de grano en condiciones óptimas. Los efectos de ACG fueron altamente significativos tanto en el estrés por sequía como en el estrés por bajo N_2 ($P < 0.01$). Los efectos de ACE fueron significativos ($P < 0.05$) bajo estrés por sequía y no significativos en estrés por bajo N_2 (Cuadro 3.5). La importancia relativa de los efectos de ACG frente a ACE se dividió de manera más uniforme bajo el estrés por sequía, con el 52% de la suma de cuadrados de híbridos atribuida a efectos aditivos. En estrés por bajo N_2 , los efectos genéticos fueron predominantemente aditivos (82% de la suma de cuadrados híbridos; Cuadro 3.5). Las estimaciones de repetibilidad de 0.60 en condiciones óptimas, 0.52 en condiciones de estrés por sequía y 0.82 en condiciones de estrés en bajo N_2 , pueden considerarse de moderadas a altas con respecto a los valores descritos en la literatura (Hallauer *et al.*, 2010). Además, las estimaciones de repetibilidad fueron consistentes con los estudios previos que informaron estimaciones de heredabilidad más bajas para el rendimiento de grano que para carotenoides (Dhliwayo *et al.*, 2014; Suwarno *et al.*, 2014).

Las pruebas F de los efectos de ACG revelaron que tres líneas, CLHP0068, CLHP0003 y CML451 tuvieron efectos positivos y estadísticamente significativos de ACG ($P < 0.05$) para el rendimiento de grano en al menos uno de los tres tratamientos. Los efectos de ACG para CLHP0068 fueron significativos en condiciones óptimas y estrés por sequía. Para CLHP0003, los efectos fueron significativos en condiciones óptimas y en estrés de bajo N_2 . CML451 fue más consistente que CLHP0068 y CLHP0003, con efectos ACG significativos en los tres tratamientos (Cuadro 3.6). Estas tres líneas puras son líneas élite que se utilizan actualmente en los programas de mejoramiento subtropical y tropical de HarvestPlus y CIMMYT. CLHP0003, en particular, ha sido utilizado como parental en varios híbridos liberados en Zambia, Zimbabue, Malawi y Tanzania.

Las líneas endogámicas CLHP0020, CLHPD1601 y CLHP0372 tuvieron efectos de ACG negativos y significativos para el rendimiento de grano, en al menos uno de los tres

tratamientos. CLHP0020 tuvo efectos ACG negativos altamente significativos ($P < 0.01$) bajo estrés por sequía y condiciones óptimas (Cuadro 3.6). CLHPD1601 tuvo un efecto ACG negativo altamente significativo solo en condiciones óptimas. La línea CLHP0372 tuvo efectos ACG significativos y negativos para el rendimiento de grano, bajo estrés por sequía y bajo N_2 . En general, la mayoría de las líneas que tuvieron efectos de ACG positivos para el rendimiento de grano, tuvieron efectos de ACG negativos y significativos para PVA. CLHP0020 fue la excepción, ya que tuvo efectos de ACG negativos y significativos tanto para el rendimiento de grano como para PVA (Cuadro 3.6).

Los efectos negativos de ACG para el rendimiento de grano en las líneas con alto contenido de PVA es probablemente el resultado de que las líneas se derivaron de un padre común (Cuadro 3.1). Esto resulta en una baja heterosis en el rendimiento de grano para los híbridos resultantes de su cruce. Aunque las líneas puras derivadas del germoplasma donante de PVA (por ejemplo, CLHP0366, CLHP0476 y CLHP0372) tuvieron efectos de ACG negativos pequeños y no significativos para el rendimiento de grano, apoya la afirmación general de que es posible aumentar al mismo tiempo tanto el rendimiento de grano como la concentración de PVA en maíz (Dhliwayo *et al.*, 2014; Pixley *et al.*, 2013; Suwarno *et al.*, 2014).

3.4.4 ACG y ACE para carotenoides.

El ANOVA combinado de los tratamientos de estrés mostró que el efecto de híbridos fue estadísticamente significativo para todos los carotenoides analizados ($P < 0.01$; Cuadro 3.3). La sub-partición de la suma de cuadrados de híbridos reveló que los efectos de ACG y ACE fueron altamente significativos ($P < 0.01$) para todos los carotenoides, así como para el contenido de PVA (Cuadro 3.3). Estos resultados sugieren que tanto los efectos genéticos aditivos como no aditivos fueron importantes para todos los carotenoides analizados, así como para el contenido de PVA. Sin embargo, los efectos de la ACG explicaron el 96%, 95%, 92%, 88% y 88% de la suma de cuadrados de los híbridos para PVA, β -caroteno, β -criptoxantina, luteína y zeaxantina, respectivamente. Lo anterior indica que los efectos aditivos fueron más importantes que los efectos no aditivos para todos los carotenoides analizados y para PVA. Estos resultados son consistentes con estudios previos que reportan una preponderancia de efectos aditivos

sobre efectos no aditivos para carotenoides en maíz (Egesel *et al.*, 2003; Senete *et al.*, 2011; Suwarno *et al.*, 2014).

La varianza de la interacción genotipo x ambiente (G x A) y sus particiones (ambiente*ACG y ambiente*ACE) también fueron altamente significativas ($P < 0.01$) para PVA y los carotenoides, lo que sugiere que el ambiente afecta a PVA y a los carotenoides. No obstante, las altas estimaciones de repetibilidad (> 0.95) implican que la contribución de la interacción ambiental en la varianza fenotípica fue menor que la de la variación genética. Las estimaciones de alta repetibilidad también son respaldadas por estudios previos que muestran poca o ninguna influencia del medio ambiente sobre la concentración de carotenoides y PVA (Chander *et al.*, 2008; Dhliwayo *et al.*, 2014; Egesel *et al.*, 2003; Suwarno *et al.*, 2014, 2015). Sin embargo, ninguno de los estudios anteriores se realizó bajo estrés por sequía o condiciones de bajo N_2 .

Cuadro 3.3 Cuadrados de PVA, β -caroteno, β -criptoxantina, luteína y zeaxantina para 55 híbridos provenientes de un diseño de cruce dialélico evaluados bajo condiciones óptimas, de sequía y bajo nitrógeno en 8 ambientes

Fuente	GL	PVA	β -caroteno	β -criptoxantina	Luteína	Zeaxantina
Ambiente (A)	7	658.35**	281.18**	91.17**	9.96**	30.93**
Repetición/A	8	9.42**	5.30*	1.06	0.71	2.95
Hibrido	54	372.98**	258.71**	93.53**	62.41**	498.08**
ACG	10	1942.65**	1328.64**	466.68**	295.05**	2362.37**
ACE	44	22.31**	21.14**	10.32**	9.53**	73.72**
Hibrido x A	378	10.34**	7.11**	2.39**	1.04**	8.82**
ACG x A	70	21.3**	13.66**	5.04**	1.21**	14.00**
ACE x A	308	7.17**	4.99**	1.61**	0.9	7.03
Error	421	3.36	2.4	1.06	0.74	5.73
ACG SC/Total†		0.96	0.95	0.92	0.88	0.88
Repetibilidad		0.97	0.97	0.97	0.98	0.98

*, ** Significante a $P \leq 0.05$ y $P < 0.01$, respectivamente.

† ACG, efecto de la aptitud combinatoria general.

‡ ACE, efecto de la aptitud combinatoria específica.

§ GL, grados de libertad.

¶ Efecto aditivo (ACG) suma de cuadrados como la porción del total de híbridos.

El efecto de híbrido también fue altamente significativo ($P < 0.01$) para PVA y todos los carotenoides en condiciones óptimas. Las pruebas F para los efectos de ACG en condiciones óptimas revelaron una varianza altamente significativa ($P < 0.01$) para PVA, β -caroteno, luteína y zeaxantina; y β -criptoxantina solo significativa a $P < 0.05$ (Cuadro 3.4). Las estimaciones de repetibilidad fueron altas para PVA y los carotenoides, con un

promedio de 0.97 para cada variable. De manera similar, la contribución de la suma de cuadrados de ACG a la suma de cuadrados de híbridos promedió 95%, 94%, 89%, 87% y 87% para PVA, β -caroteno, β -criptoxantina, luteína y zeaxantina, respectivamente (Cuadro 3.4). Estos resultados fueron similares a los hallazgos del análisis combinado y fueron consistentes con los hallazgos de estudios anteriores (Egesel *et al.*, 2003; Suwarno *et al.*, 2014).

Cuadro 3.4 Cuadrados medios de rendimiento de grano, PVA, β -caroteno, β -criptoxantina, luteína y zeaxantina para 55 híbridos provenientes de un diseño de cruce dialélico evaluados bajo condiciones óptimas en cuatro ambientes.

Fuente	GL§	Cuadrados medios					
		RG	PVA	β -caroteno	β -criptoxantina	Luteína	Zeaxantina
Ambiente (A)	3	39.48**	287.4**	81.9**	63.2**	3.99**	25.1**
Repetición/A	4	8.24**	6.1	3.6	0.9	0.92	4.1
Híbrido	54	2.88**	235.0**	162.9**	47.5**	35.05**	302.2**
ACG†	10	9.31	1204.0**	830.5**	228.2**	164.19**	1418.8**
ACE‡	44	1.42*	14.8**	13.1**	6.4*	5.70**	48.4**
Híbrido x A	162	1.52**	7.6**	5.4**	1.6**	1.07**	9.4**
ACG x A	30	4.40**	13.8**	9.3**	2.7**	1.26**	13.5**
ACE x A	132	0.87**	5.9*	4.2*	1.4**	0.97*	7.9*
Error	216	0.49	4.59	3.20	0.84	0.74	5.93
Repetibilidad		0.47	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97
ACG SC/Total¶		0.60	0.95	0.94	0.89	0.87	0.87

*, ** Significante a $P \leq 0.05$ y $P < 0.01$, respectivamente.

† ACG, efecto de la aptitud combinatoria general.

‡ ACE, efecto de la aptitud combinatoria específica.

§ GL, grados de libertad.

¶ Efecto aditivo (ACG) suma de cuadrados como la porción del total de híbridos.

Las pruebas F para las condiciones de sequía y estrés de bajo N_2 (Cuadro 3.5) revelan patrones similares con efectos de híbridos y de ACG altamente significativos. Los efectos de ACE para PVA y β -caroteno no fueron significativos bajo estrés por sequía y solo fueron significativos a $P < 0.05$ bajo estrés de N_2 limitado. Por el contrario, los efectos ACE de β -criptoxantina fueron altamente significativos bajo el estrés por sequía y por bajo N_2 ($P < 0.05$). Para luteína y zeaxantina, los efectos de ACE no fueron significativos bajo el estrés por sequía, pero fueron altamente significativos ($P < 0.01$) bajo estrés de N_2 limitado. Si bien, la contribución de la suma de cuadrados de ACG a la suma de cuadrados total de híbridos fue ligeramente menor en condiciones de estrés (variando desde 84% para zeaxantina bajo sequía a 94% para PVA en condiciones de

bajo N₂), los resultados aún muestran una preponderancia de los efectos de ACG sobre ACE para todos los carotenoides y PVA (Cuadro 3.5).

La reducción de la varianza de ACG en híbridos bajo estrés puede sugerir que los efectos genéticos no aditivos se vuelven más importantes bajo estrés. El número limitado de ambientes en condiciones de estrés hace que sea difícil sacar conclusiones firmes en este experimento. Sin embargo, se han realizado observaciones similares, aunque para rasgos diferentes, donde los efectos no aditivos se hacen más importantes que los efectos aditivos bajo estrés. Betrán *et al.* (2003) observaron una mayor importancia de los efectos aditivos para el rendimiento de grano bajo estrés por sequía y efectos no aditivos bajo estrés con N₂ bajo. Además, Messmer *et al.* (2009) y Trachsel *et al.* (2016b) encontraron que la tolerancia a la sequía se debió principalmente a la sobredominancia en el rendimiento de grano asociado con QTL y otros rasgos morfológicos. Ello resultó en un mayor vigor de la planta, lo que potencialmente ayudó a un mejor acceso al agua en el suelo y, por consiguiente, a un mayor rendimiento de grano bajo estrés hídrico.

Con respecto a las interacciones G x A, la interacción híbrido x ambiente (H x A) fue significativa ($P < 0.05$) para PVA, β -caroteno, β -criptoxantina y luteína bajo condiciones de estrés por sequía y bajo N₂. Mientras que para zeaxantina fue significativa ($P < 0.05$) en condiciones de bajo N₂ pero no en estrés por sequía (Cuadro 3.5). La sub-partición de la suma de cuadrados H x A en sus sub-componentes reveló que la varianza ACG x ambiente (ACG x A) fue altamente significativa ($P < 0.01$) para PVA y β -caroteno bajo estrés por sequía, pero no fue significativa en condiciones de bajo N₂. La varianza de la interacción ACG x A también fue altamente significativa ($P < 0.01$) para la β -criptoxantina en condiciones de sequía y estrés de bajo N₂.

Para luteína y zeaxantina la varianza de ACG x A fue altamente significativa bajo estrés por sequía y no significativa en condiciones de bajo N₂. Prueba de F para la varianza ACE x ambiente (ACE x A) sugiere que los efectos de ACE fueron más sensibles al ambiente solo para PVA y β -caroteno en condiciones de bajo N₂ y estrés por sequía.

Los efectos de ACE también fueron estadísticamente significativos para la β -criptoxantina y zeaxantina en condiciones de bajo N₂ y para luteína en sequía. Sin embargo, con una contribución de la suma de cuadrados totales que van desde 0.03 a 0.36%, la interacción G x A fue muy pequeña para ser de importancia práctica. Estos

resultados también son consistentes con estudios previos que informaron poca o ninguna interacción G x A para la concentración de carotenoides así como PVA en el grano de maíz (Dhliwayo *et al.*, 2014; Egesel *et al.*, 2003; Menkir y Maziya-Dixon, 2004; Suwarno *et al.*, 2014, 2015).

Cuadro 3.5 Cuadrados medios de rendimiento de grano, Provitamina A (PVA), β -caroteno, β -criptoxantina, luteína y zeaxantina para 55 híbridos provenientes de un diseño de cruce dialélico evaluados bajo condiciones de sequía (S) y bajo nitrógeno (BN)

Fuente	DF§	Rendimiento		PVA		β -caroteno		β -criptoxantina		Luteína		Zeaxantina	
		S	BN	S	BN	S	BN	S	BN	S	BN	S	BN
Ambiente (A)	1	0.6ns	301.3**	951.3**	1206.9**	371.0**	572.4**	105.8**	29.9**	0.2	25.2**	0.7	69.9**
Repetición/A	2	0.7*	0.7	21.1**	3.6*	9.3**	4.6**	1.4	1.3**	0.3	0.7	0.9	2.7
Híbrido	54	0.5**	1.6**	105.2**	58.8**	70.9**	41.9**	31.3**	15.5**	13.5**	15.5**	88.1**	123.9**
ACG†	10	1.5*	6.9	493.3**	298.9**	324.8**	208.2**	146.7**	73.2**	61.7**	71.4**	400.7**	581.4**
ACE‡	44	0.3	0.3	16.6	5.1*	13.3	4.4**	5.5*	1.9**	2.6	2.5**	17.5	17.5**
Híbrido x A	54	0.2	0.7	24.6**	4.0**	16.5**	2.7**	3.9**	1.2**	1.7*	0.9**	11.5	6.3**
ACG x A	10	0.4	2.4**	53.3**	0.7	33.4**	0.0	8.2**	2.7**	1.1	1.4**	11.4	7.4**
ACE x A	44	0.2	0.3	16.1**	2.3**	11.3**	1.4**	2.8	0.6**	1.7*	0.5	11.1	4.8**
Error	108	0.2	0.5	3.01	1.16	2.26	0.86	2.33	0.29	1.1	0.4	8.2	2.76
Repetibilidad		0.59	0.56	0.78	0.93	0.77	0.94	0.88	0.92	0.88	0.94	0.88	0.95
ACG SC/Total¶		0.52	0.82	0.87	0.94	0.85	0.92	0.87	0.87	0.85	0.85	0.84	0.87

*, ** Significante a $P \leq 0.05$ y $P < 0.01$, respectivamente.

† ACG, efecto de la aptitud combinatoria general.

‡ ACE, efecto de la aptitud combinatoria específica.

§ GL, grados de libertad.

¶ Efecto aditivo (ACG) suma de cuadrados como la porción del total de híbridos

3.4.5 Efectos de ACG de los carotenoides.

Las estimaciones de los efectos de ACG muestran a las líneas puras que fueron seleccionadas para el alelo favorable del loci *CrtRB1* y *LycE* (CHPD1601, CHPD1602, CHPD1603, CLHP0366, CLHP0372 y CLHP0476) tuvieron efectos de ACG positivos y significativos para PVA en condiciones óptimas, de sequía y bajo N₂ (Cuadro 3.6). Sin embargo, algunas de las líneas tuvieron efectos de ACG negativos y significativos para la β -criptoxantina. Esto indica que los altos efectos de ACG para la PVA se debieron principalmente a la mayor concentración de β -caroteno y que la contribución de β -criptoxantina a la PVA fue de baja a insignificante. El alelo favorable de *CrtRB1* reduce la hidroxilación de β -caroteno a β -criptoxantina. *CrtRB1* es más efectivo en el aumento del β -caroteno que *LycE*, el cual en la vía de síntesis aumenta el flujo hacia la rama del β -caroteno (Babu *et al.*, 2013; Harjes *et al.*, 2008). No es sorprendente, por lo tanto, que las líneas puras que llevan el alelo favorable en el locus *CrtRB1* tienden a tener efectos ACG negativos para la β -criptoxantina.

De las otras cinco líneas puras que no tenían el alelo favorable en el locus *CrtRB1*, solo CLHP0003 (en condiciones óptimas) y CML451 (en todos los tratamientos de estrés) tuvieron un efecto ACG negativo y altamente significativo ($P < 0.01$) para la β -criptoxantina. CLHP0003 es una línea amarilla derivada de CML537, línea blanca desarrollada por el programa CIMMYT-Zimbabue. La línea CML451 se desarrolló a partir de una población predominantemente blanca que segregaba granos amarillos. Las dos líneas endogámicas tienen un grano amarillo pálido en comparación con el color amarillo intenso o naranja de las otras nueve líneas. Aunque el color del grano no está correlacionado con el contenido de PVA, está correlacionado moderadamente con los carotenoides totales (Harjes *et al.*, 2008), incluida la β -criptoxantina. Al ser estas líneas derivadas del primer ciclo amarillo del germoplasma blanco, es posible que CML451 y CLHP0003 carezcan de alelos favorables en los loci clave en la ruta de los carotenoides. Lo que resultaría en una menor concentración de β -criptoxantina y por lo tanto en los efectos negativos de ACG.

Los efectos de ACG para todos los carotenoides fueron en su mayoría estables en todos los tratamientos de estrés. Sin embargo, se detectaron cambios en la magnitud de los efectos, por ejemplo, en la ACG para PVA en la línea CLHP00476 en condiciones

óptimas y en estrés por sequía (Cuadro 3.6). Otras líneas puras con cambios significativos en la magnitud de los efectos a través de los tratamientos de estrés incluyen CLHP0366, CLHP0372, CLHP0068 y CLHP0003 para β -criptoxantina y CLHP0068 para luteína (Cuadro 3.6). Estos cambios en la magnitud de los efectos pueden haber sido responsables de la pequeña, pero estadísticamente significativa interacción genotipo por ambiente (Cuadro 3.3). Los efectos generalmente estables en los tratamientos de estrés permitieron identificar líneas que se pueden usar como germoplasma para uso en programas de mejoramiento enfocados al aumento de carotenoides. Por ejemplo, CLHP0020 y CLHP0022 serían buen germoplasma donante para β -criptoxantina, luteína y zeaxantina en todos los tratamientos de estrés, pero no para β -caroteno. Las líneas CHPD1601, CHPD1602, CHPD1603 y CLHP0372 serían las mejores fuentes de germoplasma para PVA y β -caroteno en todos los tratamientos de estrés, pero estas mismas líneas no serían útiles para aumentar la β -criptoxantina, luteína y zeaxantina.

Cuadro 3.6 Estimados de la aptitud combinatoria general para rendimiento de grano, PVA, β -caroteno, β -criptoxantina, luteína y zeaxantina bajo condiciones óptimas (OPT) de sequía (S) y bajo nitrógeno (BN).

Línea	Rendimiento (Mg ha ⁻¹)			Provitamina A ($\mu\text{g g}^{-1}$)			β -caroteno ($\mu\text{g g}^{-1}$)		
	OPT†	S‡	BN§	OPT	S	BN	OPT	S	BN
CLHP0020	-0.64**	-0.22**	-0.32	-1.66**	-1.59**	-1.21**	-2.73**	-2.53**	-1.92**
CHPD1601	-0.56**	-0.10	-0.25	4.95**	4.27**	3.06**	4.65**	3.63**	2.76**
CLHP0022	-0.25	-0.02	-0.36	-0.89**	-1.24*	-0.89	-2.30**	-2.16**	-1.87**
CHPD1602	0.01	-0.09	-0.33	3.30**	4.05**	2.18**	3.59**	3.85**	2.21**
CHPD1603	-0.06	-0.12	-0.16	4.72**	4.30**	3.28**	3.80**	3.32**	2.70**
CLHP0366	-0.04	-0.13	-0.13	2.49**	2.10**	2.28**	2.37**	1.55**	1.93**
CLHP00476	0.19	0.05	0.17	0.56	0.94	1.03*	1.03**	1.85**	1.39**
CLHP00372	-0.10	-0.15*	-0.49*	2.30**	1.00	1.45**	2.09**	0.484	1.11**
CLHP0068	0.28*	0.46**	0.43	-4.99**	-3.22**	-3.65**	-4.11**	-2.83**	-2.99**
CLHP0003	0.31*	0.06	0.69**	-2.84**	-3.30**	-1.77**	-2.52**	-2.63**	-1.42**
CML451	0.85**	0.26**	0.75**	-7.93**	-7.32**	-5.75**	-5.87**	-4.51**	-3.89**
V(gj)¶	0.27	0.10	0.25	0.42	1.16	0.14	0.34	0.92	(-0.70)
V(gi-gj)#	0.40	0.14	0.37	0.62	1.72	0.20	0.51	1.36	(-0.70)
	β -criptoxantina ($\mu\text{g g}^{-1}$)			Luteína ($\mu\text{g g}^{-1}$)			Zeaxantina ($\mu\text{g g}^{-1}$)		
CLHP0020	3.36**	3.48**	2.53**	2.91**	2.29**	2.55**	8.53**	6.00**	7.41**
CHPD1601	-1.37**	-1.31**	-0.95**	-0.51**	-0.53**	-0.47**	-1.73**	-1.50**	-1.63**
CLHP0022	4.32**	3.19**	2.91**	2.32**	1.93**	2.45**	7.72**	4.88**	7.06**
CHPD1602	-1.91**	-2.14**	-1.25**	-0.85**	-0.74**	-0.85**	-2.15**	-1.73**	-2.02**
CHPD1603	-0.09	-0.17	-0.52**	-0.30**	-0.32	-0.35**	-0.44	-0.57	-1.08**
CLHP0366	-0.69**	-0.30	-0.64**	-0.10	-0.16	-0.18	-0.81**	-0.62	-0.95**
CLHP00476	-2.25**	-2.65**	-1.50**	-2.23**	-2.35**	-2.05**	-6.16**	-5.67**	-5.75**
CLHP00372	-0.21	0.74**	-0.05	0.88**	0.94**	0.78**	1.66**	2.41**	2.03**
CLHP0068	0.25	0.97**	0.37**	-0.45**	0.13	-0.48**	-1.07**	0.26	-0.89**
CLHP0003	-0.43**	0.14	0.05	-1.41**	-1.01**	-1.26**	-4.47**	-2.95**	-3.66**
CML451	-0.98**	-1.94**	-0.96**	-0.24*	-0.20	-0.14	-1.09**	-0.51	-0.52
V(gj)¶	0.235	0.46	0.26	0.13	0.17	0.19	0.41	0.54	0.43
V(gi-gj)#	0.349	0.68	0.39	0.19	0.25	0.28	0.61	0.80	0.64

*, ** Significante a $P \leq 0.05$ y $P < 0.01$, respectivamente.

†OPT, estimados de ACG bajo condiciones óptimas.

‡S, estimados de ACG bajo estrés de sequía.

§BN, estimados de ACG en estrés de bajo nitrógeno.

¶ Varianza de los efectos de ACG.

Varianza de la diferencia entre los efectos de dos líneas de maíz.

El estrés por sequía y, en cierta medida, el bajo N₂ o la baja eficiencia en su uso son objetivos importantes de mejoramiento para los programas del África Subsahariana (Bänziger *et al.*, 2000; Bänziger *et al.*, 2006; Cairns *et al.*, 2013). Los resultados indican que el germoplasma aquí analizado se puede usar en los programas de mejoramiento para el desarrollo de híbridos de alto PVA dirigidos a campos donde se presenta sequía o bajo contenido de N₂. No está claro cómo, o si la selección hacia la PVA afecta la tolerancia al estrés. No obstante, a partir de los datos de estos ensayos de mejoramiento

genético, no se ha visto ninguna evidencia que sugiera que los híbridos de maíz biofortificados sean más o menos tolerantes a la sequía o al estrés de bajo N₂.

3.4.6 Coeficientes de correlación entre carotenoides, rendimiento de grano y rasgos de calidad de grano.

PVA y el rendimiento de grano se correlacionaron negativamente ($r^2 = -0.50$; $P < 0.01$) en condiciones óptimas (Cuadro 3.7). Esta relación también se detectó bajo estrés por sequía ($r^2 = -0.56$; $P < 0.01$) y estrés de bajo N₂ ($r^2 = -0.63$; $P < 0.01$). Este resultado sugiere una correlación negativa entre la concentración de carotenoides PVA y el rendimiento de grano. Sin embargo, la evaluación de los efectos de ACG para el rendimiento de grano y PVA (Cuadro 3.6), sugiere que se esperaría este resultado debido a que varias líneas puras en el estudio tenían un padre común (Cuadro 3.1), lo que resultó en una baja heterosis para el rendimiento de grano de los híbridos. Otros estudios (Egesel *et al.*, 2003; Suwarno *et al.*, 2014), así como varios conjuntos de datos de nuestro programa de mejoramiento, no muestran correlación entre el rendimiento de grano y los carotenoides PVA.

La luteína estuvo altamente correlacionada con zeaxantina y β -criptoxantina ($r^2 > 0.80$; $P < 0.01$) en los tres tratamientos (Cuadro 3.7). Hubo una correlación negativa significativa, aunque baja, entre el β -caroteno y la luteína en condiciones óptimas ($r^2 = -0.28$; $P < 0.05$), estrés por sequía ($r^2 = -0.39$; $P < 0.01$) y bajo estrés por N₂ ($r^2 = -0.36$; $P < 0.01$). β -caroteno y β -criptoxantina se correlacionaron de manera moderadamente negativa en los tres tratamientos de estrés (Cuadro 3.7). La correlación negativa entre β -caroteno y β -criptoxantina, fue más fuerte que la reportada en otros estudios (Suwarno *et al.*, 2014). Esto podría explicarse por la selección dirigida hacia β -caroteno mediante la SAM moleculares. Se ha demostrado que la selección en el locus *CrtRB1* aumenta el β -caroteno al reducir la hidroxilación a β -criptoxantina (Yan *et al.*, 2010). Los niveles de PVA de líneas de maíz usando la SAM para *CrtRB1* se componen predominantemente de β -caroteno, con niveles poco a insignificantes de β -criptoxantina (Babu *et al.*, 2013).

Rasgos agronómicos como el número de días hasta la antesis, la humedad del grano y la altura de la planta también se correlacionaron con algunos carotenoides (Cuadro 3.7). El número de días hasta la antesis se correlacionó positivamente con β -

caroteno y PVA ($r^2= 0.47$ y $r^2= 0.49$; $P <0.01$) en condiciones óptimas y bajo estrés por sequía respectivamente, pero no se observó una correlación significativa en el estrés de bajo N_2 (Cuadro 3.7). La correlación positiva entre días a la antesis y PVA bajo estrés por sequía y condiciones óptimas sugiere que los genotipos de floración tardía tienden a tener niveles más altos de β -caroteno y PVA que los genotipos de floración precoz. Suponiendo que el tiempo de floración se correlaciona con la madurez, el resultado es consistente con Cabrera-Soto *et al.*, (2018) que muestran que el pico de acumulación de carotenoides PVA se alcanza en la madurez fisiológica. Esto podría implicar que los genotipos de floración tardía tendrán niveles más altos de PVA que los genotipos de floración temprana en la cosecha. Debido a que la humedad del grano se asocia con la madurez, esta misma lógica podría usarse para explicar la correlación significativa observada en el estrés de bajo N_2 entre la humedad del grano y el β -caroteno y entre la humedad del grano y PVA (Cuadro 3.7).

PVA y β -caroteno se correlacionaron positivamente con el índice de flotación en los tres tratamientos (Cuadro 3.7). Coeficiente de correlación para el β -caroteno y el índice de flotación en condiciones óptimas y de bajo N_2 fueron altos ($r^2 = 0.77$ y $r^2 = 0.75$, respectivamente) y significativos ($P <0.01$). Mientras que el coeficiente de correlación para las condiciones de sequía fue menor ($r^2 = 0.46$; $P <0.01$). Esta baja correlación en sequía indica que los granos fueron suaves, e implica una reducción de la compactación del almidón y más endospermo harinoso. Estas observaciones son consistentes con los resultados del *Capítulo 2* donde se sugiere que el β -caroteno se acumula en gran medida en el endospermo harinoso. Adicionalmente, los genotipos que presentaron la mayor proporción de endospermo harinoso, mostraron la mayor degradación de β -caroteno y PVA (Cuadro 3.4). La baja compactación de los gránulos de almidón en el endospermo harinoso, permite que el oxígeno ambiental este en contacto con β -caroteno. Generando de esta manera la pérdida de β -caroteno y por lo tanto, su baja estabilidad.

A pesar de las pequeñas variaciones en la magnitud de los coeficientes de correlación fenotípica entre los rasgos a través de los tratamientos de estrés, los resultados generales sugieren que la relación genética entre los carotenoides no se altera ni por la sequía ni por el estrés de bajo N_2 . Este resultado confirma aún más el hallazgo general de que aunque los promedios de carotenoides pueden verse afectados

por el estrés, la variación en la interacción genotipo por ambiente fue insignificante. Por lo tanto, para las características de los carotenoides, las mismas estrategias y métodos de mejoramiento que se aplican actualmente en condiciones óptimas deberían funcionar incluso cuando se enfoca en ambientes con estrés por sequía o estrés de bajo N₂.

Cuadro 3.7 Coeficientes de correlación fenotípica de rendimiento de grano (RG), días a la antesis (AD), humedad de grano (MOI), provitamina A (PVA), β -caroteno (BC), β -criptoxantina (BCX), luteína y zeaxantina (ZX)

OPT/S†	RG	AD	MOI	PH	Luteína	ZX	BCX	BC	PVA	IF
RG	-	-0.37**	0.42**	0.52**	-0.2	-0.21	-0.14	-0.42**	-0.5**	-0.35**
AD	-0.46**	-	-0.08	-0.28*	0.15	0.12	-0.17	0.47**	0.49**	0.54**
MOI	-0.25	0.03	-	0.27	-0.1	-0.11	-0.07	0.12	0.1	-0.08
PH	0.29*	-0.22	-0.18	-	-0.51**	-0.51**	-0.42**	-0.06	-0.17	-0.26*
Luteína	-0.01	-0.09	0.14	-0.39**	-	0.99**	0.85**	-0.28*	-0.16	-0.16
ZX	-0.01	-0.09	0.16	-0.39**	0.99**	-	0.88**	-0.29*	-0.17	-0.16
BCX	0.01	-0.32**	0.06	-0.2	0.86**	0.86**	-	-0.45**	-0.32**	-0.30*
BC	-0.47**	0.42**	0.14	-0.16	-0.39**	-0.37**	-0.39**	-	0.98**	0.77**
PVA	-0.56**	0.42**	0.19	-0.28*	-0.21	-0.19	-0.2	0.96**	-	0.79**
IF	-0.46**	0.19	0.2	-0.35**	0.08	0.09	0.13	0.46**	0.54**	-

BN‡	RG	AD	MOI	PH	Luteína	ZX	BCX	BC	PVA	IF
RG	1									
AD	-0.1	1								
MOI	0.63**	-0.1	1							
PH	0.56**	0.63**	0.04	1						
Luteína	-0.32**	-0.05	-0.02	-0.47**	1					
ZX	-0.32**	-0.09	-0.03	-0.49**	0.99**	1				
BCX	-0.14	-0.29*	0.07	-0.29*	0.82**	0.84**	1			
BC	-0.51**	0.12	-0.59**	-0.04	-0.36**	-0.38**	-0.47**	1		
PVA	-0.63	0.12	-0.64**	-0.14	-0.23	-0.25	-0.32**	0.97**	1	
IF	-0.65**	0.2	-0.63**	-0.27*	-0.06	-0.07	-0.22	0.75**	0.77**	1

*, ** Significante a $P \leq 0.05$ y $P < 0.01$, respectivamente.

† Coeficientes de correlación bajo condiciones óptimas (OPT) de sequía (S), arriba y abajo de la diagonal, respectivamente.

‡ Coeficientes de correlación entre las características evaluadas en estrés de bajo nitrógeno.

3.5 CONCLUSIONES

Los resultados de la presente investigación muestran que la herencia de carotenoides PVA, luteína y zeaxantina es predominantemente aditiva, lo que confirma los resultados de otros estudios publicados. El modo de herencia y la aptitud combinatoria de las líneas endogámicas individuales no se vieron afectadas por el bajo nivel de N₂ o el estrés por sequía. Estas condiciones de estrés en los cultivos son limitaciones importantes para la producción de maíz en África Subsahariana, donde las variedades de maíz PVA tienen mayor probabilidad de tener impacto en la salud humana. Estos hallazgos sugieren que la estrategia de mejoramiento y el germoplasma utilizado para el mejoramiento de maíces en condiciones óptimas, debería ser eficaz para aumentar la PVA de maíces en condiciones de bajo N₂ o estrés por sequía. Los promedios de la concentración de PVA fueron más bajos tanto en estrés de bajo N₂ como en estrés por sequía. Esto sugiere que el objetivo establecido de 15 µg g⁻¹ de PVA en maíces biofortificados puede no ser suficiente para los maíces producidos en condiciones de sequía y bajo N₂ del suelo. Sin embargo, considerando que existe un germoplasma fuente superior a 20 µg g⁻¹ en nuestro programa de mejoramiento, la alta heredabilidad de PVA, y suponiendo una inversión continua en el mejoramiento de maíz PVA, debería ser posible desarrollar variedades que excedan el objetivo y hacer que las pérdidas debidas al estrés sean intrascendentes.

3.7 LITERATURA CITADA

- Altangerel, N., G.O. Ariunbold, C. Gorman, M.H. Alkahtani, E.J. Borrego, D. Bohlmeier, P. Hemmer, M.V. Kolomiets, J.S. Yuan, and M.O. Scully. 2017. In vivo diagnostics of early abiotic plant stress response via raman spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: 3393-3396. doi:10.1073/pnas.1701328114.
- Andersson, M.S., A. Saltzman, V. P.S., and W.H. Pfeiffer. 2017. Progress update: Crop development of biofortified staple food crops under harvestplus. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development* 17: 11905-11935. doi:10.18697/ajfand.78.HarvestPlus05.
- Atlin, G.N., N. Palacios, R. Babu, B. Das, D.K. Twumasi-Afriye, D.K. Friesen, H. De Groote, B. Vivek, and K.V. Pixley. 2011. Quality protein maize: Progress and prospects. In: J. Janick, editor *Plant Breeding Reviews*. Plant Breeding Reviews 34: 83 - 129.

- Azmach, G., M. Gedil, A. Menkir, and C. Spillane. 2013. Marker-trait association analysis of functional gene markers for provitamin a levels across diverse tropical yellow maize inbred lines. *BMC Plant Biol* 13: 227. doi:10.1186/1471-2229-13-227.
- Babu, R., N.P. Rojas, S. Gao, J. Yan, and K. Pixley. 2013. Validation of the effects of molecular marker polymorphisms in *lcy1* and *crtrb1* on provitamin a concentrations for 26 tropical maize populations. *Theor Appl Genet* 126: 389-399. doi:10.1007/s00122-012-1987-3.
- Bänziger, M., P.S. Setimela, D. Hodson, and B. Vivek. 2006. Breeding for improved abiotic stress tolerance in maize adapted to southern africa. *Agricultural Water Management* 80: 212-224. doi:10.1016/j.agwat.2005.07.014.
- Bänziger, M., G.O. Edmeades, D. Beck, and M. Bellon. 2000. Breeding for drought and nitrogen stress tolerance in maize: From theory to practice. CIMMYT, Mexico, D.F.
- Bänziger, M., G.O. Edmeades, and H.R. Lafitte. 1999. Selection for drought tolerance increases maize yields across a range of nitrogen levels. *Crop Science* 39: 1035. doi:10.2135/cropsci1999.0011183X003900040012x.
- Beckles, D.M., and M. Thitisaksakul. 2014. How environmental stress affects starch composition and functionality in cereal endosperm. *Starch-Starke* 66: 58-71. doi:10.1002/star.201300212.
- Betrán, F.J., D. Beck, M. Bänziger, and G.O. Edmeades. 2003. Genetic analysis of inbred and hybrid grain yield under stress and nonstress environments in tropical maize. *Crop Science* 43: 807-817.
- Bolaños, J., and G.O. Edmeades. 1996. The importance of the anthesis-silking interval in breeding for drought tolerance in tropical maize. *Field Crops Research* 48: 65-80. doi:10.1016/0378-4290(96)00036-6.
- Bouis, H.E., C. Hotz, B. McClafferty, J.V. Meenakshi, and W.H. Pfeiffer. 2011. Biofortification: A new tool to reduce micronutrient malnutrition. *Food Nutr Bull* 32: S31-40.
- Bouis, H.E., and R.M. Welch. 2010. Biofortification--a sustainable agricultural strategy for reducing micronutrient malnutrition in the global south. *Crop Sci.* 50: S-20-S-32. doi:10.2135/cropsci2009.09.0531.
- Cabrera-Soto, L., K. V. Pixley, A. Rosales-Nolasco, L.A. Galicia-Flores, and N. Palacios-Rojas. 2018. Carotenoid and Tocochromanol Profiles during Kernel Development Make Consumption of Biofortified “Fresh” Maize an Option to Improve Micronutrient Nutrition. *J. Agric. Food Chem.* 66(36): 9391–9398 Available at <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.8b01886>.
- Cairns, J.E., J. Crossa, P.H. Zaidi, P. Grudloyma, C. Sanchez, J.L. Araus, S. Thaitad, D. Makumbi, C. Magorokosho, M. Bänziger, A. Menkir, S. Hearne, and G.N. Atlin. 2013. Identification of drought, heat, and combined drought and heat tolerant donors in maize. *Crop Science* 53. doi:10.2135/cropsci2012.09.0545.
- Chander, S., Y.Q. Guo, X.H. Yang, J. Zhang, X.Q. Lu, J.B. Yan, T.M. Song, T.R. Rocheford, and J.S. Li. 2008. Using molecular markers to identify two major loci controlling carotenoid contents in maize grain. *Theor Appl Genet* 116: 223-233. doi:10.1007/s00122-007-0661-7.

- Chandler, K., A.E. Lipka, B.F. Owens, H. Li, E.S. Buckler, T. Rocheford, and M.A. Gore. 2013. Genetic analysis of visually scored orange kernel color in maize. *Crop Science* 53: 189. doi:10.2135/cropsci2012.02.0129.
- Cuttriss, A.J., E.T. Cazzonelli, E.T. Wurtzel, and B.J. Pogson. 2011. Carotenoids. In: F. Rebeille, and R. Douce, editors, *Biosynthesis of vitamins in plants. Advances in Botanical Research* 58: 1 - 36.
- Dhliwayo, T., N. Palacios-Rojas, J. Crossa, and K.V. Pixley. 2014. Effects of s recurrent selection for provitamin a carotenoid content for three open-pollinated maize cultivars. *Crop Science* 54: 2449. doi:10.2135/cropsci2013.11.0764.
- Egesel, C.O., J.C. Wong, R.J. Lambert, and T.R. Rocheford. 2003. Combining ability of maize inbreds for carotenoids and tocopherols. *Crop Science* 43: 818-823. doi:10.2135/cropsci2003.8180.
- Gao, S.B., C. Martinez, D.J. Skinner, A.F. Krivanek, J.H. Crouch, and Y.B. Xu. 2008. Development of a seed DNA-based genotyping system for marker-assisted selection in maize. *Molecular Breeding* 22: 477-494. doi:10.1007/s11032-008-9192-4.
- Griffing, B. 1956. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. *Australian Journal of Biological Sciences* 9: 463-493. doi:<http://dx.doi.org/10.1071/BI9560463>.
- Guzmán, C., J.E. Autrique, S. Mondal, R.P. Singh, V. Govindan, A. Morales-Dorantes, G. Posadas-Romano, J. Crossa, K. Ammar, and R.J. Peña. 2016. Response to drought and heat stress on wheat quality, with special emphasis on bread-making quality, in durum wheat. *Field Crops Research* 186: 157-165. doi:10.1016/j.fcr.2015.12.002.
- Hallauer, A.R., M.J. Carena, J.B. Miranda Filho, and SpringerLink (Online service). 2010. Springer Science+Business Media, LLC, New York, NY.
- Harjes, C.E., T.R. Rocheford, L. Bai, T.P. Brutnell, C.B. Kandianis, S.G. Sowinski, A.E. Stapleton, R. Vallabhaneni, M. Williams, E.T. Wurtzel, J. Yan, and E.S. Buckler. 2008. Natural genetic variation in lycopene epsilon cyclase tapped for maize biofortification. *Science* 319: 330-333. doi:10.1126/science.1150255.
- Institute, S. 2008. *Sas/stat 9.2 user's guide*. SAS Institute, Cary, NC.
- Kurilich, A.C., and J.A. Juvik. 1999. Quantification of carotenoid and tocopherol antioxidants in *zea mays*. *J Agr Food Chem* 47: 1948-1955. doi:DOI 10.1021/jf981029d.
- Lafitte, H.R., and G.O. Edmeades. 1994. Improvement for tolerance to low soil nitrogen in tropical maize ii. Grain yield, biomass production, and n accumulation. *Field Crops Research* 39: 15-25. doi:10.1016/0378-4290(94)90067-1.
- Liu, R.H. 2007. Whole grain phytochemicals and health. *J Cereal Sci* 46: 207-219. doi:10.1016/j.jcs.2007.06.010.
- Masih, I., S. Maskey, F.E.F. Mussá, and P. Trambauer. 2014. A review of droughts on the african continent: A geospatial and long-term perspective. *Hydrology and Earth System Sciences* 18: 3635-3649. doi:10.5194/hess-18-3635-2014.
- Meier, S., O. Tzafadia, R. Vallabhaneni, C. Gehring, and E. Wurtzel. 2011. A transcriptional analysis of carotenoid, chlorophyll and plastidial isoprenoid biosynthesis genes during development and osmotic stress responses in *arabidopsis thaliana*. *BMC Syst Biol* S77: 1-9. doi:10.1186/1752-0509-5-77.

- Menkir, A., W. Liu, W.S. White, B. Mazlya-Dixon, and T. Rocheford. 2008. Carotenoid diversity in tropical-adapted yellow maize inbred lines. *Food Chemistry* 109: 521-529. doi:10.1016/j.foodchem.2008.01.002.
- Menkir, A., and B. Maziya-Dixon. 2004. Influence of genotype and environment on β -carotene content of tropical yellow endosperm maize genotypes. *Maydica* 49: 313-318.
- Messmer, R., Y. Fracheboud, M. Banziger, M. Vargas, P. Stamp, and J.M. Ribaut. 2009. Drought stress and tropical maize: Qtl-by-environment interactions and stability of qtls across environments for yield components and secondary traits. *Theor Appl Genet* 119: 913-930. doi:10.1007/s00122-009-1099-x.
- Messing, S.A.J., S.B. Gabelli, I. Echeverria, J.T. Vogel, J.C. Guan, B.C. Tan, H.J. Klee, D.R. McCarty, and L.M. Amzel. 2010. Structural Insights into Maize Viviparous14, a Key Enzyme in the Biosynthesis of the Phytohormone Abscisic Acid. *Plant Cell* 22(9): 2970–2980 Available at <http://www.plantcell.org/lookup/doi/10.1105/tpc.110.074815>.
- Morris, M., V.A. Kelly, R.J. Kopicki, and D. Byerlee. 2007. Fertilizer use in african agriculture. The International Bank of Reconstruction and Development/The World Bank, Washington, DC, USA.
- Muthusamy, V., F. Hossain, N. Thirunavukkarasu, M. Choudhary, S. Saha, J.S. Bhat, B.M. Prasanna, and H.S. Gupta. 2014. Development of β -carotene rich maize hybrids through marker-assisted introgression of β -carotene hydroxylase allele. *PLoS One* 9(12): 1–22.
- Ortiz-Monasterio, J.I., N. Palacios-Rojas, E. Meng, K. Pixley, R. Trethowan, and R.J. Pena. 2007. Enhancing the mineral and vitamin content of wheat and maize through plant breeding. *J Cereal Sci* 46: 293-307. doi:10.1016/j.jcs.2007.06.005.
- Patterson, H.D., E.R. Williams, and E.A. Hunter. 1978. Block designs for variety trials. *Journal of Agricultural Science (Cambridge)* 90: 395-400.
- Pfeiffer, W.H., and B. McClafferty. 2007. Harvestplus: Breeding crops for better nutrition. *Crop Sci.* 47: S-88-S-105. doi:10.2135/cropsci2007.09.0020IPBS.
- Pixley, K., N. Palacios-Rojas, R. Babu, R. Mutale, R. Surles, and E. Simpungwe. 2013. Biofortification of maize with provitamin a carotenoids. In: S.A. Tanumihardjo, editor *Carotenoids in human health, nutrition and health*. Springer Science and Business Media, New York, USA. p. 271-292.
- Senete, C.T., P.E.D.O. Guimarães, M.C.D. Paes, and J.C. De Souza. 2011. Diallel analysis of maize inbred lines for carotenoids and grain yield. *Euphytica* 182(3): 395–404.
- Simpungwe, E., T. Dhliwayo, M. Palenberg, V. Taleon, E. Birol, A. Oparinde, A. Saltzman, and M.T. Diressie. 2017. Orange maize in zambia: Crop development and delivery experience. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development* 17: 11973-11999. doi:10.18697/ajfand.78.HarvestPlus08.
- Suwarno, W.B., K.V. Pixley, N. Palacios-Rojas, S.M. Kaeppler, and R. Babu. 2015. Genome-wide association analysis reveals new targets for carotenoid biofortification in maize. *Theor Appl Genet* 128: 851-864. doi:10.1007/s00122-015-2475-3.

- Suwarno, W.B., K.V. Pixley, N. Palacios-Rojas, S.M. Kaeppler, and R. Babu. 2014. Formation of heterotic groups and understanding genetic effects in a provitamin a biofortified maize breeding program. *Crop Science* 54: 14-24. doi:10.2135/cropsci2013.02.0096.
- Tanumihardjo, S.A., N. Palacios, and K.V. Pixley. 2010. Provitamin a carotenoid bioavailability: What really matters? *International journal for vitamin and nutrition research. Internationale Zeitschrift für Vitamin- und Ernährungsforschung. Journal international de vitaminologie et de nutrition* 80: 336-350. doi:10.1024/0300-9831/a000042.
- Trachsel, S., M. Leyva, M. Lopez, E.A. Suarez, A. Mendoza, N.G. Montiel, M.S. Macias, J. Burgueno, and F. San Vicente. 2016a. Identification of tropical maize germplasm with tolerance to drought, nitrogen deficiency, and combined heat and drought stresses. *Crop Science* 56. doi:10.2135/cropsci2016.03.0182.
- Trachsel, S., D. Sun, F.M. SanVicente, H. Zheng, G.N. Atlin, E.A. Suarez, R. Babu, and X. Zhang. 2016b. Identification of qtl for early vigor and stay-green conferring tolerance to drought in two connected advanced backcross populations in tropical maize (*zea mays* l.). *PLoS One* 11: e0149636. doi:10.1371/journal.pone.0149636.
- Vallabhaneni, R., C.E. Gallagher, N. Licciardello, A.J. Cuttriss, R.F. Quinlan, and E.T. Wurtzel. 2009. Metabolite sorting of a germplasm collection reveals the hydroxylase3 locus as a new target for maize provitamin a biofortification. *Plant Physiol* 151: 1635-1645. doi:10.1104/pp.109.145177.
- Vázquez-Carrillo, M.G., I. Rojas-Martínez, D. Santiago-Ramos, J.L. Arellano-Vázquez, A. Espinosa-Calderón, M. García-Pérez, and J. Crossa. 2016. Stability analysis of yield and grain quality traits for the nixtamalization process of maize genotypes cultivated in the central high valleys of Mexico. *Crop Science* 56: 3090-3099. doi:10.2135/cropsci2015.09.0558.
- Von Lintig, J. 2010. Colors with functions: Elucidating the biochemical and molecular basis of carotenoid metabolism. *Annu Rev Nutr* 30: 35-56. doi:10.1146/annurev-nutr-080508-141027.
- Wang, Y., and M. Frei. 2011. Stressed food – the impact of abiotic environmental stresses on crop quality. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 141: 271-286. doi:10.1016/j.agee.2011.03.017.
- Wurtzel, E.T., A. Cuttriss, and R. Vallabhaneni. 2012. Maize provitamin a carotenoids, current resources, and future metabolic engineering challenges. *Front Plant Sci* 3: 29. doi:10.3389/fpls.2012.00029.
- Yan, J., C.B. Kandianis, C.E. Harjes, L. Bai, E.H. Kim, X. Yang, D.J. Skinner, Z. Fu, S. Mitchell, Q. Li, M.G. Fernandez, M. Zaharieva, R. Babu, Y. Fu, N. Palacios, J. Li, D. Dellapenna, T. Brutnell, E.S. Buckler, M.L. Warburton, and T. Rocheford. 2010. Rare genetic variation at *zea mays* *ctrb1* increases beta-carotene in maize grain. *Nature genetics* 42: 322-327. doi:10.1038/ng.551.
- Zhang, Y., M.S. Kang, and K.R. Lamkey. 2005. Diallel-sas05. *Agronomy Journal* 97: 1097. doi:10.2134/agronj2004.0260.

CONCLUSIONES GENERALES

El uso de germoplasma alto en PVA, con variación suficiente en el contenido de β -criptoxantina y conocimientos previos respecto al comportamiento de los carotenos PVA facilitó el planteamiento de las hipótesis y el diseño de los experimentos y estudios que hicieron parte de esta tesis. Así, los datos obtenidos y las observaciones hechas aportan al entendimiento de la estabilidad de los carotenos PVA en grano de maíz.

En el *Capítulo 1* la evaluación de la diversidad en contenido y degradación de carotenoides PVA en las líneas de maíz, permitió la identificación de genotipos cuyos contenidos de PVA fueron más estables; igualmente se observó una relación entre la pérdida de carotenos PVA y la cantidad de transcritos de CCD1. Los polimorfismos encontrados en las secuencias de CCD1 y CCD4 se asociaron a las degradaciones de β -criptoxantina y β -caroteno, respectivamente. Sin embargo, dado el número de líneas y los experimentos aquí realizados, se hace necesario la validación de estas asociaciones de forma independiente mediante experimentos de laboratorio. La validación de los polimorfismos/marcadores en otro conjunto de materiales de maíz serían útiles en el futuro usarlos en la selección asistida. Adicionalmente, la información aquí presentada puede emplearse en el programa de mejoramiento de maíz biofortificado con PVA para la selección de genotipos con mayor estabilidad de PVA.

Los resultados obtenidos en el *Capítulo 1*, sugieren que al menos parte de la degradación de los carotenos en el grano de maíz se puede explicar por el polimorfismo en genes que codifican enzimas como la CCD1 y CCD4. Sin embargo, las observaciones y resultados presentados en el *Capítulo 2* sugieren que la morfología y estructura física del grano de maíz, también juegan un papel importante en la estabilidad de los carotenos PVA. Así, basados en la alta degradación de β -caroteno y la mayor estabilidad de β -criptoxantina se estudió más en detalle la degradación de carotenos PVA y su relación con las características físicas del grano

de maíz y se encontró que la acumulación de β -caroteno es mayor en el endospermo harinoso, y la β -criptoxantina se acumula mayormente en el endospermo vítreo. Esta diferenciación en la deposición de los carotenos PVA puede jugar un papel importante en su estabilidad. Por lo tanto sería importante corroborar estas observaciones y realizar estudios de microscopia que permitan a su vez identificar si dichos carotenos se están acumulando en estructuras específicas o se están formando cristales que contribuyan a su estabilidad. Igualmente se encontró una mayor estabilidad de los carotenos PVA en los granos enteros, comparado con los granos sin germen. Sugiriendo el rol de la integridad del grano (y menor exposición a oxígeno) en la estabilidad de los carotenos PVA. Igualmente se observó que el porcentaje de pericarpio también contribuye a la mayor estabilidad de β -caroteno. Por su parte, las correlaciones entre el contenido de TCCM y la estabilidad de los carotenos no fueron significativas, sin embargo la mayor estabilidad de los carotenos en grano completo también puede explicarse por la presencia de TCCM en el germen. Adicionalmente el análisis de componentes principales ubica al γ -TP como parte de los componentes que llevan a mayor estabilidad de los carotenos. Estudios de estabilidad de los carotenos utilizando germoplasma de maíz con mayor variabilidad de TCCM y monitoreando otros compuestos antioxidantes, podrían contribuir aún más a la elucidación de la estabilidad de los carotenos por mecanismos no-enzimáticos.

El estudio del efecto de condiciones abióticas, sequía y bajo nitrógeno, en la acumulación de carotenos PVA, (*Capítulo 3*) corroboran la alta heredabilidad de los carotenoides y la acción génica de tipo aditivo. La heredabilidad, la acción génica y la aptitud combinatoria de los carotenoides PVA no se vieron afectadas por el bajo nivel de N_2 o el estrés por sequía. Por lo tanto, la estrategia de mejoramiento de maíces en condiciones óptimas, debería ser eficaz para aumentar el PVA de maíces en condiciones de bajo N_2 o estrés por sequía. Sin embargo, la concentración de PVA fue más baja tanto en estrés de bajo N_2 como en estrés por sequía. Esto sugiere que el objetivo establecido de $15 \mu\text{g g}^{-1}$ de PVA en maíces biofortificados, puede no ser suficiente si los maíces biofortificados se producen en condiciones de

sequía y bajo N₂ del suelo. Sin embargo, considerando que existe germoplasma superior a 20 µg g⁻¹ de carotenos PVA en el programa de mejoramiento, y la heredabilidad de carotenos PVA es alta, debería ser posible desarrollar variedades que excedan la concentración objetivo y hacer que las pérdidas debidas al estrés sean intrascendentes.