

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GENÉTICA

**ALGUNOS ASPECTOS GENÉTICOS
Y BIOQUÍMICOS DE LAS ANTOCIANINAS
EN POBLACIONES CRIOLLAS DE MAÍZ
DE GRANOS PIGMENTADOS**

EDGAR ESPINOSA TRUJILLO

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

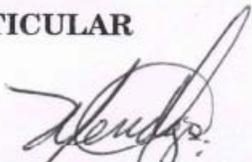
2008

La presente tesis titulada **ALGUNOS ASPECTOS GENÉTICOS Y BIOQUÍMICOS DE LAS ANTOCIANINAS EN POBLACIONES CRIOLLAS DE MAÍZ DE GRANOS PIGMENTADOS** realizada por el alumno **EDGAR ESPINOSA TRUJILLO** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

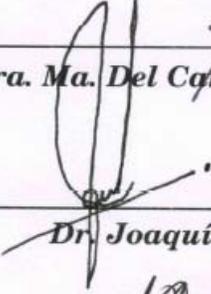
DOCTOR EN CIENCIAS

RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD GENÉTICA

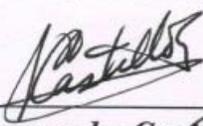
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA: 

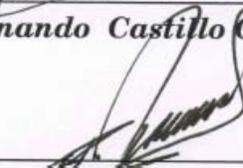
Dra. Ma. Del Carmen Mendoza Castillo

ASESOR: 

Dr. Joaquín Ortiz Cereceres

ASESOR: 

Dr. Fernando Castillo González

ASESORA: 

Dra. Adriana Delgado Alvarado

ASESOR: 

Dr. José Alfredo Carrillo Salazar

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Agosto de 2008.

ALGUNOS ASPECTOS GENÉTICOS Y BIOQUÍMICOS DE LAS ANTOCIANINAS EN POBLACIONES CRIOLLAS DE MAÍZ DE GRANOS PIGMENTADOS

Edgar Espinosa Trujillo, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2008

La variabilidad del color de grano en 114 poblaciones criollas de maíz se clasificó en seis grupos, en el ciclo agrícola PV-2003. Se seleccionaron seis poblaciones, una del blanco, una del amarillo, una del rojo (rojo-2), dos del azul (azul-1 y azul-2) y una del púrpura (rojo-1), para establecer un sistema de cruza dialélicas en el ciclo agrícola PV-2004. En la F_1 semilla de las cruza hubo diferencias entre progenitores, en la cantidad de antocianinas y su distribución en el pericarpio y en la capa de aleurona. Los efectos aditivos (ACG) y maternos (EM) fueron sobresalientes para el grosor del pericarpio y de la aleurona, para la concentración de antocianinas en las mismas estructuras y para su concentración por unidad de peso de grano (CA_{kg}). Por sus efectos de ACG y EM los progenitores rojo-1 y azul-1 fueron los mejores. En el ciclo agrícola PV-2005 se establecieron dos experimentos, uno bajo el diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones donde se midieron variables agronómicas; el segundo consistió de un solo bloque, incluyendo las 30 cruza posibles y los seis progenitores, obteniendo la semilla F_2 con polinización controlada, para medir el color del grano, la CA_{kg} y el rendimiento de antocianinas por planta (RA_{pta}) y por unidad de superficie (RA_{ha}). En esta F_2 , los de ACG fueron los sobresalientes para todos los caracteres mencionados. Los ER fueron significativos sólo para RA_{pta} . La mejor cruza para CA_{kg} fue rojo-1 x rojo-2 (383.6 mg kg^{-1} , con 50.9 % de heterosis) y para RA_{ha} fue rojo-1 x azul-2 (2.9 kg ha^{-1} , con 32.6 % de heterosis). Los progenitores azules y rojos presentaron: cianidina, peonidina y pelargonidina en sus formas glucosiladas y aciladas. Los mejores progenitores en CA_{kg} presentaron diferencias en su actividad antioxidante, siendo el rojo-1 el de valores más altos, lo cual se explicó por su mayor acumulación de antocianinas glucosiladas.

Palabras clave: antocianinas, pigmentos, aptitud combinatoria, maíz criollo, heterosis.



SOME GENETIC AND BIOCHEMICAL ASPECTS OF ANTHOCYANINS OF NATIVE MAIZE POPULATIONS WITH PIGMENTED KERNELS

Edgar Espinosa Trujillo, Ph.D.

Colegio de Postgraduados, 2008

The color grain variation of 114 maize native populations was classified in six groups, during the spring-summer cycle of production of 2003. Six populations were selected, one of the white group, one of the yellow, one of the red (red-2), two of the blue (blue-1 and blue-2) and one of the purple (red-1), to establish a diallelic cross system during the spring-summer cycle of 2004. There were differences on the F_1 seed of crosses between parental populations on anthocyanin amount, and its distribution in the pericarp and aleurone layer of the grain. The additive (GCA) and maternal effects (ME) were significant for pericarp and aleurone thickness, in their anthocyanin concentration and anthocyanin concentration per unit weight of grain (AC_{kg}). The parental populations red-1 and blue-1 were outstanding due to their GCA and ME. In 2005 two experiments were established on the spring-summer cycle, in one of them were evaluated agronomic traits and at the other, F_2 seed of the 30 possible crosses (direct and reciprocal) and the six parental populations was obtained by hand pollination in order to measure grain color, AC_{kg} and anthocyanin yield (AY) per plant (AY_{pta}). In this generation (F_2 seed), GCA resulted significant for the four traits mentioned before. Reciprocal effects were significant only for AY_{pta} . The cross red-1 x red-2 outyielded the other crosses in AC_{kg} (383 mg kg^{-1} , with 50.9 % of heterosis) and the cross red-1 x blue-2 was the best in AY_{ha} (2.9 kg ha^{-1} with 32.6 % of heterosis). The red and blue parental populations presented acylated types of cyanidin, peonidin and pelargonidin. The concentration and proportion of them were related with color and color intensity of the grain. The best AC_{kg} parental populations presented differences in their antioxidant activity; red-1 had the highest values, which were explained by the high accumulation of glucosylated anthocyanins.

Key words: anthocyanins, natural pigments, combining ability, native maize, populations, heterosis.



AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por proporcionarme el soporte financiero que me permitió conducir mi programa Doctoral en el Colegio de Postgraduados en el periodo 2003-2006.

Al Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Campus Montecillo, donde adquirí mi formación académica con enfoque en Mejoramiento Genético Vegetal.

A los integrantes de mi Consejo Particular:

Dra. María de Carmen Mendoza Castillo. Le agradeceré por siempre el haberme conducido en el camino de la investigación agronómica, desde mi Licenciatura en la UACH, el paso por la Maestría en Ciencias en Genética en el CP. y recientemente hasta el fin de mi programa Doctoral en la misma área del conocimiento. El presente estudio tuvo solidez por su constante apoyo, motivación y porque realmente cumplió su papel como Consejera, inclusive a regañadientes pero finalmente he terminado una etapa mas de mi vida.

Dr. Joaquín Ortiz Cereceres. A quien he admirado desde la época de estudiante de licenciatura, cuyos postulados fisiotécnicos fueron un factor motivante para emprender mi vocación por la investigación, dirigida al entendimiento del mejoramiento genético como un sistema multidisciplinario. Gracias también por sus comentarios y observaciones, algunas veces “duras”, que hasta ahora comprendo la importancia de que, además de una sólida formación académica, el investigador debe contar con ferreos valores morales que al combinarse con las habilidades dan como resultado el éxito en varios sentidos de la vida. Nunca olvidaré su famoso dicho “más vale cabeza de ratón que cola de león”.

Dr. Fernando Castillo González. Quien aportó atinadas observaciones y comentarios, a través de su agudo análisis durante el desarrollo de las fases de la presente investigación. Algo particular de agradecer, es su disponibilidad en todo momento para comentar los avances del trabajo, sus aportaciones bibliográficas y su particular sabiduría en la formación de los estudiantes.



Dr. Alfredo Carillo Salazar. Gracias por sus enseñanzas y apoyo moral para finalizar mi programa doctoral.

Dr. Adriana Delgado Alvarado. Le agradezco su tiempo, comprensión y apoyo durante mi periodo de formación académica.

Al personal administrativo del Programa de Genética: Dalila Torres, Leonor, Gina, quienes incondicionalmente me apoyaron cada cutrimestre en los trámites propios del programa de postgrado

Especial agradecimiento al **Dr. José de Molina Galán** (CP) por su amistad y gran calidad humana.

Similarmente, agradezco a la Dra. **Yolanda Salinas Moreno, MC Cesar Feria** y **Dra. Griselda Vazquez Carrillo** (INIFAP) por sus enseñanzas sobre pigmentos del maíz en el Laboratorio de Calidad del Maiz.



DEDICATORIA

A mi padre, Profesor Edbino Espinosa Paz quien se ausentó de este mundo antes de llegar este momento especial.

A mi abuelita Elvira Paz Gatica que nunca dejo de apoyarme en todos los sentidos, al igual que mis tíos: Antonia, Irma, David, Arcelia, principalmente.

A mi madre quien veló por mí en mi desarrollo profesional

A mi colega Ivonné Castro Montes, quién siempre ha sido mi mano derecha desde que nos conocimos en el Colegio de Postgraduados. También a sus padres (Don Raymundo y Doña Vona), por su infinito cariño y apoyo incondicional.

A mis hermanos (Rosa, Fredy, Marco y Bladimir) y sobrinos que han sido mi inspiración y apoyo en todo momento.

A Nainari Castro y Suheily Castro, que siempre he recibido sus ánimos y apoyo para lograr mis metas.

A mis compañeros de Postgrado: Susy, Gilberto, Beto, Berdeja, Emiliano, Agapo, Carlos y muchos mas, que en cierta manera hemos pasado por las aulas y horas de estudios en Colegio de Postgraduados.

A los compañeros administrativos de la Biblioteca Hugo, Raymundo, Mario, Juanito y la Lic., gracias por su disponibilidad.



CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	ii
ABSTRACT.....	iii
LISTA DE CUADROS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
Objetivos.....	5
Hipótesis.....	6
CAPÍTULO II. BASES BIOQUÍMICAS DE LA ACUMULACIÓN Y FUNCIÓN DE LAS ANTOCIANINAS EN MAÍZ.....	7
CAPÍTULO III. GENÉTICA DE LA BIOSÍNTESIS Y ACUMULACIÓN DE ANTOCIANINAS EN EL GRANO DE MAÍZ.....	45
CAPÍTULO IV. VARIABILIDAD FENOTÍPICA ENTRE POBLACIONES DE MAÍZ CON DIFERENTES GRADOS DE PIGMENTACIÓN.....	63
Resumen.....	63
Introducción.....	64
Materiales y Métodos.....	64
Resultados y Discusión.....	66
Conclusiones.....	71
Literatura citada.....	72
CAPÍTULO V. ACUMULACIÓN DE ANTOCIANINAS EN PERICARPIO Y ALEURONA DEL GRANO Y SUS EFECTOS MATERNOS EN POBLACIONES CRIOLLAS DE MAÍZ PIGMENTADO.....	74
Resumen.....	74
Introducción.....	75
Materiales y Métodos.....	76



Resultados y Discusión.....	80
Conclusiones.....	89
Literatura citada.....	90
CAPÍTULO VI. APTITUD COMBINATORIA DEL RENDIMIENTO DE ANTOCIANINAS Y DE CARACTERÍSTICAS AGRONÓMICAS EN POBLACIONES CRIOLLAS DE MAÍZ PIGMENTADO.....	93
Resumen.....	93
Introducción.....	94
Materiales y Métodos.....	95
Resultados y Discusión.....	100
Conclusiones.....	111
Literatura citada.....	112
CAPÍTULO VII. ANTOCIANINAS ASOCIADAS AL COLOR AZUL Y ROJO DEL GRANO DE POBLACIONES CRIOLLAS DE MAÍZ Y SUS CRUZAS POSIBLES.....	116
Resumen.....	116
Introducción.....	117
Materiales y Métodos.....	119
Resultados y Discusión.....	124
Conclusiones.....	137
Literatura citada.....	138
CAPÍTULO VIII. DISCUSIÓN GENERAL.....	142
CAPÍTULO IX. CONCLUSIONES GENERALES.....	156
CAPÍTULO X. LITERATURA CITADA.....	158



LISTA DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
2.1	Tipos de antocianinas presentes en el grano de maíz de colores.....	32
2.2	Tipos de antocianinas y contenido relativo en el pericarpio y en la capa de aleurona del grano de algunas poblaciones criollas de maíz de México y del Perú.....	33
3.1	Estructura genética de la capa de la aleurona sin la capacidad de biosíntesis de antocianinas.....	47
3.2	Estructura genética de la capa de aleurona con la capacidad de biosíntesis de antocianinas y su relación con el color.....	48
3.3	Genes participantes en la biosíntesis de antocianinas y otros pigmentos en la planta de maíz.....	53
4.1	Vectores propios, varianza explicada y valores propios de los dos primeros componentes principales. Montecillo, México. 2003.....	68
4.2	Variables del color de grano por grupo de poblaciones de maíz, con base en el análisis de conglomerados. Montecillo, México. 2003.....	69
4.3	Variables agronómicas de poblaciones de maíz agrupadas con base en el análisis multivariado del color de grano. Montecillo, México. 2003.....	71
5.1	Biomasa y grosor de los tejidos de almacenamiento (pericarpio y capa de aleurona) y biosíntesis de antocianinas en el grano de seis poblaciones criollas de maíz de color de grano contrastados. Montecillo, México, 2004.....	82
5.2	Contenido de antocianinas en pericarpio, en capa de aleurona y en grano completo de seis poblaciones criollas de maíz de colores contrastados. Montecillo, México, 2004.....	83
5.3	Cuadrados medios del análisis de varianza de la biomasa del grano, grosor del tejido de almacenamiento y contenido de antocianinas, en un dialélico completo entre seis poblaciones criollas de maíz de color de grano contrastado. Montecillo, México, 2004.....	86
5.4	Valores de los efectos maternos y de la aptitud combinatoria general sobre las características morfológicas del grano y acumulación de antocianinas de seis poblaciones criollas de maíz contrastantes en color de grano. Montecillo, México, 2004.....	88
6.1	Características agronómicas, componentes del rendimiento y contenido de antocianinas en cinco poblaciones criollas de maíz estudiadas en el experimento dialélico. Montecillo, Edo.	101



	de México, 2005.....	
6.2	Cuadrados medios del análisis de varianza de las cruzas posibles entre cinco poblaciones criollas de maíz con diferentes grados de pigmentación. Evaluación de la generación F ₂ , Montecillo, Edo. de México, 2005.....	103
6.3	Efectos de ACG en variables agronómicas de cinco poblaciones criollas de maíz contratadas en color de grano. Evaluación de la generación F ₂ , Montecillo, Edo. de México, 2005.....	104
6.4	Concentración y rendimiento de antocianinas de poblaciones criollas de maíz contrastadas en color de grano y en sus cruzas posibles (directas y recíprocas). Montecillo, México, 2005.....	106
6.5	Clasificación de granos de la F ₂ de cruzas dialélicas entre cinco poblaciones criollas de maíz, con base en la tonalidad del color (imagen) y frecuencia (%) en cada cruza. Montecillo, Edo. de México, 2005.....	110
8.1	Poblaciones criollas de maíz clasificadas por su color de grano. Montecillo, 2003.....	145



LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Página
2.1	Estructura química general de los flavonoides. A, B y C son anillos aromáticos. Los números indican los carbonos de la molécula.....	12
2.2	Estructura química de una molécula de antocianina. Se observa la adición de la molécula de glucosa en el carbono 3 de la estructura.....	22
2.3	Ruta de biosíntesis de las antocianinas monoglucosiladas y de flobafenos en el citoplasma en maíz.....	24
2.4	Estructura general de una molécula de antocianina acilada. Se observan dos moléculas de glucosa en los carbonos 3 y 5 más un grupo acilo unido a la glucosa del carbono 3.....	26
2.5	Formas de transporte y acumulación de antocianinas en la vacuola: mediante proteínas transportadoras presentes en la vacuola (I) y por vesículas membranosas (II). Adaptado de Kitamura (2006)	30
3.1	Control genético de la biosíntesis de antocianinas y de flobafenos en el grano del maíz.....	57
4.1	Dispersión de 114 poblaciones de maíz en el plano determinado por los dos primeros componentes principales. Grupos caracterizados por el color de grano.....	67
5.1	Diagrama correspondiente al corte transversal del grano para la medición del grosor del pericarpio y de la aleurona....	78
5.2	Colores del grano completo y sus estructuras (pericarpio y capa de aleurona) de seis poblaciones criollas de maíz, contrastadas en color de grano. Montecillo, México, 2004.....	81
7.1	Cromatograma de cuatro antocianinas estándar usado para la determinación correspondiente, en los progenitores y las cruza de maíz criollo.....	123
7.2	Perfil de absorbancia, en el intervalo de 400 a 700 nm, del extracto del maíz azul-1, rojo-1, el blanco, almidón y de zeína.....	124
7.3	Concentración de antocianinas en el grano de poblaciones criollas de maíz contrastadas en su color y en sus cruza posibles. En cada barra se tiene el error estándar de tres repeticiones. R1= rojo-1, R2= rojo-2, A1= azul-1, A2=azul-2, Am= amarillo, B= blanco.....	126
7.4	Relación entre la concentración de antocianinas en el grano con la cromaticidad en poblaciones y cruza posibles de maíz.....	127



7.5	Contenido total de antocianinas y su distribución en las estructuras del grano de las poblaciones criollas azul-1, rojo-1 y sus cruzas.....	128
7.6	Antocianinas del pericarpio del grano de la población rojo-1. 1=Cianidina, 2=Pelargonidina, 3=Peonidina. 1', 2' y 3' corresponden a las versiones aciladas de cada una de las antocianinas, respectivamente.....	130
7.7	Antocianinas del grano de las poblaciones criollas rojo-1 y rojo-2. 1=Cianidina, 2=Pelargonidina, 3=Peonidina. 1', 2' y 3' corresponden a las versiones aciladas de cada una de las antocianinas, respectivamente.....	131
7.8	Antocianinas del grano de las poblaciones criollas azul-1 y azul-2. 1=Cianidina, 2=Pelargonidina, 3=Peonidina. 1', 2' y 3' corresponden a las versiones aciladas de cada una de las antocianinas, respectivamente.....	133
7.9	Antocianinas del grano de cruzas donde el progenitor rojo-1 fungió como hembra. 1=Cianidina, 2=Pelargonidina, 3=Peonidina. 1', 2' y 3' son versiones aciladas de las antocianinas respectivas.....	134
7.10	Actividad antioxidante del extracto de antocianinas de las poblaciones criollas rojo-1, azul-1 y algunas cruzas, sobresalientes por su mayor contenido de antocianinas.....	136



I. INTRODUCCIÓN GENERAL

México es considerado como el centro de origen y domesticación del maíz, así como el punto de distribución de esta especie (*Zea mays* spp. *mays*) hacia varias regiones del mundo (Miranda, 2003; Matzuoka, 2005). El proceso de domesticación fue llevado a cabo por los grupos étnicos, dando lugar a una amplia variabilidad en características de la planta, de la mazorca y del grano (Johannessen, *et al.*, 1970), que al estudiarse permitió clasificarla en razas y subrazas (Hernández X., 1985). Dentro de razas y entre ellas existe gran variación en el color del grano, lo que se ha comprobado en las razas mexicanas (Wellhausen *et al.*, 1951), peruanas (Grobman *et al.*, 1961) y en otras cultivadas en varios países (Goodman y Bird, 1977); por ello, es habitual observar e identificar colores de grano, como blanco, amarillo, anaranjado, café, azul, rojo, guinda, negro, púrpura, pinto, variegado y moteado (Johannessen, 1982; Aragón, 2006), entre otras tonalidades, cuya caracterización es inconsistente y subjetiva (Ron *et al.*, 2006). No obstante, Johannessen (1970) menciona que el color del grano tuvo un significado religioso, relacionado con las cuatro direcciones cardinales por las que el viento corre: amarillo al norte, azul al oeste, rojo al sur y blanco al este. En algunos nichos ecológicos de México, los colores del grano son marcadores fenotípicos de la precocidad que los productores asignaron a las variedades criollas a través de selección (Muñoz, 2003). Así, los tonos rojo y azul se seleccionaron por razones culturales, entre ellas las estéticas, lo cual fue posible porque en determinado tiempo y espacio los genes codificadores de factores de transcripción (*r1* y *c1*) manifestaron un cambio en sus secuencias de bases por efecto de transposones (genes móviles), lo que les confirió la capacidad de activar los genes de la ruta de biosíntesis de antocianinas, pigmentos responsables de estos colores de grano (Doebley *et al.*, 2006).

Las variantes de color de grano continúan sembrándose en México como poblaciones criollas, las cuales son nativas de las diferentes regiones



agroecológicas del país y son consideradas así, desde el punto de vista genético, geográfico y cultural; entre ellas predominan los colores blanco y amarillo sobre el azul, rojo y los pintos; comportamiento relacionado con la mayor demanda del grano blanco en el mercado, mientras que los demás colores comunmente se destinan al autoconsumo (Brush y Perales, 2007) y fueron menospreciados en la política enfocada al mejoramiento genético y a la comercialización del maíz blanco en el país (Muñoz, 2003). En el mismo sentido, en la industria de la harina de maíz es deseable el grano de color blanco, además de que éste sea grande, uniforme, denso, que su pericarpio se desprenda con facilidad y que se haya desarrollado en mazorcas con olote blanco (Pajic, 2007), ya que los granos obtenidos de oletes rosados y rojos contienen compuestos fenólicos que le confieren un color indeseable a los productos derivados (Serna, 2004), como la tortilla elaborada con granos cremosos que tienen alto contenido de ácidos fenólicos, donde el color resultante no es completamente blanco, por lo cual el producto no es aceptado por el consumidor y tampoco el grano es fácil de comercializar (Salinas *et al.*, 2007). Por el contrario, el grano azul se reconoce actualmente como un tipo “especial” de maíz destinado a la producción de harina “orgánica” y a la elaboración de frituras (Serna, 2004); no obstante, siempre se ha usado el maíz azul y rojo en una amplia variedad de alimentos mexicanos (Cortés *et al.*, 2005; Muñoz, 2003). Inclusive, en algunas zonas del país la masa y tortillas hechas a partir de maíces criollos azules presentan mayor calidad nutracéutica que las elaboradas con maíz blanco (Rangel *et al.*, 2004).

Por otra parte, las plantas de maíz en ambientes de clima templado-frío y alta irradiación acumulan antocianinas y otros flavonoides en las vacuolas de las células epidérmicas foliares, como un mecanismo de fotoprotección de los cloroplastos a esas condiciones (Pietrini *et al.*, 2002; Irani y Grotewold, 2004). Inclusive, estos pigmentos se acumulan en cualquier órgano vegetativo de la planta, en respuesta a la radiación ultravioleta (UV-B) (Singh *et al.*, 1999). Por ello, estos pigmentos junto con la expresión de una amplia variedad de proteínas,



le confieren tolerancia a la radiación UV-B a determinadas razas de maíz que se cultivan en los Valles Altos Centrales de México (Casati *et al.*, 2005), lo cual es importante puesto que a largo plazo se espera que se incremente este tipo de radiación, como consecuencia del cambio climático global (Caldwell *et al.*, 2003).

Las antocianinas son compuestos derivados del metabolismo secundario y pertenecen al grupo de fitoquímicos conocido como flavonoides. Una de sus propiedades ópticas es el color por lo que se denominan pigmentos, los cuales pueden encontrarse acumulados en vacuolas de hojas, flores, frutos, semillas y otros órganos de la planta (Tanaka, 2008). Su estructura química se compone de una antocianidina o aglucón, de la cual se conocen varios tipos (pelargonidina, cianidina, delfinidina, petunidina, peonidina y malvidina) con base en el número y posición de los grupos hidroxilo (OH) y metoxilo (OCH₃), de una o varias moléculas de carbohidrato, comúnmente glucosa, y de varios ácidos orgánicos. De esta manera, la combinación de las moléculas origina más de 500 estructuras de antocianinas, de las cuales el 50% se basa en cianidina, 12% en pelargonidina, 12% en delfinidina, 7% en petunidina y 7% en malvidina (De Pascual y Sánchez, 2008).

Debido a la presencia de grupos hidroxilo y grupos acilo en su estructura química, las antocianinas tienen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y previenen el desarrollo de varios tipos de cáncer (Kowalczyk *et al.*, 2003); es decir, las propiedades dependen del tipo de antocianina (Chen *et al.*, 2007; Mazza, 2007). Es por esto que el grano de maíz azul y púrpura son objeto de estudios fitoquímicos para determinar el contenido y tipo de antocianinas, su variación por efecto del ambiente, además de ensayos biomédicos para conocer su actividad biológica (Jing, 2006; Pedreschi, 2005). En este contexto, por su contenido de flavonoides se considera al maíz azul una fuente de compuestos nutraceuticos (Serna, 2004).



Como el mejoramiento genético de características agronómicas del maíz azul es aún incipiente (Antonio *et al.*, 2004) y en vista de la gran utilidad del maíz pigmentado con antocianinas, resulta elemental generar mayor conocimiento, adicional al obtenido por los productores (fitomejoradores tradicionales) sobre las propiedades de los maíces, en función del color del grano, que permitan diseñar una estrategia de mejoramiento genético del maíz enfocado al desarrollo de poblaciones con alto contenido de antocianinas que cubra las necesidades humanas: nutricionales, de salud, industriales y otras.

La presente investigación se conforma de varios capítulos. En el II y el III se muestra una revisión y análisis de la información científica disponible sobre la ruta biosintética de las antocianinas en las plantas, de los genes estructurales que codifican las enzimas catalíticas y aquellos que codifican los factores que regulan la transcripción de los genes estructurales. El Capítulo IV contiene el análisis de la variabilidad del color de grano de 114 poblaciones de maíz, la cual se clasifica en seis tipos de color, con base en el análisis de componentes principales y de agrupamiento. En el Capítulo V se presentan los resultados del análisis de los efectos maternos sobre el contenido y distribución del pigmento en las estructuras del grano de la generación F₁ semilla, resultante de un sistema de cruza dialélicas entre seis poblaciones criollas de maíz seleccionadas de los grupos delimitados por su color de grano. El Capítulo VI muestra el análisis de la aptitud combinatoria de las características agronómicas y de la heterosis para el contenido de antocianinas por unidad de peso de grano, así como el rendimiento de antocianinas por unidad de superficie, expresadas en la F₂ semilla, considerando cuatro poblaciones pigmentadas y una incolora. El Capítulo VII trata del contenido por unidad de peso de grano, su relación con el color y con la actividad antioxidante; también se determinan los tipos de antocianinas encontrados en los progenitores pigmentados y en algunas cruza sobresalientes por su alto contenido de pigmento. Finalmente, en el Capítulo VIII se presenta la discusión general de los resultados de la presente investigación, dando énfasis a



los criterios por considerar en el mejoramiento genético para la obtención del arquetipo de maíz para alto rendimiento de antocianinas por planta y por unidad de superficie así como el énfasis que debe darse al maíz criollo mexicano como alimento funcional.

OBJETIVOS

Los objetivos de índole general definidos para el presente trabajo son:

- 1) Hacer un análisis de la información científica disponible sobre la ruta de biosíntesis de antocianinas y sobre su control genético en las plantas.
- 2) Analizar la variabilidad fenotípica del color de grano de 114 poblaciones de maíz usando las técnicas multivaridas de componentes principales y de agrupamiento.
- 3) Estudiar los efectos maternos sobre la biosíntesis, acumulación y distribución de las antocianinas en las estructuras del grano desarrollado en las cruzas posibles (directas y recíprocas) entre seis poblaciones criollas de maíz contrastadas en color de grano.
- 4) Cuantificar los efectos de Aptitud Combinatoria General, Aptitud Combinatoria Específica, Maternos y Recíprocos de las características agronómicas, del contenido de antocianinas y de su rendimiento por unidad de superficie, en las cruzas posibles de cinco poblaciones criollas contrastadas en su color y contenido de antocianinas.
- 5) Determinar los tipos de antocianinas acumulados en el grano de poblaciones de color azul y rojo y sus cruzas, así como cuantificar la actividad antioxidante del extracto de las antocianinas como uno de los criterios para valorar sus propiedades nutraceuticas.



HIPÓTESIS

- 1) La ruta de biosíntesis de antocianinas en el maíz es un sistema metabólico complejo, de manera que la producción y acumulación de este pigmento en el grano se puede estudiar como una característica cuantitativa.
- 2) Los granos de poblaciones criollas de maíz se clasifican en patrones de color, considerando su medición objetiva y subjetiva, mediante su análisis multivariado.
- 3) La selección de poblaciones representativas de los grupos de color de grano y la formación de cruza posibles entre ellas, permite determinar la magnitud de los efectos maternos de la acumulación y distribución de las antocianinas en la F₁ semilla, de manera que los progenitores pigmentados presentarán el mayor efecto con respecto a los incoloros.
- 4) Los efectos aditivos, estimados mediante la Aptitud Combinatoria General, son los que explican la expresión fenotípica de las características agronómicas, de la concentración de antocianinas por unidad de peso de grano y del rendimiento del pigmento por unidad de superficie.
- 5) La combinación y concentración de los tres tipos básicos de antocianinas: cianidina, pelargonidina y delphinidina, en sus formas glucosiladas y aciladas, determinan la coloración del grano de las poblaciones azules y rojas.



II. BASES BIOQUÍMICAS DE LA ACUMULACIÓN Y FUNCIÓN DE LAS ANTOCIANINAS EN MAÍZ

RESUMEN

Las antocianinas son compuestos derivados del metabolismo secundario de las plantas. En las flores cumplen la función de atraer insectos polinizadores y en las hojas protegen las células del mesófilo del daño por radiación ultravioleta. En general, su biosíntesis se estimula por factores ambientales, principalmente con niveles estresantes. En maíz estos compuestos se biosintetizan y acumulan en tallo, hojas y órganos reproductores. Su acumulación en el grano de maíz fue producto de la selección practicada por los grupos étnicos mesoamericanos, dando lugar a variantes de color dentro de razas. Los colores comunmente encontrados son rojo, azul y negro-púrpura. La estructura química de las antocianinas se va formando a través de una ruta biosintética en donde participan ocho enzimas: chalcona sintetasa, chalcona isomerasa, flavonoide-3-hidroxilasa, flavonoide-3'-hidroxilasa, flavonoide-3',5'-hidroxilasa, dihidroflavonol reductasa, antocianidina sintetasa, flavonoide glucosil transferasa (CHS, CHI, F3H, F3'H, F3'5'H, DFR, ANS y FGT, respectivamente) las cuales desarrollan la biosíntesis en la superficie del retículo endoplásmico. Las antocianinas básicas son: cianidina-3-glucósido, pelargonidina-3-glucósido y delphinidina-3-glucósido. Su transporte y acumulación en las vacuolas requiere de la enzima GST, ésta conjuga las antocianinas con glutatión para facilitar su ingreso a la vacuola. Existe otra ruta de transporte de las antocianinas hacia las vacuolas, en donde son envueltas en vesículas membranosas derivadas del retículo endoplásmico. Dentro de las vacuolas las antocianinas cambian estructuralmente, cuando otras enzimas añaden a la estructura básica moléculas de glucosa (flavonoide glucosiltransferasas), moléculas de ácidos orgánicos (antocianina aciltransferasas) y grupos metilo (antocianina metiltransferasas) lo que amplía la variación en tipos de



antocianinas. Estas nuevas formas son más estables a ciertas condiciones ambientales y causan cambios en la tonalidad e intensidad del color de los granos. La ruta de biosíntesis es compleja ya que varias enzimas (F3H, F3'H, F3'5'H y DFR) compiten por los mismos sustratos, aunque algunas tienen mayor afinidad o preferencia por un determinado sustrato. En el grano de maíz se han encontrado antocianinas conformadas por cianidina, pelargonidina, peonidina y malvidina. La peonidina es una versión transformada de la cianidina y la malvidina es derivada de la delfinidina.

Cuando la enzima DFR no es funcional, la ruta biosintética se desvía hacia la producción de flobafenos, pigmentos que se acumulan en las paredes celulares del pericarpio y le confieren un color rojo-ladrillo.

La ruta biosintética de las antocianinas se considera un modelo de estudio para conocer la estructura de los genes, su expresión y regulación, así como para el conocimiento profundo de la función de las enzimas participantes.

Palabras clave: antocianinas, biosíntesis, pigmentos, maíz pigmentado, enzimas.

INTRODUCCIÓN

En maíz existen dos rutas biosintéticas de flavonoides, en una se producen los compuestos 3-hidroxi flavonoides como las antocianinas, y en la otra, se producen 3-desoxi flavonoides como: 3-desoxiantocianinas, 3-desoxiproantocianidinas, flobafenos y flavanas (Stafford, 1998; Schijlen *et al.*, 2004). Las antocianinas son compuestos coloridos producidos por las plantas superiores de la mayoría de las familias, excepto Aizoaceae, Amaranthaceae, Basellaceae, Cactaceae, Chenopodiaceae, Didiereaceae, Nyctaginaceae, Phytolaccaceae y Portulacaceae, las cuales producen pigmentos denominados betalainas (Iwashina, 2000).

El color amarillo del grano de maíz está relacionado con la biosíntesis de carotenoides, pero el rojo cereza, el azul y el negro-púrpura, con sus tonalidades intermedias, son producidos por las antocianinas; mientras que el “blanco” resulta de la ausencia de esos pigmentos (Ford, 2000). El color rojo-ladrillo del



pericarpio obedece a la acumulación de flobafenos, que son flavan-4-oles polimerizados (Koes *et al.*, 2005). En el grano, la presencia de antocianinas se da en el eje embrionario (Sturaro *et al.*, 1996), en la capa de aleurona (Becraft, 2007) y en el pericarpio (González *et al.*, 2008); estos patrones de pigmentación forman parte de la variabilidad fenotípica y genética que existe en las razas mexicanas de maíz, que ha sido desarrollada por los agricultores nativos de Mesoamérica (Johannssen, 1970) cuyos móviles de selección bajo domesticación fueron de índole alimenticio, ornamental y ceremonial (Hernández X., 1985; Johannessen *et al.*, 1980).

Respecto a los órganos vegetativos, las plantas de maíz en ambientes de clima templado-frío y con alta irradiancia acumulan antocianinas y otros flavonoides en las vacuolas de las células epidérmicas foliares (abaxial/adaxial), como un mecanismo de fotoprotección de los cloroplastos bajo esas condiciones (Pietrini *et al.*, 2002); inclusive, se acumulan en cualquier órgano vegetativo en respuesta a la incidencia de radiación ultravioleta (UV-B) (Singh *et al.*, 1999). Estos pigmentos, junto con la expresión de una amplia variedad de proteínas, en algunas razas de maíz cultivadas en las tierras altas de México les confieren tolerancia a los rayos UV-B (Casati *et al.*, 2005) lo cual es importante estudiar ya que se espera que en el futuro se incremente este tipo de radiación con el inminente cambio climático global (Caldwell *et al.*, 2003).

Entender bioquímicamente la ruta biosintética de las antocianinas ha sido fundamental para emprender o encausar los programas de mejoramiento genético de especies ornamentales, con fines de generar variantes aún más atractivas (Martens *et al.*, 2003; Ando *et al.*, 2004) o con el objetivo de incrementar la concentración del pigmento en los tubérculos (*Solanum tuberosum* e *Ipomoea batatas*) que conlleva a mejorar la calidad del producto (Yoshinaga *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 2003). En el caso de los cereales, se ha reconocido que los granos contienen una amplia variedad de fitoquímicos, incluidas las antocianinas, con propiedades nutraceuticas de gran relevancia en la salud y nutrición humanas



(Dykes y Rooney, 2007; Liu, 2007). Algunos estudios de grano del maíz rojo, azul y negro-púrpura reportan que contienen variados compuestos fenólicos que establecen un sinergismo en la actividad antioxidante, protegiendo las células humanas (De la Parra *et al.*, 2007; Pedreschi y Cisneros, 2007). Particular énfasis se ha hecho para elucidar el potencial que tienen las antocianinas del maíz y del arroz para controlar el desarrollo de las células cancerosas en los humanos (Ni *et al.*, 2006; Pedreschi y Cisneros, 2006), así como otros beneficios a la salud: mejoran la capacidad visual, ayudan a la función cerebral, previenen de la obesidad y diabetes, protegen contra el desarrollo de úlceras gastrointestinales inducidas por ingestión de alcohol, y previenen enfermedades cardiovasculares (Espín *et al.*, 2007). Es por estas razones que el maíz puede considerarse una fuente de pigmento natural de uso tanto en la nutraceutica como en la industria de los alimentos y de los cosméticos.

De acuerdo con Dong *et al.*(2001) es posible entender la ruta de biosíntesis de las antocianinas en el maíz con base en estudios de otras especies vegetales; por consiguiente, en esta revisión se plantea como objetivo compilar y analizar la información científica disponible acerca de la ruta de biosíntesis de las antocianinas y los desoxiflavonoides (flobafenos y 3-desoxiantocianidinas [apigenidina y luteolinidina]) en las plantas superiores, para establecer las bases bioquímico-fisiológicas que permitan entender: la presencia de tales pigmentos en los órganos reproductivas y vegetativas de la planta; su potencial de síntesis y acumulación en algunas razas y variedades de maíz de México; así como respaldar la definición de estrategias para el mejoramiento de esta especie para producir alto contenido de antocianinas en el grano y otros órganos de acumulación.

GENERALIDADES

Los compuestos fenólicos o polifenoles son componentes de los alimentos de origen vegetal y representan el grupo más grande de metabolitos secundarios (más de



6000 moléculas identificadas). El interés sobre estos compuestos radica en su función: como sustratos en reacciones de oscurecimiento oxidativo y antioxidantes, para mejorar la calidad organoléptica y nutricional de frutos y vegetales; por su participación en el desarrollo y metabolismo de las plantas, así como por su actividad fisiológica en los humanos (Kroll *et al.*, 2003).

Manach *et al.* (2004) agrupan a los compuestos fenólicos por el número de anillos fenólicos que conforman su estructura y de los elementos que se unen a estos anillos; así, los compuestos son: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos. Otra forma de agrupación es la de Kroll *et al.* (2003), hecha con base en el número de átomos de carbono que constituyen su estructura química. Un primer grupo incluye a los derivados del ácido hidroxibenzoico, cuya estructura general es C₆-C₁ (por ejemplo, el ácido salicílico y el gálico); variantes de este grupo surgen por la hidroxilación y metoxilación del anillo aromático básico (bencénico). Otro grupo es el que presenta la fórmula general C₆-C₃, son derivados del ácido hidroxinámico que conforman una serie de ácidos trans-fenilpropenóicos; los más comunes son los ácidos caféico, ferúlico, sinápico, p-cumárico y clorogénico. Dixon *et al.* (2002) indican que los dos primeros grupos también se consideran fenilpropanoides, ya que son derivados de la desaminación de la L-fenilalanina, por medio de la enzima fenilalanina amonioliasa (PAL). El tercer grupo lo constituyen los flavonoides, con más de 4000 compuestos caracterizados. Presentan dos anillos aromáticos nombrados A y B, más el heterociclo que contiene un átomo de oxígeno (C) (Figura 2.1); éste es un grupo amplio y diverso, con estructura C₆-C₃-C₆ (Kroll *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2006). Por su parte, Dixon *et al.* (2002) consideran a los flavonoides como fenilpropanoides complejos, porque resultan de la condensación de una unidad de fenil-propano con una unidad de acetato, esta última derivada del malonil coenzima-A.



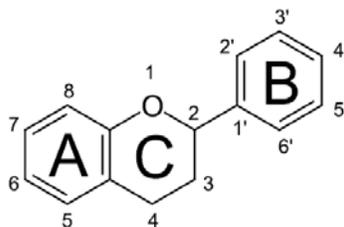


Figura 2.1. Estructura química general de los flavonoides. A, B y C son anillos aromáticos. Los números indican los carbonos de la molécula.

A su vez, los flavonoides tienen varias subclases, tales como: chalconas, flavonas, flavonoles, flavandioles, antocianinas, proantocianinas y auronas (Shirley, 2001). Manach *et al.* (2004) los subdividen, dependiendo de la estructura del anillo C, en: flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianinas, y flavanoles (catequinas y proantocianidinas). Los tipos más frecuentemente encontrados en las semillas son los flavonoles, las antocianinas, los flobafenos, las isoflavonas y las proantocianidinas o taninos condensados (Lepiniec *et al.*, 2006).

La mayoría de las enzimas involucradas en la producción de flavonoides se encuentran ligadas al retículo endoplásmico, posiblemente en un complejo multienzimático; es decir, que el sitio celular exclusivo donde ocurre la síntesis de los flavonoides es el citoplasma (Wagner y Hrazdina, 1984). En *Arabidopsis* se ha encontrado que las enzimas que se agrupan en complejos (metabolones) sobre el retículo endoplásmico son: chalcona sintetasa (CHS), chalcona isomerasa (CHI), dihidroflavonol reductasa (DFR), flavonoide 3-hidroxilasa (F3H) (Lepiniec *et al.*, 2006). Si bien, las enzimas CHS, CHI, F3H, DFR y antocianidina sintetasa (ANS) forman un conglomerado, sus productos intermediarios están sujetos a modificaciones complejas como hidroxilación, metilación, esterificación o glucosilación. Puesto que varias de estas enzimas utilizan más de un sustrato, la ruta biosintética no es lineal sino un sistema complejo (Irani *et al.*, 2003).



LAS ANTOCIANINAS DEL MAÍZ

Para su estudio, la ruta de biosíntesis de las antocianinas en las plantas se divide en cinco fases: 1) síntesis de chalconas, 2) síntesis de flavonoles, 3) síntesis de antocianinas, 4) modificación estructural de las antocianinas (Yu *et al.*, 2006) y 5) transporte de antocianinas hacia las vacuolas (Kitamura, 2006), mismas que se explican a continuación:

1) Síntesis de chalconas

Producción de los compuestos precursores. Para la formación de las chalconas existen dos precursores: p-cumaril-coenzima-A (CoA) y malonil-CoA, derivados de la fenilalanina y de acetil-CoA, respectivamente (Saito y Yamazaki, 2002).

La acetil-CoA es una biomolécula importante en las plantas y se deriva del ácido pirúvico que se sintetiza en las mitocondrias y en los cloroplastos, principalmente. Dado que no traspasa las membranas mitocondriales, la acetil-CoA se regenera en el citoplasma mediante la enzima ATP-citratoliasa, a partir de citrato sintetizado en la mitocondria y usando la acetil-CoA (Fatland *et al.*, 2005). Es a partir de la carboxilación de la acetil-CoA, catalizada por la enzima acetil-CoA carboxilasa (ACC, EC 6.4.1.2), que se forma la malonil-CoA, la cual es importante en la biosíntesis de ácidos grasos, de flavonoides y de otros metabolitos secundarios (Hayashi y Satoh, 2006). Existen dos tipos de ACC en las plantas, la heteromérica y la homomérica, localizadas en los plastidios y en el citoplasma, respectivamente. La familia *Poaceae* sólo presenta la forma homomérica, que participa en la producción de malonil-CoA en el citoplasma (Sasaki y Nagano, 2004).

El aminoácido fenilalanina se produce en la ruta del shiquimato (Yu y Jez, 2008) y para convertirse en p-cumaril-CoA son necesarias tres enzimas: fenilalanina amonioliasa (PAL, EC 4.3.1.5), cinamato-4-hidroxilasa (C4H, EC 1.14.13.11) y 4-cumaril-CoA ligasa (4CL, EC 6.2.1.12) (Davies y Schwinn, 2006). Es común reportar para cada enzima su número de identificación internacional (EC).



La enzima PAL remueve el grupo amino y el protón pro-S de la L-fenilalanina produciendo ácido trans-cinámico. Esta enzima no requiere de cofactores y tiene un peso molecular de 310-340 kDa. En monocotiledóneas PAL es similar a la tirosina amonio liasa (TAL) (Davies y Schwinn, 2006). Especialmente en maíz, la PAL es más activa en un pH de 8.7 en comparación con la TAL (Havir *et al.*, 1971).

La enzima C4H agrega grupos hidroxilo en el carbono 4 del ácido trans-cinámico, en presencia de oxígeno molecular, para formar el ácido trans-4-cumárico. Este ácido es reactivado posteriormente con la enzima 4CL añadiendo CoA para formar un éster de 4-cumaril-CoA, reacción que requiere de adenosín trifosfato (ATP) y Mg^{2+} como cofactores (Yu *et al.*, 2006); este compuesto es intermediario en la ruta general de los fenilpropanoides (Yu y Jez, 2008).

Producción de chalconas mediante la chalcona sintetasa (CHS, EC 2.3.1.74). Ya con los precursores, la ruta biosintética de las antocianinas inicia con la biosíntesis de chalconas, catalizado por CHS; las chalconas son de color amarillo, pero cuando la enzima no es funcional se producen flores blancas, por la ausencia de tales compuestos (Schijlen *et al.*, 2004). En gerbera esta enzima acepta como sustrato al 4-cumaril-CoA y al cafeil-CoA, pero la mayor síntesis de chalconas resulta de 4-cumaril-CoA (Martens y Forkmann, 2000). En *Verbena hybrida* esta enzima usa cafeil-CoA y en *Cosmos spp* usa feruil-CoA (Ben *et al.*, 2002). En gerbera, la CHS reacciona en pH de 6.0 a 6.5 (Martens y Forkmann, 2000), pero en *Antirrhinum majus* el pH (7.0 a 7.5) adecuado para la reacción de la enzima depende del sustrato (cafeil-CoA o p-cumaril-CoA) (Hatayama *et al.*, 2006). La CHS se estudió por primera vez en *Petroselinum crispum* (Petersen *et al.*, 1999).

Por su estructura, la CHS se clasifica como policétido sintetasa tipo III (PKS-III). Es una enzima homodimérica con dos subunidades funcionalmente independientes de 40 a 45 kDa (Springob *et al.*, 2003; Irani *et al.*, 2003). En



alfalfa la CHS tiene un tamaño de 84 kDa (Knaggs, 2001). Se encuentra en el citoplasma o asociada con membranas del retículo endoplásmico o de la vacuola (Petersen *et al.*, 1999) y no requiere de cofactores (Jende, 1993). En maíz, el gene que codifica para esta enzima, en combinación con otros genes reguladores, se expresa en varias partes de la planta: pericarpio, capa de aleurona, espiga, totomoxtle y vainas foliares (Della Vedova *et al.*, 2005).

La CHS condensa tres unidades de acetato (C_2), derivadas de malonil-CoA, con una molécula de p-cumaril-CoA mediante adiciones descarboxilantes (Hatayama *et al.*, 2006; Schijlen *et al.*, 2004; Irani *et al.*, 2003), liberándose tres moléculas de CO_2 (Petersen *et al.*, 1999). El tetracétido resultante es un compuesto intermediario y se cierra para formar 2',4,4',6'-tetrahidroxichalcona, también conocida como chalcona naringenina (Springob *et al.*, 2003). Cuatro residuos son los que participan en la catálisis (Cys-164, His-303, Asn-336 y Phe-215), Cys-164 funciona como nucleófilo y como sitio de unión de los policétidos intermediarios; His-303 actúa como base para la desprotonación del grupo tiol; Asn-336 y Phe-215 participan en la descarboxilación de la malonil-CoA; Asn-336 forma un puente de hidrógeno con el carbonilo del oxígeno del tioéster y ayuda a estabilizar el enolato generado, mientras que Phe-215 cierra el carboxilato de malonil-CoA (Knaggs, 2001).

Los mecanismos catalíticos inician con la unión de p-cumaril-CoA hacia Cys-164 en una reacción regulada por His-303, luego, la primera molécula de malonil-CoA se agrega para su descarboxilación y es promovida por Asn-336 y Phe-215, para dar lugar al enolato de acetil-CoA. Esta molécula se transforma en un dicétido intermediario cuando la enzima CHS se une nuevamente al tioéster (Knaggs, 2001) el cual se trasfiere hacia el residuo Cys-164 donde presenta dos ciclos de alargamiento. El tetracétido resultante presenta una condensación de Claisen intramolecular, para dar origen a otra estructura fugaz y se libera el Cys-164, enseguida ocurre la aromatización de la estructura fugaz para producir la chalcona naringenina (Knaggs, 2001; Springob *et al.*, 2003).



2) Síntesis de flavonoles

La chalcona naringenina es el sustrato requerido para el siguiente nivel de la ruta biosintética de antocianinas, donde participa la enzima chalcona isomerasa.

Chalcona isomerasa (CHI, EC. 5.5.1.6). La enzima CHI cataliza una reacción intramolecular para cerrar el anillo C de la chalcona naringenina. De esta enzima se conocen dos tipos, el tipo I se encuentra principalmente en las plantas superiores y efectúa exclusivamente la isomerización de la chalcona naringenina para dar lugar a la naringenina. El tipo II cataliza la ciclización estereo-específica de la chalcona naringenina (2',4,4',6'-tetrahidroxichalcona) y de 6'-desoxichalcona (2',4,4'-trihidroxichalcona) produciendo (2S)-naringenina (4',5,7-trihidroxiflavanona) y (2S)-liquiritigenina (4',7-dihidroxiflavanona), respectivamente (Petersen *et al.*, 1999; Springob *et al.*, 2003; Schijlen *et al.*, 2004) tal y como sucede en la mayoría de las leguminosas (Yu y McGonigle, 2005). Ambos tipos de enzimas se diferencian por su estructura (Yu y McGonigle, 2005) conformada de un solo polipéptido (monómera) con un tamaño de 24 a 29 kDa (Petersen *et al.*, 1999; Springob *et al.*, 2003) y no requiere de cofactores (Jende, 1993).

La reacción de síntesis de naringenina implica la desprotonación del grupo hidroxilo del carbono 2' de la chalcona, seguido por un choque intramolecular del oxianión sobre el doble enlace α , β -insaturado, por medio de una adición de Michael. En este mecanismo la forma complementaria y la característica electrostática entre el sitio activo de la CHI y la conformación del sustrato preceden la formación de (2S)-naringenina, así como la polarización de la chalcona, lo que facilita la reacción aditiva de Michael y acelera la tasa de reacción (Jez y Noel, 2002; Springob *et al.*, 2003). El cierre del anillo ocurre con pH fisiológico mayor a 7.8 (Irani *et al.*, 2003).

Los estudios indican que los residuos de la enzima tienen una función importante en la reacción, donde el residuo T-48 interactúa con la chalcona-cetona, a través de enlaces de hidrógeno y participa directamente en la catálisis, mientras que Y-



106 estabiliza la molécula de agua con el oxígeno del grupo ceto; por otra parte, N-113 y T-190 forman puentes de hidrógeno con el grupo 4'-hidroxilo de la chalcona y polarizan el complejo enzima-sustrato (Springob *et al.*, 2003).

La acumulación de chalconas en los tejidos de la planta es escasa ya que rápidamente se isomerizan por la CHI. Algunos individuos mutantes de especies como petunia y tulipán sí acumulan chalconas por lo que sus corolas son amarillas (Ben *et al.*, 2002).

Flavonoide hidroxilasas. A partir de la naringenina la ruta biosintética se ramifica en tres direcciones, cada una encausada hacia la síntesis de un tipo de antocianina. Esta ramificación ocurre por la participación de tres enzimas hidroxilasas: flavonoide 3-hidroxilasa, flavonoide-3'-hidroxilasa y flavonoide 3',5'-hidroxilasa, que usan la naringenina como sustrato.

Flavonoide 3-hidroxilasa (F3H) (EC 1.14.11.9). La enzima F3H es la que permite la producción de hidroxiflavanonas, que son los precursores clave de tres tipos de flavonoides: isoflavonas, flavonas y dihidroflavonoles (Charrier *et al.*, 1998); estos últimos compuestos son los precursores de varios tipos de antocianinas.

La F3H cataliza la estereo-hidroxilación de la (2S)-naringenina y del (2S)-eriodictiol para formar (2R, 3R)-dihidrocaempferol y (2R, 3R)-dihidroquercetina, respectivamente; son compuestos llamados dihidroflavonoles (Petersen *et al.*, 1999; Irani *et al.*, 2003; Springob *et al.*, 2003; Schijlen *et al.*, 2004). En petunia, gerbera y cebada esta enzima selecciona la naringenina como el mejor sustrato (Jende, 1993; Martens y Forkmann, 2000).

La F3H pertenece a la familia de las dioxigenasas, dependientes del 2-oxoglutarato (Petersen *et al.*, 1999; Springob *et al.*, 2003; Schijlen *et al.*, 2004) ya que sus cofactores son 2-oxoglutarato, Fe²⁺, ascorbato (Petersen *et al.*, 1999; Ben *et al.*, 2002) y oxígeno (Jende, 1993). Su tamaño varía de 41 a 42 kDa y es dimérica (Petersen *et al.*, 1999; Springob *et al.*, 2003). Se analizó por primera vez en *Matthiola incana* (Petersen *et al.*, 1999). En su reacción, se ganan dos



electrones de la descarboxilación del 2-oxoglutarato y se transfieren al Fe(II) del sitio activo de la enzima, produciendo ferril, un producto intermediario altamente reactivo, el cual usa al oxígeno molecular para la hidroxilación (Gebhardt *et al.*, 2007). Los residuos His-220, His-278 y Asp-222 conforman los ligandos metálicos, mientras que Arg-288 y Ser-290 participan en el acoplamiento del α -cetoglutarato (Hausinger, 2004).

Flavonoide-3'-hidroxilasa (F3'H, EC 1.14.13.21) y Flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F3'5'H, EC 1.14.13.88). En *Vitis vinifera* estas enzimas funcionan dependiendo del tejido y de la etapa de desarrollo de los frutos (Bogs *et al.*, 2006). Se encuentran adheridas en la superficie del retículo endoplásmico (Irani *et al.*, 2003). Sus mejores sustratos son la naringenina y el dihidrocaempferol, en presencia de oxígeno y NADPH como cofactores (Jende, 1993; Ben *et al.*, 2002; Irani *et al.*, 2003). La F3'H hidroxila el carbono 3' del anillo B de la naringenina y del dihidrocaempferol para producir eriodictiol y dihidroquercetina, respectivamente, los cuales son los precursores de las antocianinas del tipo cianidina (Hoshino *et al.*, 2003). En plántulas de maíz, la función de esta enzima es óptima con pH de 8.5 y temperatura de 30 °C (Larson y Bussard, 1986).

La enzima F3'5'H hidroxila el anillo B del dihidrocaempferol y de la dihidroquercetina en las posiciones 3'-5', formándose la dihidromiricetina, precursora de las antocianinas del tipo delphinidina. El dihidrocaempferol que no es hidroxilado por F3'H y F3'5'H, funciona como precursor de las antocianinas del tipo pelargonidina, a través de la enzima dihidroflavanol 4-reductasa (Ben *et al.*, 2002; Springob *et al.*, 2003; Schijlen *et al.*, 2004).

De esta manera, la hidroxilación de los dihidroflavonoles (compuestos incoloros) en las posiciones 3'-5', es un paso determinante en la producción de antocianinas de color rojo o azul/púrpura; así, algunas variedades de rosa y de clavel que no presentan actividad de F3'5'H son incapaces de desarrollar flores azules o púrpuras (De Vetten *et al.*, 1999).



En este nivel de la ruta de biosíntesis y por la acción de las enzimas flavonoide hidroxilasas, se determinan los tres sustratos que darán origen a los tres tipos de antocianinas en la célula, al intervenir la enzima dihidroflavanol 4-reductasa.

Dihidroflavanol 4-reductasa (DFR, EC 1.1.1.219). Con la DFR los dihidroflavonoles (dihidrocaempferol, dihidroquercetina y dihidromiricetina) presentan una reducción estéreo específica para dar lugar a las leucoantocianidinas: leucopelargonidina, leucocianidina y leucodelphinidina, respectivamente; es decir, cataliza una estéreo-conversión de (2R, 3R)-dihidroflavonoles hacia (2R, 3S, 4S)-leucoantocianidinas (Petersen *et al.*, 1999; Springob *et al.*, 2003; Schijlen *et al.*, 2004). Los compuestos resultantes son inestables y no se acumulan en el tejido de las plantas (Jende, 1993).

En cebada, DFR tiene un pH óptimo de 7.0 y en *Dhalia variabilis* consiste de un sólo polipéptido con tamaño de 41 kDa (Jende, 1993); la reacción que realiza depende del NADPH como cofactor reductor (Ben *et al.*, 2002), puesto que la enzima cataliza la transferencia del hidrógeno en “S” del NADPH hacia el lado “R” del grupo ceto del carbono 4 del anillo C del dihidroflavanol (Springob *et al.*, 2003; Irani *et al.*, 2003).

El conocimiento de la actividad de la DFR se reportó por primera vez en maíz (Petit *et al.*, 2007). En especies como *Petunia*, *Nicotiana* y *Lycopersicon*, la DFR no reduce el dihidrocaempferol, sino que usa en mayor magnitud la dihidromiricetina; en cambio, en maíz y dalia esta enzima acepta como sustratos al dihidrocaempferol y a la dihidroquercetina, que son los precursores de las antocianidinas pelargonidina y cianidina, respectivamente (Ben *et al.*, 2002). En *Vitis vinifera*, la enzima reduce más eficientemente (66 %) a la dihidroquercetina que al dihidrocaemferol (50%). Esta preferencia o especificidad se explica por los puentes de hidrógeno entre el anillo B del sustrato y el sitio de unión de la enzima que está conformado por 26 aminoácidos, que influyen en la afinidad y/o la actividad catalítica del sitio activo. De esta forma, los dos grupos hidroxilo del anillo B de la dihidroquercetina le confieren mayor aceptación como sustrato, en



comparación con el dihidrocaempferol que sólo tiene un hidroxilo. En el mecanismo catalítico, el residuo Y-163 funciona como base catalítica, S-128 estabiliza el sustrato y K-167 forma puentes de hidrógeno con la ribosa nicotinamida, disminuyendo el pKa del grupo hidroxilo del Y-163, para promover la transferencia del protón (H⁺) de la nicotinamida al grupo carbonilo del sustrato (Petit *et al.*, 2007). Por otra parte, la expresión del gen de la enzima DFR en trigo de grano azul es mayor con respecto a la que presenta en el grano “blanco” (Guo *et al.*, 2003).

En este nivel de la ruta biosintética se determina la magnitud de la biosíntesis de cada uno de los tres tipos de leucoantocianidinas incoloras (leucodelphinidina, leucopelargonidina y leucocianidina), dada la preferencia de la enzima DFR por el sustrato que favorece a la leucocianidina.

3) Formación de antocianinas

Una vez formados los tres tipos de leucoantocianidinas, estos compuestos serán el sustrato de la enzima antocianidina sintetasa.

Antocianidina sintetasa (ANS o LDOX, EC 1.14.11.19). Con la enzima ANS las leucoantocianidinas incoloras se convierten en antocianidinas (Ben *et al.*, 2002; Schijlen *et al.*, 2004). La enzima ANS pertenece a la familia de las oxigenasas, dependientes del 2-oxoglutarato y requiere de la presencia de fierro y ascorbato en pH óptimo de 7.0 (Springob *et al.*, 2003). En general, las enzimas ANS y flavonol sintetasa (FLS) son miembros de la subfamilia de oxigenasas α -selectivas, que catalizan la oxidación del carbono 3 del anillo C del sustrato (Turnbull *et al.*, 2004). El gen de la ANS fue primeramente aislado del maíz (Nakajima *et al.*, 2006).

Para la conversión de las leucoantocianidinas en antocianidinas (ion flavilium o aglicón o cromóforos de antocianinas) son necesarias dos etapas. En la primera, la ANS se liga al ion ferroso, el cual actúa como centro catalítico de la reacción, formando un complejo con el oxígeno molecular y con 2-oxoglutarato; esto da lugar a la formación de un complejo enzimático activo oxoferril que funge como



especie oxidativa (Nakajima *et al.*, 2006; Saito y Yamazaki, 2002; Shimada *et al.*, 2005). La descarboxilación oxidativa del 2-oxoglutarato ocurre produciendo succinato, CO₂ y el intermediario ferril, el cual se usa para la oxigenación del sustrato. En la segunda etapa ocurre la oxigenación del carbono 3 de las 2R, 3S, 4S-cis-leucocianidinas. Para ello, el hidrógeno del carbono 3 es extraído por el oxoferril para formar un radical intermediario, seguido de la producción de 3-cetona y de agua, debido a la extracción del hidrógeno del grupo hidroxilo presente en el carbono 3. Con esto ocurre un cambio conformacional del succinato asociado con fierro que acepta el H⁺ derivado del agua; luego, el anión hidroxilo generado es ensamblado en el carbono 3. El protón retenido temporalmente en el succinato regresa para formar el 3,3-gem-diol, una molécula que establece un equilibrio con la 3-cetona producida. Posteriormente ocurre la deshidratación del 3,3-gem-diol en sus carbonos 2 y 3 para formar el 4S-flav-2-en-3,4-diol, que es la pseudobase para conformar las antocianidinas (Nakajima *et al.*, 2006).

Se conocen 19 tipos de antocianidinas pero sólo tres son las más comunes en plantas: pelargonidina, cianidina y delphinidina. Su color depende del número de grupos hidroxilo (OH) en el anillo B de su estructura. Con mayor número de estos grupos surge el color azul, mientras que la presencia de grupos metilo produce un color rojizo (Tanaka *et al.*, 2008).

Flavonoide 3-O-glucosiltransferasa (UF3GT, FGT o 3GT, EC 2.4.1.115).

Puesto que las antocianidinas son inestables en condiciones de pH celular de 3.0 a 7.0, por llevar un grupo hidroxilo libre, es necesaria su estabilización (Yu *et al.*, 2006). La enzima FGT es la responsable de agregar una glucosa derivada de uridina difosfo glucosa (UDP-glu) hacia el grupo hidroxilo del carbono 3 de las antocianidinas, produciéndose así las moléculas de las antocianinas (Ben *et al.*, 2002; Schijlen *et al.*, 2004) (Figura 2.2).

De acuerdo con Nakajima *et al.* (2006), la glucosilación de la pseudobase flav-2-en-3,4-diol, produce un compuesto intermediario estable en el citoplasma; en caso contrario, la pseudobase se oxida en los carbonos 3 y 4, dando lugar a la



formación de quercetina (un flavonol). En este sentido, la glucosilación es un evento evolutivo que permitió estabilizar a las moléculas de antocianidina y acumularse como pigmentos hidrosolubles en la vacuola (Schijlen *et al.*, 2004); inclusive, la glucosilación 3-O es indispensable para una segunda glucosilación, para la acilación, metilación o la prenilación (Springob *et al.*, 2003). La glucosilación se relaciona con el aumento del color rojo de las antocianinas y la incorporación de ácidos aromáticos causa un cambio hacia el color azul, mientras que la unión de ácidos alifáticos no cambia el color de las antocianinas pero sí incrementa su estabilidad y solubilidad (Tanaka *et al.*, 2008).

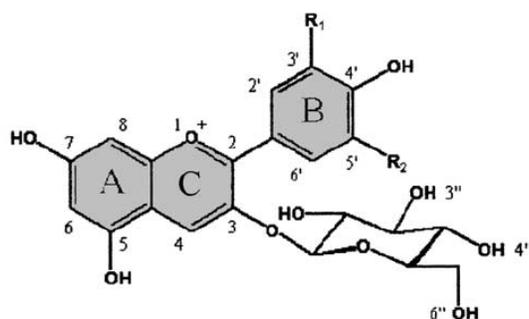


Figura 2.2. Estructura química de una molécula de antocianina. Se observa la adición de la molécula de glucosa en el carbono 3 de la estructura.

Se demostró la actividad de la FGT en maíz y el gen que la codifica es el *Bronze-2* (*BZ-2*) (Petersen *et al.*, 1999). Generalmente se encuentra activa en el citoplasma (Yu *et al.*, 2006) y funciona con un pH de 8.0; sin embargo, no presenta igual actividad sobre todas las antocianidinas; es decir, la glucosilación mantiene un orden preferencial: cianidina > delphinidina > peonidina > pelargonidina > malvidina (Ford *et al.*, 1998), como en la manzana (Lister *et al.*, 1997), pero en fresa, se conoce que el orden de preferencia por el sustrato es el siguiente: cianidina > pelargonidina > peonidina > delphinidina > petunidina > malvidina (Griesser *et al.*, 2008).



La enzima FGT de *Vitis vinifera* se ha estudiado ampliamente *in vitro*, usando al caempferol como molécula receptora y a la UDP-glucosa como la donadora del carbohidrato. Con esto, Offen *et al.* (2006) encontraron que los residuos Asp-374, Gln-375 y Thr-141 interactúan directamente con los grupos hidroxilo de la molécula de glucosa del donador. El reconocimiento de los oxígenos 2 y 3 de la glucosa se hace por medio del residuo Gln-375, al interactuar con el oxígeno de los hidroxilos en las posiciones 3 y 4 del caempferol. Posteriormente, el oxígeno del carbono 3 de caempferol se desprotoniza por el residuo His-20, el cual se estabiliza de inmediato con un residuo de aspartato (Asp-119).

Estudios de esta enzima en el tejido foliar de *Solanum soganandinum* han demostrado que su actividad se estimula positivamente cuando las plantas se someten a radiación UV y visible, a frío y a salinidad o ácido abscísico, indicando que la estabilidad química de los flavonoides a través de su glucosilación es una respuesta protectora a condiciones de estrés (Korobczak *et al.*, 2005).

En resumen, la adición de una molécula de glucosa a la estructura de las antocianidinas es indispensable para formar moléculas de antocianinas; sin embargo, existe un patrón de preferencia del sustrato por parte de la enzima FGT. Entonces, no todas las moléculas de antocianidinas son glucosiladas, siendo propensas a la oxidación.

La ruta general de la biosíntesis de las antocianinas en el maíz se muestra en la Figura 2.3. Sin embargo, una vez sintetizadas, éstas se acumulan en la vacuola, para lo cual participan enzimas que configuran la estructura de las antocianinas que facilitan su ingreso al organelo.

4) Transformación estructural de las antocianinas

La variación estructural encontrada en las antocianinas se debe: a) al número y posición de los grupos hidroxilo y metoxilo en la estructura química de las antocianidinas, b) al número y posición de los carbohidratos presentes como residuos ligados a la estructura, y c) a la presencia de ácidos orgánicos (acilación) en la molécula (Kowalczyk *et al.*, 2003).



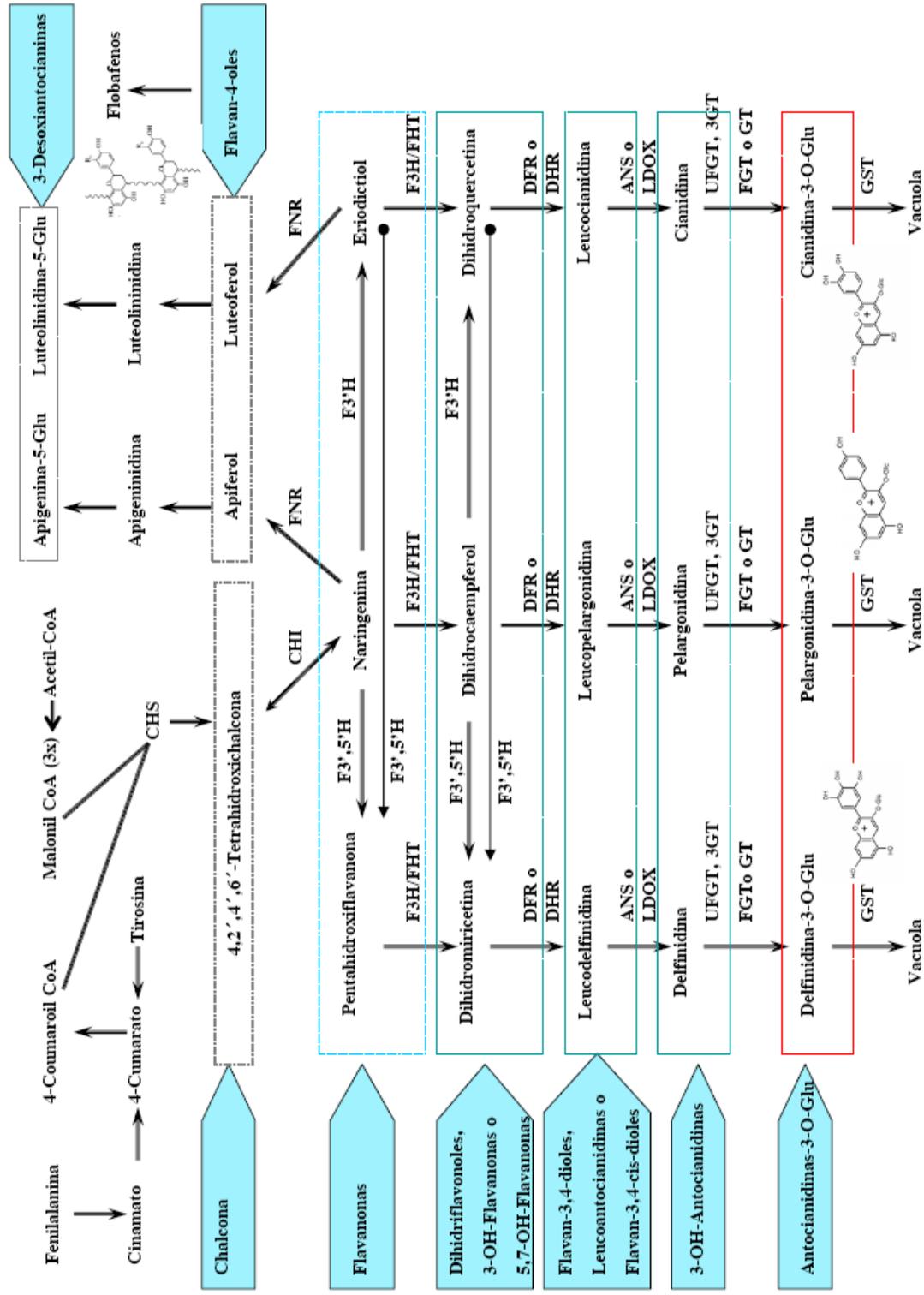
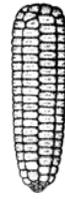


Figura 2.3. Ruta de biosíntesis de las antocianinas monoglucosiladas y de flobafenos en el citoplasma en maíz.



Paradójicamente, las antocianinas son incoloras en el intervalo de pH fisiológico de la vacuola (3.0 a 7.0) y sólo expresan color en pH menor de 3.0 o mayor a 7.0. La asociación de las antocianinas entre sí o con otros compuestos incoloros, típicamente flavonas y flavonoles, o iones metálicos como Al^{3+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , denominados copigmentos, son los que originan el color de las antocianinas dentro de la vacuola (Teeri y Elomaa, 2003; Tanaka *et al.*, 2008).

Flavonoide 5/7-O-glucosil transferasa (F5GT y F7GT). Además de la glucosilación del carbono 3 de las antocianidinas, ésta también ocurre en los carbonos 5, 7 ó 3', lo cual permite ampliar la variación de colores en los órganos pigmentados de las plantas (Yu *et al.*, 2006). En *Petunia hybrida*, *Verbena hybrida* y *Arabidopsis thaliana*, existe la enzima 5-O-glucosiltransferasa (F5GT) que permite formar la antocianidina-3,5-O-diglucósido, la cual es más estable químicamente (Saito y Yamazaki, 2002), en comparación con las antocianinas de una sola glucosa.

Según Kukula *et al.* (2004) después de la adición de una molécula de glucosa en el carbono 3, es común la adición de otra segunda glucosa en el carbono 5 del anillo B de las antocianinas. Las propiedades bioquímicas de la enzima F5GT son similares entre especies y tiene un tamaño promedio de 52 kDa, un pH óptimo de 8.0 a 8.5 y su actividad específica depende del tipo de antocianina, de manera que la preferencia del sustrato presenta un orden jerárquico: peonidina-3-glu > malvidina-3-glu > cianidina-3-glu > pelargonidina-3-glu > petunidina-3-glu > delphinidina-3-glu.

Antocianina aciltransferasa (AAT, EC 2.3.1.X). La enzima AAT transfiere un grupo acilo aromático o alifático hacia los grupos hidroxilos de la glucosa que conforma las antocianinas, estableciendo un enlace éster, usando como donadores: acetil-CoA, cafeil-CoA, 4-cumaril-CoA, malonil-CoA, o Succinil-CoA. Se localizan en el citoplasma y algunas en la vacuola (Davies y Schwinn, 2006). Es así como se forman las antocianinas aciladas (Figura 2.4). Con la acilación, las antocianinas presentan mayor estabilidad estructural, incrementan su hidrosolubilidad,



adquieren mayor protección contra las enzimas glucosidasas y permiten su transporte hacia las vacuolas (Saito y Yamazaki, 2002), también se amplía su variación estructural, dando lugar a más de 300 diferentes antocianinas (Teeri y Elomaa, 2003).

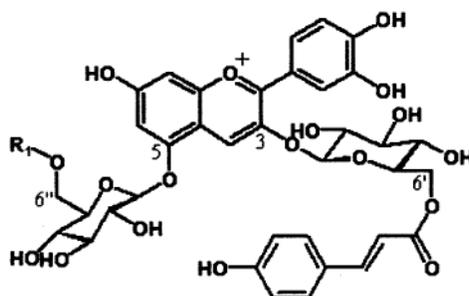


Figura 2.4. Estructura general de una molécula de antocianina acilada. Se observan dos moléculas de glucosa en los carbonos 3 y 5 más un grupo acilo unido a la glucosa del carbono 3.

Las enzimas aciltransferasas del tipo alifáticas usan como donadores a malonil-CoA, acetil-CoA, metilmalonil-CoA y succinil-CoA; las aciltransferasas del tipo aromáticas toman como donadores a p-cumaril-CoA y cafeil-CoA. En general, los donadores más aceptados por las aciltransferasas son el malonil-CoA y cafeil-CoA y no tienen preferencia por alguna antocianina, siempre y cuando todas tengan una molécula de glucosa en su estructura (antocianinas monoglucosiladas) ya que algunas aciltransferasas prefieren las antocianinas diglucosiladas (Nakayama *et al.*, 2003). En lo particular, las aciltransferasas de *Perilla frutescens* funcionan adecuadamente usando como sustrato a la cianidina-3-O-glucósido. Además, este tipo de antocianinas presentan mayor actividad biológica, según los estudios biomédicos y nutricionales (Nakayama *et al.*, 2003).

Las flores de *Ipomoea tricolor* contienen antocianinas poliaciladas, indicando que se forman con la participación de una variedad de enzimas aciltransferasas (Nakayama *et al.*, 2003).



Las enzimas AAT son monoméricas y están conformadas de 446 a 469 aminoácidos, con un tamaño aproximado de 50 kDa y un punto isoeléctrico de 4.6. El pH óptimo para su actividad catalítica oscila entre 7.0 y 8.0. Algunas aciltransferasas tienen secuencias de aminoácidos similares (conservados) en los motivos (unidades supersecundarias) 1 y 3, por lo que se agrupan en una familia denominada versátil o superfamilia BADH o VPAT (Nakayama *et al.*, 2003). Inclusive, estas enzimas presentan especificidad por el sustrato malonil-CoA (Unno *et al.*, 2007).

La enzima alifática conocida como Dm3MaT3 se conforma de 17 bandas tipo beta y 17 hélices tipo alfa. El sitio de unión con el sustrato se compone de tres hélices y de dos láminas dirigidas hacia un canal donde se disponen los motivos. El primer motivo está representado por His-170 (base) el cual establece contacto mediante un enlace de hidrógeno con el carbonilo tioéster del sustrato malonil-CoA. De inmediato intervienen los otros dos residuos, que son Arg-178 y Gly-386, a través de enlaces de hidrógeno con el átomo de oxígeno del carboxilo del grupo malonilo. Otra serie de aminoácidos son los que interactúan con la CoA por medio de enlaces de hidrógeno, mientras transcurre la reacción. La especificidad de las enzimas a este sustrato se explica por el arreglo espacial de los motivos de la enzima.

Después de que ocurre la unión del sustrato con los tres motivos, en un canal adyacente compuesto por varios aminoácidos (sitio activo), se introduce la antocianina receptora del grupo acilo. La catálisis ocurre con la intervención de His-170 que extrae un protón del grupo hidroxilo de la antocianina y se activa la transferencia del grupo acilo (Unno *et al.*, 2007). En *Salvia splendens* esta catálisis la efectúa la aciltransferasa SsMaT1, una vez que se forma el complejo ternario malonil-CoA-enzima-antocianina. Para esto, las bases (His-167 y Asp-390) activan el grupo nucleofílico de la molécula de antocianina, mediante una desprotonación del grupo hidroxilo en el carbono 6^o de la glucosa, facilitando un



ataque nucleofílico al carbonilo de la acilo-CoA. Después de la reacción se libera CoA-SH (Nakayama *et al.*, 2003).

Antocianina O-metiltransferasa (OMT, EC 2.1.1.6.X). Las enzimas OMT usan como donador de un grupo metilo (CH_3) a la S-adenosil-L-metionina (SAM), para transferirlo a los grupos hidroxilo de las moléculas receptoras, generando S-adenosil-L-homocisteína y metil éter derivados. Los mecanismos químicos en las reacciones de transferencia de los grupos metilo son similares entre las metiltransferasas; no obstante, difieren en su preferencia por el sustrato, debido a la estereoquímica y al patrón de sustitución con grupos hidroxilo de las moléculas receptoras. De esta manera, existen metiltransferasas específicas para chalconas, flavanonas, flavonas, isoflavonas, flavonoles y antocianinas. Las enzimas específicas de flavonoides pertenecen al grupo B, y al subgrupo 3, aquéllas que actúan sobre las antocianinas y flavanas (Ibrahim *et al.*, 1998).

El mecanismo de acción de las enzimas chalcona-metiltransferasas incluye una desprotonación del grupo hidroxilo 2' del anillo A de la chalcona, mediante el átomo de nitrógeno de la base (His-278) seguido de un ataque del anión hidroxilo al grupo metilo de la SAM. Debido a que el azufre de la SAM se carga positivamente, la transmetilación se facilita por medio de la desprotonación (Zubieta *et al.*, 2001).

En *Petunia*, mediante la metilación en los carbonos 3' y/o 5' de la cianidina y delphinidina 3-O-(4 cumaril)-rutinósido-5-O-glucósido, se producen las antocianinas modificadas peonidina y malvidina, respectivamente (Yu *et al.*, 2006). Esta clase de enzimas no requieren Mg^{2+} como cofactor y tienen un peso molecular de 38 a 43 kDa (Davies y Schwinn, 2006).

Dímeros de las antocianinas. Las antocianinas también se condensan con otras moléculas. Se han encontrado estructuras dimeras como epicatequina-cianidina-3,5-diglucósido en una raza de maíz de grano púrpura, originaria de Perú; en este caso, la epicatequina pertenece al grupo de los flavan-3-oles (González *et al.*, 2006). Estudios recientes han encontrado los dímeros entre la



catequina con las antocianinas: cianidina-3-glucósido, cianidina-3-malonil-glucósido, cianidina-3-malonil-glucósido-5-glucósido, cianidina-3,5-diglucósido, peonidina-3-glucósido y pelargonidina-3-glucósido, en las razas Arrocillo, Purépecha y Perú (quizás Cuzco morado) (González *et al.*, 2008).

5) Transporte de las antocianinas hacia las vacuolas

Glutación-S-trasferasa (GST, EC 2.5.1.18). En los genotipos mutantes de maíz para esta enzima, las antocianinas producidas se acumulan en el citoplasma, resultando un color café del grano, debido a la oxidación del pigmento (Ben *et al.*, 2002); en cambio, en los genotipos normales, las antocianinas producidas se acumulan en las vacuolas (Koes *et al.*, 2005). En su transporte está involucrada una proteína vacuolar asociada con la resistencia a drogas (ZmMRP3) que tiene preferencia por sustratos conjugados con el tripéptido glutatión (glutamil-cisteinil-glicina-S-trasferasa); conjugación que cataliza la enzima GST codificada por el gen *bronze-2 (Bz2)* (Yasaki, 2006; Poustka *et al.*, 2007). Dixon *et al.* (2002) informan de la existencia de isoenzimas de GST cuya expresión difiere entre los tejidos del maíz (polen, escutelo, hojas, raíces).

En *Petunia*, la enzima GST conjuga el glutatión (tripéptido glutamil-cisteinil-glicina) con la cianidina 3-glucósido, haciendo posible su transporte al interior vacuolar a través de la bomba GS-X (tipo ABC) localizada en el tonoplasto (Grotewold, 2004).

Otra vía de transporte no enzimática, encontrada en pétalos de *Lisianthus* y en células cultivadas de maíz, implica la biogénesis de vacuolas y de vesículas provacuolares que almacenan las antocianinas en el sitio de síntesis de los pigmentos en el citoplasma; para esto ocurre el acercamiento de las vacuolas con el retículo endoplásmico, de tal manera que los compartimentos provacuolares descargan las antocianinas en el interior de la vacuola (Kitamura, 2006).

Una vez en el interior de la vacuola, las antocianinas se acumulan en inclusiones vacuolares (Irani y Grotewold, 2005; Zhang *et al.*, 2006). Kitamura (2006) sugiere que las antocianinas ya sintetizadas son absorbidas por el retículo endoplásmico



mediante un transportador (Ruta II) y después son expulsadas en vesículas derivadas del retículo para su transporte hacia la vacuola (Figura 2.5). Esta ruta también la estudiaron Poustka *et al.* (2007) en *Arabidopsis*, confirmando que las antocianinas sintetizadas en la superficie del retículo endoplásmico son secuestradas en vesículas derivadas de este organelo, pero se desconoce cómo se acumulan en estas vesículas y cómo se dirigen hacia las vacuolas. Una vez dentro, las antocianinas se almacenan en estructuras subvacuolares. Esta ruta es independiente de la actividad de la enzima GST y de los transportadores dependientes de ATP.

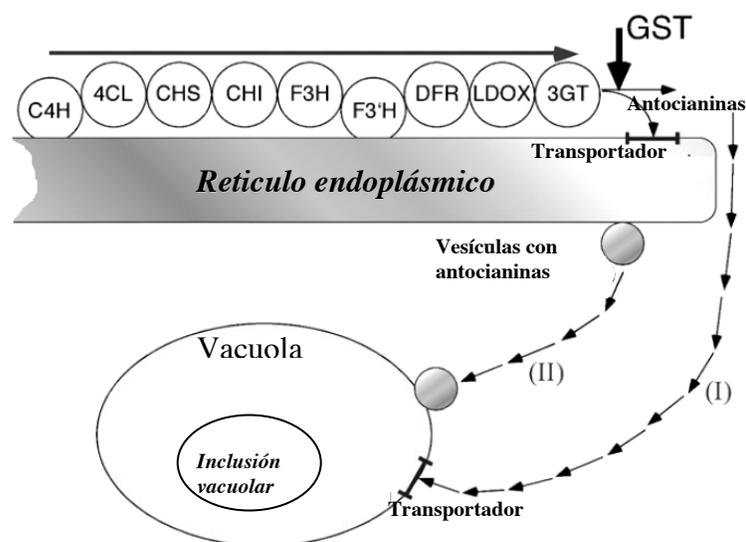


Figura 2.5. Formas de transporte y acumulación de antocianinas en la vacuola: mediante proteínas transportadoras presentes en la vacuola (I) y por vesículas membranosas (II). Adaptado de Kitamura (2006).

SÍNTESIS DE FLOBAFENOS

En maíz, la enzima dihidroflavonol reductasa (DFR) participa en la biosíntesis de antocianinas y es codificada por el gene *A1*; sin embargo, cuando la enzima no es funcional, la ruta biosintética se desvía hacia la síntesis de otro pigmento denominado flobafeno (Pooma *et al.*, 2002). Este pigmento se define como 3-desoxiflavonoide y está formado de monómeros de flavan-4-ol (Schijlen *et al.*,



2004). Las 3-desoxiantocianinas (apigenidina y luteolinidina) y los flobafenos han sido estudiados en los granos de maíz y de sorgo (Sekhon *et al.*, 2006).

En la ruta de biosíntesis de los flobafenos participan las enzimas chalcona sintetasa, chalcona isomerasa, DFR y flavanona 4-reductasa (FNR) (Chopra *et al.*, 2006); las tres primeras son reguladas por un factor de transcripción (proteína) codificado por el locus *Pericarp color 1* y *pericarp color 2* (*P1* y *P2*) (Sekhon *et al.*, 2006), cuya función es la misma que se reporta en la ruta de biosíntesis de antocianinas. La enzima adicional en la ruta de los flobafenos es la flavanona-4-reductasa.

Flavanona-4-reductasa (FNR). La enzima FNR en maíz puede, por un lado, convertir flavanonas en flavan-4-oles, precursores de la 3-desoxiantocianina y flobafenos (Irani *et al.*, 2003; Halbwirth *et al.*, 2003). Esta enzima es una variante de la DFR y su actividad se incrementa cuando la enzima F3H presenta baja actividad y cuando la ANS no se expresa (Davies y Schwinn, 2006).

Los granos de maíz de color rojo ladrillo contienen flobafenos, pigmentos de color café rojizo acumulados en el pericarpio (Chopra *et al.*, 2006), pero no antocianinas; al respecto, Pourcel *et al.* (2007) postulan que su formación puede ocurrir por la acción de una enzima similar a la laccasa (EC 1.10.3.2) polimerizando las unidades de flavan-4-ol. Particularmente, en maíz se han identificado cuatro genes de laccasas, una de éstas (ZmLac3, enzima ácida) supuestamente está participando en la polimerización de flavonoides y de lignina (Caparrós *et al.*, 2006).

La acumulación de los polímeros de flavan-4-oles se presenta en los estilogmas y en el pericarpio del grano de maíz y está relacionada con la resistencia a patógenos como *Fusarium verticillioides* y *F. graminearum* (Sekhon *et al.*, 2006).

TIPOS DE ANTOCIANINAS ACUMULADAS EN EL GRANO DE MAÍZ

Mediante técnicas de química analítica, como la cromatografía de líquidos y la espectrometría de masas, ha sido posible identificar los tipos de antocianinas que



se acumulan en las estructuras del grano de algunas razas, variedades o genotipos de maíz. Esta información se presenta en los Cuadros 2.1 y 2.2.

Cuadro 2.1. Tipos de antocianinas presentes en el grano de maíz de colores.

Antocianinas	Púrpura	Azul	Rojo
<i>Glucosiladas</i>			
Cianidina-3-glucósido	•	•	•
Pelargonidina-3-glucósido	•	•	•
Peonidina-3-glucósido	•	•	•
Malvidina-3-glucósido		•	•
Cianidina-3-rutinósido		•	
<i>Aciladas</i>			
Cianidina-3-(6"-malonil-glucósido)	•	•	•
Cianidina-malonil-succinil-glucósido	•	•	•
Cianidina-succinil-glucósido	•	•	•
Cianidina-disuccinil-glucósido	•	•	•
Cianidina-3-(3",6" dimalonil-glucósido)	•		
Pelargonidina-3-(6"-malonil-glucósido)	•	•	•
Pelargonidina-succinil-glucósido	•	•	•
Pelargonidina-disuccinil-glucósido	•		•
Pelargonidina-malonil-succinil-glucósido	•		•
Peonidina-3-(6"-malonil-glucósido)	•		
Peonidina-succinil-glucósido	•	•	•
Peonidina-disuccinil-glucósido	•		•
<i>Etiladas</i>			
Cianidina-3-(6"-etilmalonil-glucósido)	•		
Pelargonidina-3-(6"-etilmalonil-glucósido)	•		
Peonidina-3-(6"-etilmalonil-glucósido)	•		

Fuente: Jing *et al.*, 2007; Pedreschi y Cisneros, 2006; Abdel-Aal *et al.*, 2006; Salinas *et al.*, 2005; Aoki *et al.*, 2002; De Pascual *et al.*, 2002; Cortés *et al.*, 2006; Salinas *et al.*, 2003.



Cuadro 2.2. Tipos de antocianinas y contenido relativo en el pericarpio y en la capa de aleurona del grano de algunas poblaciones criollas de maíz de México y del Perú.

Estructura	Raza	Antocianinas	Contenido (%)	
Pericarpio	Arrocillo	Cianidina-3-glucósido	37	
		Cianidina-3-malonil-glucósido	21	
		Otras a base de Cianidina	21	
		Peonidina-3-glucósido	12	
		Peonidina-3-malonil-glucósido	3	
		Otras con base en Peonidina	7	
	Peruano	Cianidina-3-glucósido	27	
		Cianidina-3-malonil-glucósido	21	
		Otras a base de Cianidina	15	
		Peonidina-3-glucósido	12	
		Peonidina-3-malonil-glucósido	9	
		Otras con base en Peonidina	8	
	Aleurona	Arrocillo	Cianidina-3-malonil-glucósido	28
			Otras con base en Cianidina	25
Purépecha		Cianidina-3-glucósido	6	
		Otras a base de Cianidina	7	
		Pelargonidina-3-glucósido	10	
		Pelargonidina-3-malonil-glucósido	27	
		Pelargonidina-3-dimalonil-glucósido	14	
		Otras con base en Pelargonidina	24	

Adaptado de González *et al.* (2008).



DISCUSIÓN

Los colores de grano desde rojo hasta negro-púrpura (en diferentes tonalidades) se deben a la presencia de antocianinas, mientras que el café rojizo del pericarpio se atribuye a la acumulación de flobafenos. En el grano, las antocianinas se pueden localizar en el eje embrionario, en la capa de aleurona y en el pericarpio. Para que ocurra la biosíntesis de estos pigmentos son necesarias la acetil-CoA y la fenilalanina, que son las moléculas con las que se inicia la ruta biosintética. Todas las antocianinas del maíz en su estructura química presentan de una a dos moléculas de glucosa, con base en ello, se conocen dos tipos de antocianinas: monoglucosiladas y diglucosiladas. Esto indica que la serie de enzimas, desde la CHS hasta la GST están participando. Por otro lado, la presencia de glucosa indica que la ruta de biosíntesis demanda fotoasimilados; no obstante, otro carbohidrato que se ha detectado en la estructura química de las antocianinas es la rutinosa.

Además de las antocianinas glucosiladas, una parte del total de las antocianinas acumuladas presentan grupos malonilo y/o succinilo, lo que dan lugar a las antocianinas aciladas. Esto señala que las enzimas aciltransferasas no actúan sobre todo el sustrato, por lo que quedan algunas antocianinas sin mayor transformación estructural.

Las antocianinas más abundantes en el grano de maíz son las basadas en cianidina, lo que indica que ésta es una rama de la ruta preferida por las enzimas que participan en la biosíntesis que se lleva a cabo en la superficie del retículo endoplásmico y en su transporte hacia las vacuolas, la que ocupa dos rutas, una de ellas requiere la participación de la enzima GST y una proteína transportadora ubicada en la membrana de la vacuola, la otra ruta, parte del retículo endoplásmico y las antocianinas se transportan empaquetadas en vesículas para descargarlas en la vacuola. Dentro de la vacuola las antocianinas pueden acumularse en inclusiones vacuolares o vesículas subvacuolares.



Algunos maíces de granos pigmentados presentan antocianinas basadas en peonidina y malvidina; al respecto se señala que hay participación de las enzimas metiltransferasas, pero no se usa todo el sustrato, pues de lo contrario, no se detectaría la presencia de sus precursores, la cianidina-3-O-glucósido y la delphinidina-3-O-glucósido.

En los granos de color púrpura se han reportado antocianinas con grupos etilo. Sin embargo, en la literatura no se encuentra el proceso de su formación. Similar es el caso de los flobafenos donde el proceso de su formación y transporte en el pericarpio no es claro.

En suma, el mejoramiento genético del maíz debe considerar que existe una amplia variación en la estructura química de las antocianinas, todas ellas con propiedades particulares; su presencia en el grano es el resultado de la selección humana. Entonces, es factible mejorar su acumulación, considerando como tejidos de almacenamiento de éstas en el grano al pericarpio, la capa de aleurona y al eje embrionario; por ello, es necesario cuantificar el contenido de antocianinas con base en la biomasa de cada estructura del grano, e inclusive es posible identificar mediante una técnica sencilla como la cromatografía en capa fina los tipos de antocianinas presentes durante el periodo de llenado de grano y determinar los componentes genéticos y ambientales que influyen en la biosíntesis del pigmento.

En México existe amplia variabilidad genética del maíz, por lo cual es posible estudiar el potencial de las poblaciones criollas o nativas y desarrollar una valoración de su capacidad de acumulación de antocianinas. Esto debe incluir la evaluación de métodos de extracción del pigmento para uso nutracéutico, determinar la cinética de la biosíntesis y la degradación del pigmento, enfatizar en el desarrollo de las prácticas agronómicas que optimicen su acumulación, tanto en el grano como en los órganos vegetativos, determinar los criterios anatómicos para valorar el potencial de almacenamiento en el grano y optimizar un método



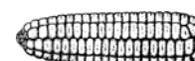
para valorar la calidad del pigmento producido por planta y por unidad de superficie.

LITERATURA CITADA

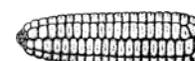
- Abdel-Aal E-S M, J C Young and I Rabalski (2006)** Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 4696-4704.
- Aoki H, N Kuze and Y Kato (2002)** Anthocyanins isolated from purple corn (*Zea mays* L.). *Foods and Food Ingredients Journal of Japan*. 199:41-45.
- Ando T, M Takahashi, T Nakajima, Y Toya, H Watanabe, H Kokubun and F Tatsuzawa (2004)** Delphinidin accumulation is associated with abnormal flower development in petunias. *Phytochemistry* 65: 2219–2227.
- Becraft P W (2007)** Aleurone Cell Development. In O A Olsen (Ed.) *Endosperm: development and molecular biology*. Springer. pp. 45-56.
- Ben M H, A Zuker, D Weiss and A Vainstein (2002)** Molecular control of floral pigmentation: anthocyanins. In: A. Vanstein (ed). *Breeding for Ornamentals: Classical and Molecular Approaches*. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. pp. 253-270.
- Bogs J, A Ebadi, D McDavid and S P Robinson (2006)** Identification of the flavonoid hydroxylases from grapevine and their regulation during fruit development. *Plant Physiology* 140: 279–291.
- Brown C R, R Wrolstad, R Durst, C P Yang and B Clevidence (2003)** Breeding studies in potatoes containing high concentrations of anthocyanins. *American Journal of Potato Research* 80 (4): 241-246.
- Caldwell M M, C L Ballaré, J F Bornman, S D Flint, L O Björn, A H Teramura, G Kulandaivelu and M Tevini (2003)** Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation and interactions with other climatic change factors. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2:29–38.
- Caparrós R D, S Fornalé, L Civardi, P Puigdoménech and J Rigau (2006)** Isolation and characterization of a family of laccases in maize. *Plant Science* 171: 217–225.
- Casati P, X Zhang, A L Burlingame and V Walbot (2005)** Analysis of leaf proteome after UV-B irradiation in maize lines differing in sensitivity. *Molecular & Cellular Proteomics* 4 (11): 1673-1685.



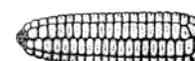
- Charrier B, H Trinh, S Poirier, A Kondorosi and P Ratet (1998)** Flavanone 3-hydroxylase (F3H) expression and flavonoid localization in nodules of three legume plants reveal distinct tissue specificities. *Molecular Plant Microbe Interactions* 11(9): 924–932.
- Chopra S, A Hoshino, J Boddu and S Iida (2006)** Flavonoid pigments as tool in molecular genetics. In: E Grotewold (ed) *The Science of Flavonoides*. Springer, USA. pp. 147-172.
- Cortés G A, M Y Salinas, E San Martín M, F Martínez B (2006)** Stability of anthocyanins of blue maize (*Zea mays* L.) after nixtamalization of separated pericarp germ tip cap and endosperm fractions. *Journal of Cereal Science* 43 57–62.
- Davies K M and K E Schwinn (2006)** Molecular biology and biotechnology of flavonoid biosynthesis. In Ø M. Andersen, K R Markham (eds) *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. CRC, Taylor & Francis, USA. pp. 144-201.
- De La Parra C, S O Serna S and R H Liu (2007)** Effect of processing on the phytochemical profiles and antioxidant activity of corn for production of masa, tortillas, and tortilla chips. *J. Agric. Food Chem.* 55:4177-4183.
- De Pascual T S, C Santos B and J C Rivas G (2002)** LC-MS analysis of anthocyanins from purple corn cob. *J. Sci. Food Agric* 82:1003-1006.
- De Vetten N, J T Horst, H P Van Schaik, A De Boer, J Mol and R Koes (1999)** A cytochrome b5 is required for full activity of flavonoid 3',5'-hydroxylase, a cytochrome P450 involved in the formation of blue flower colors. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 96:778–783.
- Della Vedova C B, R Lorbiecke, H Kirsch, M B Schulte, K Scheets, L M. Borchert, B E Scheffler, U Wienand, K C Cone and J A Birchler (2005)** The dominant inhibitory chalcone synthase allele *C2-Idf* (Inhibitor diffuse) from *Zea mays* (L.) acts via an endogenous RNA silencing mechanism. *Genetics* 170: 1989–2002.
- Dixon D P, A Laphorn and R Edwards (2002)** Plant glutathione transferases. *Genome Biology* 3(3): 1–10.
- Dixon R A, L Achnine, P Kota, C J Liu, M S S Reddy and L Wang (2002)** The phenylpropanoid pathway and plant defense: a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology* 3 (5): 371–390.



- Dong X, E L Braun and E Grotewold (2001)** Functional conservation of plant secondary metabolic enzymes revealed by complementation of arabidopsis flavonoid mutants with maize genes. *Plant Physiology* 127: 46–57.
- Dykes L and L W Rooney (2007)** Phenolic compounds in cereal grains and their health benefits. *Cereal Foods World* 52 (3):105-111.
- Espín J C, M T García C, F A Tomás B (2007)** Nutraceuticals: facts and fiction. *Phytochemistry*:10.1016/j.phytochem.2007.09.014
- Fatland B L, B J Nikolau and E S Wurtelea (2005)** Reverse genetic characterization of cytosolic acetyl-CoA generation by ATP-citrate lyase in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 17: 182–203.
- Ford C M, P K Boss and P Bordier H (1998)** Cloning and characterization of *Vitis vinifera* UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase, a homologue of the enzyme encoded by the maize *bronze-1* locus that may primarily serve to glucosylate anthocyanidins *in vivo*. *The Journal of Biological Chemistry* 273 (15); 9224–9233.
- Ford R H (2000)** Inheritance of kernel color in corn: explanations and investigations. *The American Biology Teacher* 62(3):181-188.
- Gebhardt Y H, S Witte, H Steuber, U Matern and S Martens (2007)** Evolution of flavone synthase I from parsley flavanone 3 -hydroxylase by site directed mutagenesis. *Plant Physiology* 144: 1442–1454.
- González M S, J J Pérez A, Y Salinas M, N Mateus, A M S Silva, V Freitas and C Santos B (2008)** Flavanol-anthocyanin pigments in corn. NMR characterization and presence in different purple corn varieties. *Journal of Food Composition and Analysis* (doi:10.1016/j.jfca.2008.05.009).
- González P A M, F Lopes S, P Martín L, G Macz P, S González M, C Alcalde E, J J Pérez A, M T Escribano B, J C Rivas G and C Santos B (2006)** Flavanol–anthocyanin condensed pigments in plant extracts. *Food Chemistry* 94: 428–436.
- Griesser M, T Hoffmann, M L Bellido, C Rosati, B Fink, R Kurtzer, A Aharoni, J Muñoz B and W Schwab (2008)** Redirection of flavonoid biosynthesis through the down-regulation of an anthocyanidin glucosyltransferase in ripening strawberry. *Fruit Plant Physiology* 146:1528–1539.
- Grotewold E (2004)** The challenges of moving chemicals within and out of cells: insights into the transport of plant natural products. *Planta* 219: 906–909.



- Guo H Y, Z Xue Q, L Bin, L Jian Z, Z Qi, T Yi P and L Zhen S (2003)** Molecular cloning and characterization of a DFR from developing seeds of blue-grained wheat in anthocyanin biosynthetic pathway. *Acta Botánica Sinica* 45 (11): 1329-1338.
- Hatayama M, E Ono, K Yonekura-S, Y Tanaka, T Nishino and T Nakayama (2006)** Biochemical characterization and mutational studies of a chalcone synthase from yellow snapdragon (*Antirrhinum majus*) flowers. *Plant Biotechnology* 23: 373–378.
- Hausinger R P (2004)** Fe(II)-ketoglutarate-dependent hydroxylases and related enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 39:21–68.
- Havir E A, P D Reid and H V Marsh (1971)** L-phenylalanine ammonia-lyase (maize): evidence for a common catalytic site for L-phenylalanine and L-tyrosine. *Plant Physiology* 48:130-136.
- Hayashi O and K Satoh (2006)** Determination of acetyl-CoA and malonyl-CoA in germinating rice seeds using LC-MS/MS technique. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 70 (11): 2676-2681.
- Hernandez X E (1985)** Maize and man in the greater Southwest. *Economic Botany* 39(4): 416-430.
- Hoshino A, Y Morita, J D Choi, N Saito, K Toki, Y Tanaka and S Iida (2003)** Spontaneous mutations of the flavonoid 3-hydroxylase gene conferring reddish flowers in the three morning glory species. *Plant Cell Physiology* 44(10): 990–1001.
- Ibrahim R K, A Bruneau and B Bantignies (1998)** Plant O-methyltransferases: molecular analysis, common signature and classification. *Plant Molecular Biology* 36: 1–10.
- Irani N G and E Grotewold (2005)** Light-induced morphological alteration in anthocyanin-accumulating vacuoles of maize cells. *BMC Plant Biology* 5:7-21
- Irani N G, J M Hernández and E Grotewold (2003)** Regulation of anthocyanin pigmentation. *Recent Advances in Phytochemistry* 37:59-78.
- Iwashina T (2000)** The Structure and distribution of the flavonoids in plants. *J. Plant Res.* 113: 287-299.
- Jende B S (1993)** Genetic control of flavonoid biosynthesis in barley. *Hereditas* 119:187-204.



- Jez J M and J P Noel (2002)** Reaction mechanism of chalcone isomerase. pH dependence, diffusion control and product binding differences. *The Journal of Biological Chemistry* 11: 1361-1369.
- Jing P (2006)** Purple corn anthocyanins: chemical structure, chemoprotective activity and structure/function relationships. Dissertation Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree Doctor of Philosophy the Graduate School of The Ohio State University, USA. 287 p.
- Johannessen C L (1980)** Domestication process of maize continues in Guatemala. *Economic Botany* 36(1): 84-99.
- Johannessen C L, M R Wilson and WA Davenport (1970)** The domestication of maize: process or event?. *Geographical Review* 60 (3): 393-413.
- Kitamura S (2006)** Transport of flavonoides. In: E Grotewold (ed) *The Science of Flavonoides*. Springer, USA. pp. 123-146
- Knaggs A R (2001)** The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural Products Report* 18:334-355.
- Koes R, W Verweij and F Quattrocchio (2005)** Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends in Plant Science* 10(5):236-242.
- Korobczak A, A Aksamit, M Łukaszewicz, K Lorenc, T Rorat and J Szopa (2005)** The potato glucosyltransferase gene promoter is environmentally regulated. *Plant Science* 168: 339–348.
- Kowalczyk E, P Krzesinski, M Kura, B Szmigiel and J Blaszczyk (2003)** Anthocyanins in medicine. *Polish Journal of Pharmacology* 55: 699-702.
- Kroll J, H M Rawel and S Rohn (2003)** Reactions of plant phenolics with food proteins and enzymes under special consideration of covalent bonds. *Food Science and Technology Research* 9 (3):205–218.
- Kukuła K L, A Korobczak, A A Stachurska, K Kostyń, M Łukaszewicz and J Szopa (2004)** Glucosyltransferase: the gene arrangement and enzyme function. *Cellular & Molecular Biology Letters* 9:935–946.
- Larson R L and J B Bussard (1986)** Microsomal flavonoid 3'-monooxygenase from maize seedlings. *Plant Physiology* 80: 483-486.



- Lepiniec L, I Debeaujon, J M Routaboul, A Baudry, L Pourcel, N Nesi and M Caboche (2006)** Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annual Review of Plant Biology* 57:405–30.
- Lister C E, J E Lancaster, K H Sutton and J R L Walker (1997)** Aglycone and glycoside specificity of apple skin flavonoid glycosyltransferase. *J Sci Food Agric.* 75:378-382.
- Liu R H (2007)** Whole grain phytochemicals and health. *Journal of Cereal Science* 46: 207–219.
- Manach C, A Scalbert, C Morand, C Rémésy and L Jiménez (2004)** Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 79:727–747.
- Martens S and G Forkmann (2000)** Flavonoid biosynthesis in *Gerbera* hybrids: enzymology and genetics. *Acta Horticulturae* 508:39-44.
- Martens S, J Knott, C A Seitz, L Janvari, S N Yu and G Forkmann (2003)** Impact of biochemical pre-studies on specific metabolic engineering strategies of flavonoid biosynthesis in plant tissues. *Biochemical Engineering Journal* 14: 227–235.
- Nakajima J I, Y Sato, T Hoshino, M Yamazaki and Kazuki Saito (2006)** Mechanistic study on the oxidation of anthocyanidins synthase by quantum mechanical calculation. *The Journal of Biological Chemistry* 281 (30): 21387–21398.
- Nakayama T, H Suzuki, and T Nishino (2003)** Anthocyanin acyltransferases: specificities, mechanism, phylogenetics, and applications *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 23: 117–132
- Ni C P, W Hsien K, C Liang C, H Ling C, Y Shou H and S Chen C (2006)** Black rice anthocyanins inhibit cancer cells invasion via repressions of MMPs and U-PA expression. *Chemico-Biological Interactions* 163: 218–229.
- Offen W, C Martínez F, M Yang, E Kiat L, B G Davis, C A Tarling, C M Ford, D J Bowles and G J Davies (2006)** Structure of a flavonoid glucosyltransferase reveals the basis for plant natural product modification. *The EMBO Journal* 25: 1396–1405.
- Pedreschi R and L Cisneros Z (2006)** Antimutagenic and antioxidant properties of phenolic fractions from andean purple corn (*Zea mays* L.). *J. Agric. Food Chem.* 54: 4557-4567.



- Pedreschi R and L Cisneros Z (2007)** Phenolic profiles of Andean purple corn (*Zea mays* L.). *Food Chemistry* 100: 956–963.
- Petersen M, D Strack, U Matern (1999)** Biosynthesis of phenylpropanoids and related compounds. In: M Wink (ed) *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*. CRC Press. USA. pp 151-202.
- Petit P, Granier T, Langlois E B, Manigand C B, Schmitter J M, Lauvergeat V, Hamdi S and Gallois B (2007)** Crystal structure of a grape dihydroflavonol-4-reductase, a key enzyme in flavonoid biosynthesis. *Journal of Molecular Biology*, 368, 1345-1357.
- Pietrini F, M A Iannelli and A Massacci (2002)** Anthocyanin accumulation in the illuminated surface of maize leaves enhances protection from photo-inhibitory risks at low temperature, without further limitation to photosynthesis. *Plant Cell and Environment* 25: 1251–1259.
- Pooma W, C Gersos and Erich Grotewold (2002)** Transposon insertions in the promoter of the *Zea mays* a1 gene differentially affect transcription by the myb factors P and C1. *Genetics* 161: 793–801
- Pourcel L, J M Routaboul, V Cheynier, L Lepiniec and I Debeaujon (2007)** Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in Plant Science* 12(1): 29-36.
- Poustka F, N G Irani, A Feller, Y Lu, L Pourcel, K Frame and E Grotewold (2007)** A trafficking pathway for anthocyanins overlaps with the endoplasmic reticulum-to-vacuole protein-sorting route in arabidopsis and contributes to the formation of vacuolar inclusions. *Plant Physiology* 145:1323–1335.
- Salinas M Y, G Salas S, D Rubio H, and N Ramos L (2005)** Characterization of anthocyanin extracts from maize kernels. *Journal of Chromatographic Science* 43: 483-487.
- Salinas M Y, F Martínez B, M Soto H, R Ortega P y J L Arellano V (2003)** Efecto de la nixtamalización sobre las antocianinas del grano de maíces pigmentados. *Agrociencia* 37: 617-628.
- Saito K and M Yamazaki (2002)** Biochemistry and molecular biology of the late stage of biosynthesis of anthocyanins: lessons from *Perilla frutescens* as a model plant. *New Phytologist* 155:9-23.



- Sasaki Y and Y Nagano (2004)** Plant acetyl CoA carboxylase: structure, biosynthesis, regulation, and gene manipulation for plant breeding. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 68(6):1175-1184.
- Schijlen E G W M, C H R De Vos, A J Van Tunen and A G Bovy (2004)** Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry* 65:2361-2648.
- Sekhon R S, G Kuldau, M Mansfield and S Chopra (2006)** Characterization of Fusarium-induced expression of flavonoids and PR genes in maize. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 69: 109–117.
- Shimada S, Y T Inoue and M Sakuta (2005)** Anthocyanidin synthase in non-anthocyanin-producing *Caryophyllales* species. *The Plant Journal* 44:950–959.
- Shirley B W (2001)** Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology* 126:485-493.
- Singh A, M T Selvi and R Sharma (1999)** Sunlight-induced anthocyanin pigmentation in maize vegetative tissues. *Journal of Experimental Botany* 50(339):1619–1625.
- Springob K, J Nakajima, M Yamazaki and K Saito (2003)** Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins. *Natural Products Report* 20:288-303.
- Stafford H A (1998)** Teosinte to maize. Some aspects of missing biochemical and physiological data concerning regulation of flavonoid pathways. *Phytochemistry* 49 (2); 285-293.
- Sturaro M, P Vernieri, P Castiglioni, G Binelli and G Gavazzi (1996)** The *rea* (red embryonic axis) phenotype describes a new mutation affecting the response of maize embryos to abscisic acid and osmotic stress. *Journal of Experimental Botany* 47 (299): 755-762.
- Tanaka Y, N Sasaki and A Ohmiya (2008)** Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal* 54:733–749.
- Teeri T H and P Elomaa (2003)** Flower color. In: B Thomas, D J Murphy and B G Murray (Editors). *Encyclopedia of applied plant Sciences*. Elsevier Academic Press. pp. 406-413.
- Turnbull J J, J Nakajima, R W D Welford, M Yamazaki, K Saito and C J Schofield (2004)** Mechanistic studies on three 2-oxoglutarate-dependent



oxygenases of flavonoid biosynthesis. Anthocyanidins synthase, flavonol synthase, and flavanone 3-hydroxylase. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (2): 1206–1216.

Unno H, F Ichimaida, H Suzuki, S Takahashi, Y Tanaka, A Saito, T Nishino, M Kusunoki and T Nakayama (2007) Structural and mutational studies of anthocyanin malonyltransferases establish the features of BAHD enzyme catalysis. *The Journal of Biological Chemistry* 282 (21): 15812–15822.

Wagner G J and G Hrazdina (1984) Endoplasmic reticulum as a site of phenylpropanoid and flavonoid metabolism in *Hippeastrum*. *Plant Physiology* 74; 901-906.

Yazaki K (2006) ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites *FEBS Letters* 580:1183–1191.

Yoshinaga M, O Yamakawa and M Nakatani (1999) Genotypic diversity of anthocyanin content and composition in purple fleshed sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Lam). *Breeding Science* 49:43-47.

Yu O and J M Jez (2008) Nature's assembly line: biosynthesis of simple phenylpropanoids and polyketides. *The Plant Journal* 54:750–762.

Yu O, Matsuno M and Subramanian S (2006) Flavonoids in flowers: genetics and biochemistry. In: Jaime A Teixeira da Silva (Ed.) *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues*. First Edition. Global Science Books, UK. pp. 283-293.

Yu O and B McGonigle (2005) Metabolic engineering of isoflavone biosynthesis. *Advances in Agronomy* 86: 147-190.

Zhang H, L Wang, S Deroles, R Bennett, K Davies (2006) New insight into the structures and formation of anthocyanic vacuolar inclusions in flower petals. *BMC Plant Biology* 6:29-42.

Zubieta C, X Zhi H, R A Dixon and J P Noel (2001) Structures of two natural product methyltransferases reveal the basis for substrate specificity in plant O-methyltransferases. *Nature Structural Biology* 8(3): 271-279.



III. GENÉTICA DE LA BIOSÍNTESIS Y ACUMULACIÓN DE ANTOCIANINAS EN EL GRANO DE MAÍZ

RESUMEN

El color del grano debido a la biosíntesis y acumulación de antocianinas ha sido objeto de estudio genético desde el siglo XX. Los primeros conocimientos generados fueron para entender su herencia, desde un enfoque Mendeliano, ya que algunos alelos de este carácter presentan ese comportamiento. Sin embargo, a través del tiempo, aprovechando la amplia variabilidad genética del maíz, se descubrieron otros alelos y genes cuyo comportamiento no se explicaba por las reglas mendelianas, motivando así la profundización de su estudio. Hasta el momento se sabe que la ruta biosintética involucra ocho genes estructurales que codifican enzimas catalíticas y nueve genes que codifican factores protéicos que regulan la expresión de los estructurales, determinando así la biosíntesis en cierto órgano de la planta y la tasa de acumulación del pigmento, ya sea en tallos, hojas, espigas, totomoxtles, olotes, pericarpios y capas de aleurona. El patrón de pigmentación del grano de maíz manifiesta cambios por la presencia de transposones que modifican las secuencias de bases de los genes, alterando su función; también, por la influencia de fenómenos epigenéticos como el silenciamiento de genes, de efectos maternos que cambian la interpretación de la segregación de tonalidades del color del grano, y los factores ambientales, que en niveles estresantes activan la biosíntesis del pigmento.

Revisar el conocimiento actual sobre estos pigmentos permite la mejor definición de estrategias en un programa de mejoramiento genético, dirigido a la formación del arquetipo de maíz con alto rendimiento de antocianinas por planta y por unidad de superficie.

Palabras clave: antocianinas, genes estructurales, genes reguladores, factores de transcripción, genética de pigmentos.



INTRODUCCIÓN

En el maíz se presentan de 3 a 4 colores diferentes del grano: el amarillo, que es producto de la acumulación de carotenoides, los colores rojo, azul y púrpura, son producidos por antocianinas. El “blanco” es el resultado de la ausencia de pigmentos de estos tipos (Ford, 2000). De las poblaciones estudiadas por Espinosa *et al.* (2008) las de grano rojo (Rojo-1 y Rojo-2) presentaron acumulación de antocianinas en el pericarpio y en la aleurona, y sólo en la aleurona (Azul-1 y Azul-2), pero no se detectó en ninguno de estos tejidos en las poblaciones de grano blanco y amarillo. Por ello, se analiza la información disponible sobre el control genético de la biosíntesis de antocianinas en las principales estructuras del grano del maíz que almacenan el pigmento: el pericarpio y la capa de aleurona.

Pericarpio

Los primeros análisis de tipo Mendeliano, hechos por Anderson y Emerson (1923), indican que el color del pericarpio es un carácter dominante sobre el pericarpio incoloro. Las combinaciones de dos loci dan como resultado los siguientes colores: PA = rojo, Pa = café, pA y pa = incoloro. También reportan que estas combinaciones ocurren en conjunto con otros loci relacionados con el color del vástago de la planta de maíz ($ABPl$ = púrpura, $ABpl$ = rojizo, $AbPl$ = púrpura tenue, $Abpl$ = rojizo tenue, $aBPl$ = café y $ABpl$, $abPl$ y $abpl$ = verde); de este modo, una planta de follaje rojizo con pericarpio incoloro está conformada genéticamente así: $ppAabbplpl$.

Mediante retrocruzas se descubrió que los loci A y P están relacionados con el color del pericarpio y son heredados de forma independiente, también que el color de la planta no tiene influencia sobre el color del pericarpio, por lo tanto, P y Pl son independientes. Similarmente el gen P es independiente del locus R que corresponde al color expresado por antocianinas presentes en la capa de aleurona (Anderson y Emerson, 1923). Esto indica que puede haber antocianinas en los órganos reproductivos y vegetativos o en cualquiera de estos tejidos, sin haber interferencia entre los loci.



Estudios posteriores sobre el gen *P* (= *P1*) encontraron que éste se localiza en el brazo corto del cromosoma uno y que se expresa en el olote y en los órganos florales. Entre sus alelos están: *P1-wr*, relacionado con el pericarpio incoloro y el olote rojo, *P1-ww* indica que el pericarpio y el olote son incoloros. *P1-wr* es dominante sobre *P1-ww* (Frascaroli y Landi, 1998). Sólo el alelo *P-vv* es el responsable de la variegación del pericarpio en los granos (Grotewold *et al.*, 1994).

Capa de aleurona

East (1913) dio a conocer que la estructura genética de los granos incoloros es la siguiente: *PPRRcc*, *PPrrcc*, *PPrrCC*, *ppRRcc* y *pprrCC*. Esto indica que al menos un par de alelos deben estar en condición homocigótica dominante. En adición, Rhoades (1952) planteó que la aleurona incolora está estructurada genéticamente como se muestra en el Cuadro 3.1.

Cuadro 3.1. Estructura genética de la capa de la aleurona sin la capacidad de biosíntesis de antocianinas.

<i>Combinación</i>	<i>Estructura genética</i>
1	<i>a1a1 a2a2 PP RR cc bz_</i>
2	<i>a1a1 a2a2 PP rr cc bz_</i>
3	<i>a1a1 a2a2 PP rr cc bz_</i>
4	<i>a1a1 a2a2 pp RR CC bz_</i>
5	<i>a1a1 a2a2 pp rr CC bz_</i>

bz_ significa que puede estar en condición homocigótica recesiva *bzbz* o heterocigótica *Bzbz*.

Por su parte, Coulter (1920) muestra que los genes R y C son indispensables y complementarios para la producción del color rojo en la capa de aleurona; pero añade que la participación del gen *P* (= *Pr*) es necesaria para darle el color púrpura a este tejido. Así, se deduce que los colores de la aleurona resultan de varias combinaciones genéticas, tal como sigue: Púrpura= *PpRRCC*, *Pp RrCC*, *Pp RRCc* y *PpRrCc*. Esto indica que al menos tres alelos dominantes (*P*, *R* y *C*) son necesarios para la producción de este color; Rojo= *ppRRCC*, *ppRrCC*, *pp RRCc* y



ppRrCc. En este caso, no debe estar el alelo dominante *P*, pero sí deben existir al menos dos alelos dominantes (*R* y *C*). Coulter (1920) también menciona la existencia de un gradiente en la intensidad del color en el intervalo de rojo a púrpura.

Con los trabajos realizados por East (1913), Coulter (1923) y Rhoades (1952) se infiere que la aleurona tendrá pigmentación siempre y cuando se tengan las siguientes combinaciones genéticas: *A1A1 A2A2 CC RR PP/pp BzBz/bzbz*, donde los loci *P* y *Bz* pueden estar en condición homocigótica dominante o en condición homocigótica recesiva.

Estudios adicionales hechos por Coe (1957) indican que al estar el locus *in* en condición homocigótica recesiva, la aleurona ya sea roja o púrpura, tendrá mayor intensidad en la pigmentación, hasta aparentar un color “negro”.

Tomando en cuenta todos los estudios anteriores es posible establecer que la estructura genética de la aleurona pigmentada con antocianinas es variable (Cuadro 3.2).

Cuadro 3.2. Estructura genética de la capa de aleurona con la capacidad de biosíntesis de antocianinas y su relación con el color.

Estructura genética							Color de aleurona
<i>A1A1</i>	<i>A2A2</i>	<i>CC</i>	<i>RR</i>	<i>PP</i>	<i>BzBz</i>	<i>inin</i>	Púrpura oscuro
<i>A1A1</i>	<i>A2A2</i>	<i>CC</i>	<i>RR</i>	<i>PP</i>	<i>BzBz</i>	--	Púrpura
<i>A1A1</i>	<i>A2A2</i>	<i>CC</i>	<i>RR</i>	<i>pp</i>	<i>BzBz</i>	<i>inin</i>	Rojo oscuro
<i>A1A1</i>	<i>A2A2</i>	<i>CC</i>	<i>RR</i>	<i>pp</i>	<i>BzBz</i>	--	Rojo
<i>A1A1</i>	<i>A2A2</i>	<i>CC</i>	<i>RR</i>	<i>PP</i>	<i>bzbz</i>	--	Bronceado o café
<i>A1A1</i>	<i>A2A2</i>	<i>CC</i>	<i>RR</i>	<i>pp</i>	<i>bzbz</i>	--	Café tenue

Ford (2000) menciona que entre los alelos que explican los diversos colores de la aleurona (rojo, púrpura, blanco y amarillo,) ocurren varios tipos de interacción: recesiva, dominante, doble recesiva y dominante-recesiva. Esta interacción entre



los genes ocurre por la competición de las enzimas involucradas en la ruta biosintética. Por ejemplo, la que presentan las proteínas reguladoras que codifican los alelos *C-I* y *c*, las cuales compiten por el sitio específico en la región promotora de los genes estructurales.

Por otra parte, la dominancia entre genes alélicos tiene bases moleculares. En *Ipomea purpurea*, el color púrpura de la flor es dominante sobre el rosa. Los estudios moleculares revelaron que en el locus *P* hay dos alelos: *P*, para el color púrpura y *p*, para el color rosa. El gen *p* se diferencia de *P* porque tiene una inserción de 400 pares de bases en el tercer exón, así resulta la producción de un transcrito truncado y por lo tanto, la enzima (F³H) no es funcional, resultando el color rosa en vez del púrpura (Zufall y Rausher, 2003).

Efecto del progenitor

Los frutos o semillas de algunos individuos provenientes de ciertas cruzas expresan en mayor magnitud características del progenitor masculino. A tal influencia se le denominó xenia (Poindexter, 1903). Este concepto hacía referencia a los efectos del progenitor masculino sobre las características del endospermo de la hembra, tales como su color o textura, ya que se considera al endospermo de origen materno. Bajo esta premisa, se descubrió que la xenia ocurría cuando el macho presentaba dominancia completa, pero al existir dominancia incompleta cualquier progenitor podía provocar el fenómeno (East, 1913). En este sentido, en maíz se encontró que el endospermo harinoso dominaba sobre el carácter dulce, el color amarillo dominaba sobre el blanco, el color rojo y púrpura de la aleurona dominaban sobre la incolora (Weatherwax, 1919), y que el color púrpura de la aleurona dominaba sobre el color rojo (Snyder, 1946). Sin embargo, una vez que se conoció citogenéticamente la triple fusión durante la fecundación, se encontró que la variación en el endospermo (xenia) era causada por factores (genes) transmitidos por el macho (Waller, 1917). No obstante, en algunas cruzas de maíz, la hembra con aleurona blanca, al polinizarse con polen de un macho de aleurona roja desarrolla granos blancos. La explicación se basó en que la hembra



contribuyó con doble cantidad de cromosomas con respecto a la del macho (2:1), aun cuando la hembra era recesiva. En otro caso similar, en la cruce de una hembra de endospermo suave y blanco con un macho de endospermo duro y amarillo resultaron granos de color amarillo con endospermo suave. En este caso hubo un efecto xénico del macho sobre el color del endospermo y un efecto de dosis cromosómica de la hembra sobre la textura (Weatherwax, 1919).

En el transcurso del estudio de la herencia del color del grano en maíz surgieron varios casos especiales. Uno de ellos fue estudiar algunos alelos relacionados con el color de la aleurona (R^{st} , R^g , R^r , R^{ch}), de manera que al cruzar machos con distintos alelos con una hembra con aleurona blanca, se derivaron granos moteados y granos con un color púrpura uniforme. Los análisis químicos practicados mostraron que los granos moteados de la F_1 semilla presentaron menor contenido de antocianinas, en comparación con los granos de color púrpura uniforme. El fenotipo moteado se presentó principalmente en poblaciones originarias de México, Estados Unidos y Guatemala, entre otros países. Sin embargo, las poblaciones que desarrollaron granos uniformemente pigmentados se denominaron no paramutables o metaestables, las cuales se cultivan en Bolivia, Perú, Chile y Ecuador (Van Der Walt y Brink, 1969).

A partir de los estudios sobre xenia, y para entender los mecanismos genéticos de la segregación de varios patrones de pigmentación en la capa de aleurona del grano, Kermicle (1970), mediante técnicas citogenéticas, logró modificar la dosis de loci aportados por el macho y por la hembra. En las cruces directas y recíprocas (hembra de aleurona blanca x macho de aleurona roja y hembra de aleurona roja x macho de aleurona blanca) se descubrió que la aleurona moteada surgió cuando la hembra aportó el gen recesivo en dosis de uno hasta cuatro y el macho contribuyó con una o dos dosis del gen dominante (1-4r/1-2R); por el contrario, se desarrollaron granos con aleurona totalmente pigmentada en cruces donde la hembra contribuyó con una o hasta cuatro dosis del dominante, independientemente de que si el macho aportara una o dos dosis del alelo recesivo



o una dosis del dominante (1-4R/1-2r o 1-4R/R). Con este trabajo se dedujo una expresión diferencial del gen R en el endospermo, en función del progenitor que lo transmite, fenómeno que no se logró explicar como efectos maternos (dosis) o por efecto de xenia (explicada con la doble fecundación); en cambio, se plantearon varios aspectos relacionados con tal comportamiento: la paramutación, la presencia de transposones y la impresión génica (Kermicle, 1978). Actualmente se sabe que los genes *red* (*R*) y *booster* (*B*), son genes que codifican factores de transcripción que regulan la biosíntesis de antocianinas y que tienen algunos alelos paramutables (*R^r*, *B^I*) y otros alelos paramutagénicos (*Rst*, *B⁺*) (Vedova y Cone, 2004).

Otro gen regulador de la biosíntesis es el *C*, cuyos alelos normales, conocidos como Wisconsin y Cornell, producen proteínas que regulan la transcripción de varios genes estructurales (*a1*, *a2*, *c2*, *bz1* y *bz2*) involucrados en la ruta biosintética de las antocianinas. Así, al cruzar una línea hembra normal (*C1C1*) con una línea macho portadora del alelo inhibidor que contiene un transposón (*C1-IA*), se producen granos completamente pigmentados; en contraste, cuando el alelo con el transposón *C1-IA* lo trasmite la hembra se producen granos incoloros. Un comportamiento opuesto lo manifiesta el alelo inhibidor estándar (*C1-I*), ya que los granos incoloros se producen cuando este alelo lo transmite el macho (Edwards *et al.*, 2001). En este caso, los autores explican el comportamiento por un efecto de dosis y por las características estructurales de los promotores de los genes estudiados. Por el contrario, Birchler (1993) indica que el efecto de dosis y la impresión génica no son mutuamente excluyentes. El efecto de dosis es factible en el caso de biosíntesis de carotenoides (Egesel *et al.*, 2003) y la impresión génica es sobresaliente en la biosíntesis de antocianinas, pero también en la acumulación de biomasa en el endospermo (Lin, 1982 y 1984). Otros trabajos proponen que en vez de dosis es más importante un balance genómico 2:1 (materno:paterno), pues cualquier desviación de éste conlleva a la degeneración y aborto de los granos, ocasionado por fallas en la formación de las células de



transferencia que participan en la nutrición del grano (Charlton *et al.*, 1995).

Avances recientes con respecto al gen *R*, demuestran que la impresión genómica ocurre cuando la hembra portadora del alelo paramutable *R^r* se cruza con el macho portador del alelo *r*, entonces, en la F₁, el gen es transcripcionalmente activo y el grano resulta completamente pigmentado; pero cuando el gen *R^r* es transmitido por el macho a través del polen, presenta un nivel reducido de transcripción y el grano resultante es moteado o casi incoloro; es decir, cuando es transmitido maternalmente, este gen es hipometilado; pero es hipermetilado cuando el gen es transmitido paternalmente, aunado a una represión a nivel de cromatina (Vedova y Cone, 2004). La metilación ocurre por la modificación química de las citocinas del ADN con grupos metilo, a través de las enzimas metiltransferasas; esto también es conocido como silenciamiento de genes (Grant y Dickinson, 2005).

Control transcripcional de la biosíntesis de antocianinas

Los genes que codifican la serie de proteínas participantes en la ruta de biosíntesis de las antocianinas se presentan en el Cuadro 3.3, los cuales se clasifican en tres tipos, de acuerdo a la función de sus productos moleculares, a saber: estructurales, reguladores y transportadores (Cone, 2007).

En maíz, los genes estructurales codifican para la formación de las enzimas que catalizan las reacciones de la ruta de biosíntesis de las antocianinas y son: *c2* (chalcona sintetasa), *chi* (chalcona isomerasa), *f3h* (flavanona 3-hydroxilasa), *a1* (dihidroflavonol 4-reductasa), *a2* (leucoantocianidina dioxigenasa/antocianina sintetasa), *bz1* (UDP-glucosa flavonoide 3-O-glucosil transferasa), *bz2* (glutatión S-transferasa) (Piazza *et al.*, 2002). Todos los genes estructurales, principalmente los alelos dominantes, son indispensables para la biosíntesis de antocianinas, en cualquier tejido de la planta de maíz (Piazza *et al.*, 2002).

Los genes estructurales involucrados en la síntesis de antocianinas están controlados por la combinación de dos familias de factores de transcripción, la MYB y la MYC (Vom Endt *et al.*, 2002). En los vegetales las proteínas MYB tienen dos



Cuadro 3.3. Genes participantes en la biosíntesis de antocianinas y otros pigmentos en la planta de maíz.

Loci	Crom	Nombre	Alelos	Tipo	Long (pb)	Enzima
<i>pal</i>	-	-	-	E	-	PAL
<i>c2</i>	4 L	Colorless-2	<i>C2, c2, C2-Idf, Whp</i>	E	1203	CHS
<i>chi</i>	-	Chalcone isomerase-1	<i>Chi1, Chi2, Chi3, Po</i>	E	693	CHI
<i>fht1</i>	-	Flavanone hidroxilase	<i>Fht, fht</i>	E	1119	F3H
<i>pr1</i>	5 L	Purple	<i>P, p</i>	E	-	F3'H
<i>a1</i>	3 L	Anthocyanin-1	<i>A, a, A-b, a-B, A-d</i>	E	1073	DFR
<i>a2</i>	5 S	Anthocyanin-2	<i>A2, a2</i>	E	1188	ANS
<i>bz1</i>	9 S	Bronze-1	<i>Bz1, bz1</i>	E	1416	F3GT
<i>bz2</i>	1 L	Bronze-2	<i>Bz2, bz2</i>	T	-	GST
<i>ZmMrp4</i>	-	-	-	T	-	MRP
<i>c1</i>	9 S	Colored-1	<i>C1, c, Pl, C-I, C-S, c-p, c-n, c-m1, c-m2</i>	R	837	R2R3- MYB
<i>pl1</i>	6	Purple plant-1	<i>Pl1-Blotched</i>	R	-	R2R3- MYB
<i>r1</i>	10 L	Red	<i>R-r, R-g, r-g, r-r, R-st, R-sc, R-mb, R-ni, Lc, Sn, S</i>	R	1935	bHLH
<i>b1</i>	2	Booster-1	<i>B-Perú, B-Bolivia</i>	R	-	bHLH
<i>p1</i>	1 S	Pericarp	<i>P1-wr, P1-ww, P-vv</i>	R	-	-
<i>vp1</i>	3 L	Viviparous	<i>Vp1, vp1, vp-mc, vp-c</i>	R	-	-
<i>in1</i>	7 S	Intensifier	<i>In, in</i>	R	-	bHLH
<i>pac1</i>		Pale aleurone color-1	<i>Pac, pac</i>	R	-	WD40
<i>dek-1</i>	1 S	Defective kernel	<i>dek-1, dek-2, dek-21</i>	R	-	-

Crom= Cromosoma, Long= Longitud, pb= Pares de bases, E= Gene estructural, R= Gene regulador, T= Gene que codifica al transportador; PAL= Fenil alanina amonioliasa, CHS= Chalcona sintetasa, CHI= Chalcona isomerasa, FHT= Flavanona-3-hidroxilasa, F3'H= Flavonoide-3-hidroxilasa, DFR= Dihidroflavonol reductasa, ANS= Antocianidina sintetasa, F3GT= Flavonoide-3-O-glucosil transferasa, GST= Glutación-S-transferasa, MRP= Transportador resistente a multidrogas, (-)= Desconocido. **Fuente:** Elaborado con base en Cone (2007); Halbwirth *et al.* (2003), Ford (2000), Madhuri y Reddy (1999), Rausher *et al.* (1999), Frascaroli y Landi (1998), Liu *et al.* (1998), Mc Mullen *et al.* (1998, 2001), Stafford (1998); Marrs *et al.* (1995), Grotewold *et al.* (1994), Jayaram y Peterson (1990).



motivos (R2 y R3), por lo que forman la familia R2R3-MYB (Braun y Grotewold, 1999).

Los genes MYB producen proteínas tipo HtH (helix turn helix) y los genes MYC producen las proteínas bHLH (basic helix loop helix). Estos dos tipos de proteína se han estudiado en plantas modelo, para entender la biosíntesis de las antocianinas: petunia, flor boca de dragón o perrito, arabide y maíz. En el maíz, estas proteínas son codificadas por los genes reguladores *R* y *C1*, respectivamente, los cuales se expresan en la aleurona (Vom Endt *et al.*, 2002). Las proteínas producidas por la familia del gen *R* actúan sobre los genes estructurales *Bz1* y *Bz2*, mientras que la familia del gen *C1* actúa sobre los genes estructurales *C2*, *f3h*, *A1* y *A2* (Quattrochio *et al.*, 1998).

Por su parte, Piazza *et al.* (2002) clasifican a los genes reguladores del maíz en dos familias de la siguiente manera:

r1/b1: es una familia que codifica las proteínas de estructura homóloga al dominio de unión y dimerización, hélice-orquilla-hélice básica (bHLH, basic helix-loop helix, por sus siglas en inglés), encontrado en las oncoproteínas tipo MYC presentes en animales. Entre los alelos más comunes de tales loci están: *b1*, *r1*, *sn1*, *Lc* y *Hopi*.

c1/pl1: es la segunda familia que codifica proteínas con estructura homóloga al dominio de unión al ADN (DNA-binding domain, en inglés) de las oncoproteínas tipo MYB encontradas en animales. Esta familia tiene menor diversidad alélica con respecto a la anterior, por lo que sus miembros presentan similitud estructural y funcional.

Un factor de transcripción que reprime la expresión de los genes estructurales se ubica en el locus *IN1* (*intensifier1*). Su alelo *in1* está relacionado con la mayor acumulación de antocianinas en el grano (Broun, 2004)



En el genoma del maíz, varios genes reguladores y estructurales están presentes en dos copias, tal es el caso de *C1* y *Pl*, *R* y *B*, lo cual se ha confirmado porque conservan un alto grado de homología en su región codificante, además de que sus productos son idénticos en estructura y función. Sin embargo, los intrones y secuencias que se encuentran en los flancos divergen, por lo que su región promotora tiene poca a nula homología, y en consecuencia, su expresión difiere en el tejido; por ejemplo, *C1* y *R* son activos en el escutelo y en la capa de aleurona del grano, mientras que *Pl* y *B* se expresan en los órganos vegetativos de la planta. Otro par de genes estructurales que están duplicados tanto en maíz como en teocintle son *A1* y *A1**. Ambos genes tienen 4 exones y 3 intrones pequeños. Las proteínas que codifican son de 357 y 353 aminoácidos, respectivamente (Bernhardt *et al.*, 1998). Son cuatro las regiones promotoras del gen *A1*: LaPBS (low affinity for P1 binding sites), ARE (anthocyanin regulator element), HaPBS (high affinity for P) y TATA (box) (Pooma *et al.*, 2002).

Estudios recientes muestran que para la producción de antocianinas es necesaria la cooperación entre las proteínas reguladoras producidas por el gen *C1* con las producidas por el gen *R*. Ambas proteínas se ligan a regiones promotoras (ARE, CBS o PBS) de los genes estructurales *A1* y *Bz1*, con la participación del cofactor RIF (recruiting binding factor) (Hernández *et al.*, 2004). La presencia del dominio ACT en la proteína producida por *R* es indispensable para la interacción molecular con las proteínas R2R3-MYB producidas por *C1* (Feller *et al.*, 2006).

A la interacción compleja entre proteínas se le conoce como control transcripcional combinatorio. Particular estudio ha enfatizado al control del gen estructural *A1*, que codifica la enzima dihidroflavonol reductasa (DFR). Para tal evento los factores de transcripción forman el complejo bHLH/MYB con el recién descubierto factor RIF1 (R interacting factor 1) en las proximidades del promotor del gen *A1*, donde incrementan la acetilación de las histonas, resultando la expresión del gen estructural.



Algunas alteraciones en la secuencia de bases del gen *R*, causadas por transposones Ds, tienen impacto en la estructura de la proteína reguladora y con ello se tiene una menor producción de ARNm en los genes estructurales *C2* y *A1* (Feller *et al.*, 2006).

Control transcripcional de la biosíntesis de flobafenos

El gen estructural *A1* codifica la enzima DFR, la cual participa en la formación de flobafenos y de antocianinas. Estos pigmentos no se forman si el gen pierde su función, entonces el pericarpio toma un color café y los órganos vegetativos se quedan de color verde (Pooma *et al.*, 2002).

Para la formación de flobafenos interviene el gen regulador *P1*, que codifica la proteína MYB-3 y se expresa en pericarpio, olote, glumas de la espiguilla y en los estilo-estigmas; únicamente regula la biosíntesis de tales pigmentos actuando sobre los genes estructurales *C2*, *Chi*, y *A1*. Su alelo *P1-ww* tiene tres regiones en su promotor: *P1.2*, *P1.0* y *Pb*. Las dos primeras son fragmentos que incrementan la transcripción y la tercera región, esencialmente es el promotor (Mol *et al.*, 1998; Sidorenko *et al.*, 2000). Otros alelos de *p1* son *P1-rw* (red pericarp/white cob) y *P1-rw751::Ac*, que contienen un transposón *Ac*, mientras que a *P1-rw1077* le falta un fragmento de 386 pares de bases (Zhang y Peterson, 2005).

Para la producción de flobafenos, los genes reguladores *C1* y *R* se complementan para dar lugar a la proteína P1*, que a su vez interacciona con el gen *R* para acoplarse al complejo promotor (RIF, ARE y CBS), correspondiente al gen estructural *A1* (Hernández *et al.*, 2004).

Los factores de transcripción tienen la propiedad de activar o reprimir la expresión génica mediante un incremento o disminución en la acumulación de ARNm (Broun, 2004). La participación de los factores de transcripción y de su interacción con factores ambientales brinda complejidad a la ruta de biosíntesis de antocianinas (Figura 3.1), permitiendo el análisis de la acumulación de tales pigmentos, como una característica cuantitativa.



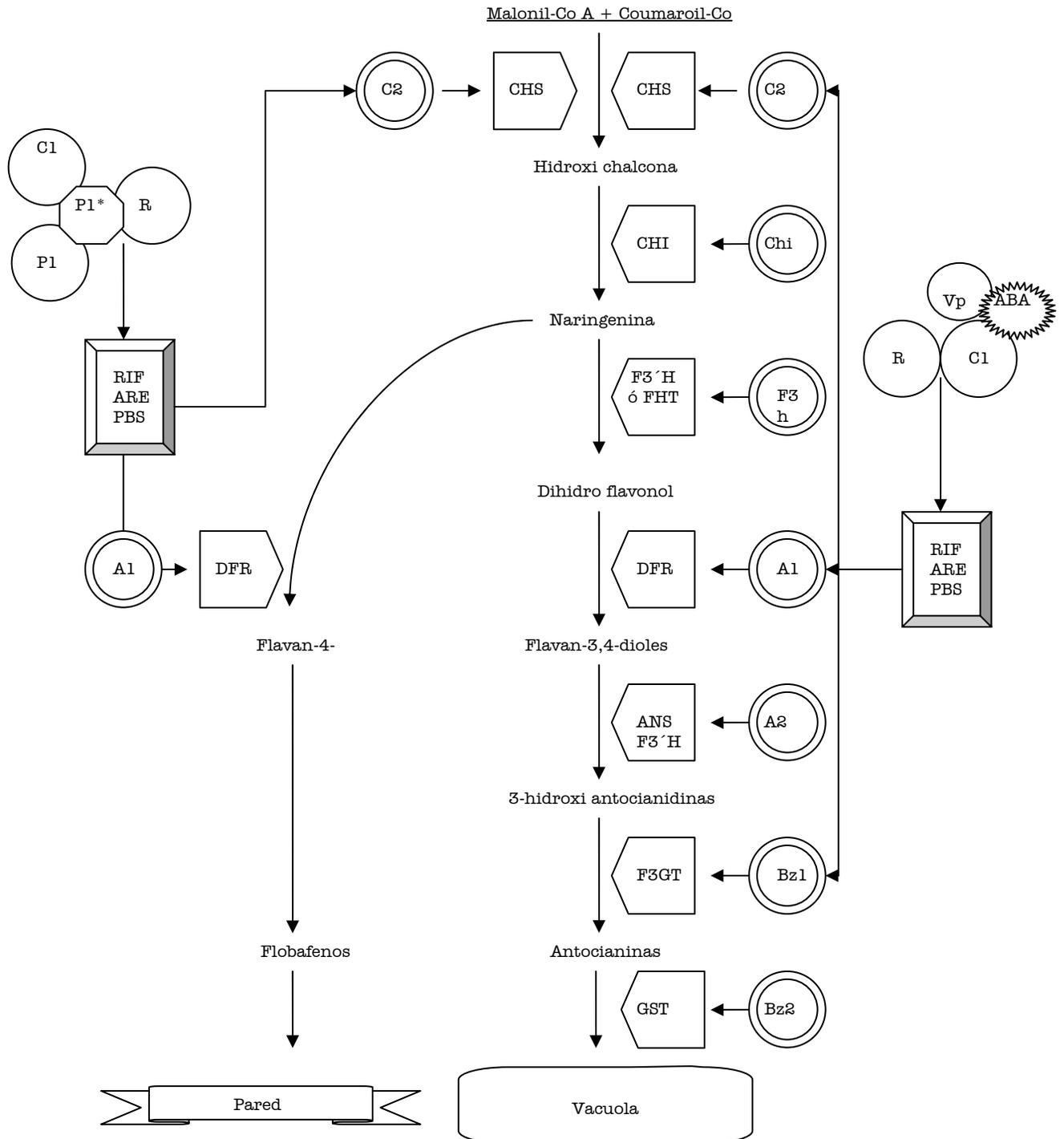


Figura 1. Control genético de la biosíntesis de antocianinas y de flobafenos en el grano del maíz. CHS= chalcona sintetasa, CHI= chalcona isomerasa, FHT= flavanona-3-hidroxilasa, F3'H= flavonoide-3-hidroxilaza, DFR= dihidroflavonol reductasa, ANS= antocianidina sintetasa, F3GT= flavonoide-3-O-glucosil transferasa, GST= glutation-S-transferasa. Fuente: Elaboración propia con base en Doebley (1993), Grotewold *et al.* (1994) Mol *et al.* (1998), Halbwirth *et al.* (2003), Hernández *et al.* (2004).

Genes estructurales ○ Genes reguladores ○ Proteínas: ○ Enzimas ○, Reguladores del desarrollo ○ Complejo promotor de los genes: □



CONCLUSIÓN

La biosíntesis y acumulación de antocianinas en el grano de maíz es compleja dado que intervienen genes estructurales que codifican las enzimas catalíticas, genes que regulan la transcripción en determinado tejido de la planta y bajo determinadas condiciones ambientales y otros fenómenos epigenéticos que hacen complejo el sistema.

LITERATURA CITADA

- Anderson E G and Emerson R A (1923)** Pericarp studies in maize I. The inheritance of pericarp colors. *Genetics* 8: 466-476.
- Bernhardt J, K Stich, Z S Sommer, H Saedler and U Wienand (1998)** Molecular analysis of a second functional *A1* gene (dihydroflavonol 4-reductase) in *Zea mays*. *The Plant Journal* 14(4):483-488.
- Birchler J A (1993)** Dosage analysis of maize endosperm development. *Annual Review of Genetics* 27: 181-204.
- Braun E L and E Grotewold (1999)** Newly discovered plant c-myb-like genes rewrite the evolution of the plant myb gene family. *Plant Physiology* 121: 21-24.
- Broun P (2004)** Transcription factors as tools for metabolic engineering in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 7:202–209
- Charlton W L, Keen C L, Merriman C, Lynch P, Greenland A J, and Dickinson H G (1995)** Endosperm development in *Zea mays*: Implication of gametic imprinting and paternal excess in regulation of transfer layer development. *Development* 121:3089–3097.
- Coe E H (1957)** Anthocyanins synthesis in maize sequence construction. *The American Naturalist* 91(861):381-385.
- Cone K C (2007)** Anthocyanin synthesis in maize aleurone tissue. *Plant Cell Monographs* 8:121-139.
- Coulter M C (1920)** Inheritance of aleurone color in maize. *Botanical gazette*. 69 (5): 407-425.
- Doebley J (1993)** Genetics, development and plant evolution. *Current Opinion in Genetics and Development* 3: 865–872.



- East E M (1913)** Xenia and the endosperm of angiosperms. *Botanical Gazette* 56(3):217-224.
- Edwards J, D Stoltzfus, and P A Peterson (2001)** The *C1* locus in maize (*Zea mays* L.): effect on gene expression. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 718–724.
- Egesel C O, J C Wong, R J Lambert, T R Rocheford (2003)** Gene dosage effects on maize carotenoid concentration in maize grain.
- Espinosa T E, Ma. del C Mendoza C, F Castillo G, J Ortiz C, A Delgado A y A Carrillo S (2008)** Acumulación de antocianinas en pericarpio y aleurona del grano y sus efectos maternos en poblaciones criollas de maíz pigmentado. *Revista Fitotecnia Mexicana*. (Enviado).
- Feller A, J M Hernandez and E Grotewold (2006)** An ACT-like domain participates in the dimerization of several plant basic-helix-loop-helix transcription factors. *The Journal of Biological Chemistry* 281(39):28964–28974.
- Ford R H (2000)** Inheritance of kernel color in corn: explanations and investigations. *The American Biology Teacher* 62(3):181-188.
- Grant D R T and H G Dickinson (2005)** Epigenetics and its Implications for Plant Biology. 1. The Epigenetic Network in Plants. *Annals of Botany* 96(7): 1143 - 1164.
- Frascaroli, E. and P. Landi (1998)** Allelic frequency change of P1 gene in maize populations after recurrent selection for grain yield. *Crop Science* 38:1391-1394.
- Grotewold E, B J Drummond, B Bowen and T Peterson (1994)** The Myb homologous *P* gene controls phlobaphene pigmentation in maize floral organs by directly activating a flavonoid biosynthetic gene subset. *Cell* 76:543-553.
- Halbwirth H, S Marles, U Wienand, G Forkman and K Stich (2003)** Biochemical formation of anthocyanins in silk tissue of *Zea mays*. *Plant Science* 164:489-495.
- Hernández J M, G F Heine, N G Irani, A Feller, M G Kim, T Matulnik, V L Chandler and E Grotewold (2004)** Different mechanisms participate in the *R*-dependent activity of the R2R3 MYB transcription factor *C1*. *The Journal of Biological Chemistry* 279(46):48205-48213.



- Hernández J M, A Feller, K Morohashi, K Frame and E Grotewold (2007)** The basic helix–loop– helix domain of maize R links transcriptional regulation and histone modifications by recruitment of an EMSY-related factor. *PNAS* 104 (43): 17222–17227.
- Jayaram C and P A Peterson (1990)** Anthocyanin pigmentation and transposable elements in maize aleurone. *Plant Breeding Reviews* 8: 91-128.
- Kermicle J L (1978)** Imprinting of gene action in maize endosperm: In: D B Walden (ed). *Maize Breeding and Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. John Wiley & Sons, New York. pp 357–171.
- Kermicle J L (1970)** Dependence of the R-mottled aleurone phenotype in maize on mode of sexual transmission. *Genetics* 66, 69–85.
- Lin B Y (1982)** Association of endosperm reduction with parental imprinting in maize. *Genetics* 100 475-486.
- Lin B Y (1984)** Ploidy barrier to endosperm development in maize. *Genetics* 107: 103-115.
- Liu Y, L Wang, J L Kermicle and S R Wessler (1998)** Molecular consequences of Ds insertion into and excision from the helix loop helix domain of the maize R gene. *Genetics* 150:1639-1648.
- Madhuri G and A R Reddy (1999)** Plant biotechnology of flavonoides. *Plant Biotechnology* 16(3):179-199.
- Marrs K A, Alfenito M R, Lloyd A M, Walbot V (1995)** A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene *Bronze2*. *Nature* 375:397-399.
- Mc Mullen M D, P F Byrne, M E Snook, B R Wiseman, E A Lee, N W Windtrom and E H Coe (1998)** Quantitative trait loci and metabolic pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95:1996-2000.
- Mc Mullen M D, M E Snook, E A Lee, P F Byrne, H Kross, T A Musket, K Houchins and E H Coe (2001)** The biological basis of epistasis between quantitative traits loci for flavone and 3-deoxyanthocyanin synthesis in maize (*Zea mays* L.). *Genome* 44:667-676.
- Mol J, E Grotewold and R Koes (1998)** How genes paint flowers and seeds. *Trends in Plant Science* 3(5):212-217.



- Piazza P, A Procissi, G I Jenkins and C Tonelli (2002)** Members of the c1/pl1 regulatory gene family mediate the response of maize aleurone and mesocotyl to different light qualities and cytokinins1 plant physiology, 128: 1077–1086.
- Pooma W, C Gersos and E Grotewold (2002)** Transposon insertion in the promoter of the *Zea mays a1* gene differentially affect transcription by the Myb factors *P* and *Cl*. Genetics 161: 793-801.
- Poindexter C C (1903)** The development of the spikelet and grain of corn. The Ohio Naturalist 4 (1):3-9.
- Quattrocchio F, J F Wing, K van der Woude, J N M Mol and R Koes (1998)** Analysis of BHLH and MYB domain proteins: species specific regulatory differences are caused by divergent evolution of target anthocyanin genes. The Plant Journal 13(4):475-488.
- Rhoades M M (1952)** The effect of the bronze locus on anthocyanin formation in maize. American Naturalist 86:105-108.
- Sidorenko L V, X Li, S M Cocciolone, S Chopra, L Tagliani, B Bowen, M Daniels and T Peterson (2000)** Complex structure of a maize MYB gene promoter: functional analysis in transgenic plants. The Plant Journal 22(6):471-482.
- Snyder L H (1946)** The principles of heredity. D. C. Heath and Company. Boston, USA. 450 p.
- Stafford H A (1998)** Teosinte to maize: some aspects of missing biochemical and physiological data concerning regulation of flavonoids pathways. Phytochemistry 49(2):285-293.
- Van Der Walt W J and R A Brink (1969)** Geographic distribution of paramutable and paramutagenic R alleles in maize. Genetics 61: 677-695.
- Vedova C B D and K C Cone (2004)** Paramutation: the chromatin connection. The Plant Cell 16: 1358–1364.
- Vom Endt D, J W Kijne and Memelink (2002)** Transcription factors controlling plant secondary metabolism: what regulates the regulators?. Phytochemistry 61:107-114.
- Waller A E (1917)** Xenia and other influences following fertilization. Ohio Journal of Science 17 (8):273-284.



Weatherwax P (1919) Gametogenesis and fecundation in *Zea mays* as the basis of xenia and heredity in the endosperm. Bulletin of the Torrey Botanical Club. 46(3):73-90.

Zhang F and T Peterson (2005) Comparisons of maize *Pericarp color1* alleles reveal paralogous gene recombination and an organ-specific enhancer region. The Plant Cell (17): 903–914.

Zufall R A and M D Rausher (2003) The Genetic Basis of a Flower Color Polymorphism in the Common Morning Glory (*Ipomoea purpurea*). Journal of Heredity 94(6):442–448.



IV. VARIABILIDAD FENOTÍPICA ENTRE POBLACIONES DE MAÍZ CON DIFERENTES GRADOS DE PIGMENTACIÓN

RESUMEN

Uno de los caracteres que evidencian la variabilidad genética del maíz es el color del grano. Para estudiar la variación de tal característica y su comportamiento agronómico, 114 poblaciones nativas de diferentes estados de los Valles Altos Centrales de México, se caracterizaron visualmente por su color de grano y se clasificaron en 5 grupos. Los experimentos de campo se realizaron en Montecillo, México en 2003. Se establecieron cinco experimentos usando el diseño de bloques completos al azar, uno por grupo de color de grano, para evitar la interferencia del polen. Se tomó una muestra de tres mazorcas por parcela y el color de grano se registró de dos maneras: cuantitativamente, usando colorímetro (luminosidad, cromaticidad y tinte), y cualitativamente por su calificación visual, desde el blanco hasta el negro. Se midió la longitud y diámetro de la mazorca y del olote, número de hileras por mazorca; longitud, ancho y peso del grano, así como los días a floración masculina y femenina. El análisis multivariado de las cuatro variables del color permitió la clasificación de las 114 poblaciones en 6 grupos: blanco (28 poblaciones), amarillo (44), anaranjado (4), rojo (15), azul (18) y púrpura (5). Hubo diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre los grupos de color para los días a floración masculina y femenina, número de hileras por mazorca, longitud y ancho de grano, diámetro de mazorca y del olote; sin embargo, la longitud de la mazorca, el número de granos por hilera y el peso de grano por mazorca fueron similares entre grupos. Las poblaciones con granos pigmentados fueron precoces, de granos más grandes, con olotes angostos y con mayor diámetro de mazorca en relación al grupo blanco.

Palabras clave: maíz pigmentado, maíz azul, maíz rojo, componentes principales, agrupamiento por color de grano.



INTRODUCCIÓN

La variabilidad del maíz en México se ha clasificado hasta el momento en 59 razas, considerando caracteres morfológicos y polimorfismos de isoenzimas (Sánchez *et al.*, 2000) inclusive, algunas variantes se han estudiado con marcadores moleculares como los microsatélites (Santacruz *et al.*, 2004). Como variantes dentro de las razas se tienen tipos por su coloración de grano, el cual se determina por la presencia o ausencia de pigmentos como carotenoides en los granos amarillos (Egesel *et al.*, 2003), antocianinas y flobafenos en los azules o rojos (Irani *et al.*, 2003). Se han estudiado algunas razas de maíz en sus variantes de granos de colores rojo y azul, mediante el análisis de los valores de L, a y b, en granos enteros (Salinas *et al.*, 1999) y en harina (Salinas *et al.*, 2003), sin considerar el tinte y la cromaticidad. Para realizar un estudio colorimétrico se determinan las variables: luminosidad (L), que cuantifica la opacidad y oscila entre blanco y negro; la combinación de rojo y verde (a), y la combinación de amarillo y azul (b). Con las últimas dos variables se calculan el tinte (H) y la cromaticidad (C), parámetros que caracterizan objetivamente el color (McGuire, 1992). En este contexto, es necesario contar con una interpretación más completa de la variación del color y de ampliar este tipo de estudios en relación a la variabilidad del maíz pigmentado.

El objetivo del presente trabajo fue analizar la variación del color de grano de un grupo amplio de poblaciones con fines de clasificación, como estrategia previa al estudio de la estructura genética de poblaciones pigmentadas y con características agronómicas sobresalientes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron 114 poblaciones originarias de Chihuahua, Durango, Hidalgo, Querétaro, Veracruz, Estado de México, Morelos, Puebla, Tlaxcala, y Oaxaca; seleccionadas por su adaptación, rendimiento, precocidad y coloración de grano, sobresalientes en los Valles Altos Centrales de México. Tomando el color como



criterio, las poblaciones inicialmente se clasificaron subjetivamente en cinco grupos (blanco precoz, blanco intermedio, amarillo, rojo y azul) que se establecieron en el Campo Agrícola Experimental “Montecillo”, del Colegio de Postgraduados, durante el ciclo Primavera-Verano de 2003. En cada uno de los cinco experimentos se incluyeron las poblaciones de color de grano similar; se usó el diseño de bloques completos al azar, siendo la unidad experimental un surco de 5 m de largo y 0.8 m de ancho con 21 plantas. El número de repeticiones varió de 2 a 4. Respecto al manejo agronómico, no se controló la polinización considerando que el efecto de Xenia no es significativo sobre el color de la capa de aleurona (Cross y Alexander, 1984); se aplicaron cuatro riegos y la fórmula de fertilización 120-60-00. Se realizó control químico de arvenses en dos ocasiones. Se registró el número de días a la floración masculina (DFM) y femenina (DFF), cuantificado a partir de la siembra. A la cosecha se tomó una muestra de tres mazorcas por surco, representativas de la población, para medir las variables longitud y diámetro de mazorca (LMz y DMz), diámetro del olote (DOl); ancho del grano (AGr), longitud del grano (LGr), en cm, número de hileras por mazorca (HMz); número de granos por hilera (GrH); peso individual del grano (PiGr) y peso de grano por mazorca (PGrMz), en g. Se hizo una determinación colorimétrica y una calificación visual, de manera detallada con respecto a la clasificación inicial, del color de grano en dos bloques por experimento. La calificación visual (V) se hizo con la escala: 1 = blanco, 2 = crema, 3 = amarillo, 4 = anaranjado, 5 = morado, 6 = vino, 7 = gris, 8 = negro. Para el estudio colorimétrico se colocó una muestra de granos de cada una de las tres mazorcas en recipientes de plástico de 50 mL, para medir las variables L (luminosidad o brillo), a , y b con el equipo Hunter Lab Modelo 45/O (Hunter Associates Laboratory, Reston, VA.). Con a y b se calculó: **1)** el tinte ($H = \arctan \frac{b}{a}$), que es un valor angular que indica el cuadrante correspondiente al color de la muestra en un sistema cartesiano, donde el eje X corresponde a los valores de a y el eje Y a los de b (0° = color rojo-púrpura, 90° =



amarillo, 180° = azul-verdoso y 270° = azul) y **2)** la cromaticidad, que indica la intensidad o concentración del color predominante dentro del cuadrante (McGuire, 1992), se calculó con la fórmula: $C = \sqrt{a^2 + b^2}$. Con las variables de color de las 114 poblaciones (V, L, C y H) se construyó la matriz de datos y se hizo un análisis de conglomerados, considerando distancias euclidianas con el método del ligamiento promedio, determinando el número de grupos con el criterio cúbico de Sarle (Dallas, 2000); posteriormente se realizó un análisis de componentes principales; en ambos análisis los datos se estandarizaron con media = 0 y varianza = 1. Se hizo un análisis univariado de varianza para conocer el comportamiento agronómico de los grupos, aplicando el modelo estadístico: $Y_{ijk} = \mu + b_i + g_j + p_{k(j)} + \varepsilon_{ijk}$, donde b , g , y p , son los efectos de bloque, grupo y anidamiento de poblaciones dentro de grupos, respectivamente, utilizando para tales análisis el SAS[®], versión 6.11.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el análisis de conglomerados las 114 poblaciones se clasificaron en seis grupos. La dispersión de las poblaciones en el plano determinado por los dos primeros componentes principales delimitó los grupos (Figura 4.1).

Los dos primeros componentes (CP₁+CP₂) explicaron el 87% de la variación total; el CP₁ estuvo determinado en mayor grado por la luminosidad, la cromaticidad y la calificación visual del color de los granos y el CP₂ por su tinte (Cuadro 4.1). Es notoria la dispersión de las poblaciones dentro de cada grupo, indicando que existe variación cuantitativa para un mismo color de grano.

Con relación a la brillantez de los granos, expresada por los valores de luminosidad (L), en el Cuadro 4.2 se puede ver que el grupo de poblaciones de grano blanco (grupo 2) se caracterizó por tener el valor más alto (50.6), que corresponde al nivel de los grises en la escala de Cook (2000), donde el negro puro tiene un valor de 0 y el blanco puro de 100. De esta variable, las poblaciones de grano amarillo y anaranjado tuvieron valores de 32.1 y 27.7, respectivamente; es



decir, presentaron mayor opacidad con respecto a las de grano blanco, mientras que las de grano rojo, azul y púrpura mostraron valores (19.4, 21.6 y 13.7, respectivamente) cercanos al negro ($L = 0$). Los valores de luminosidad y la calificación visual de los granos tuvieron una relación inversa (Cuadro 4.2), es decir que ésta última variable al contrario de la primera tuvo valores crecientes

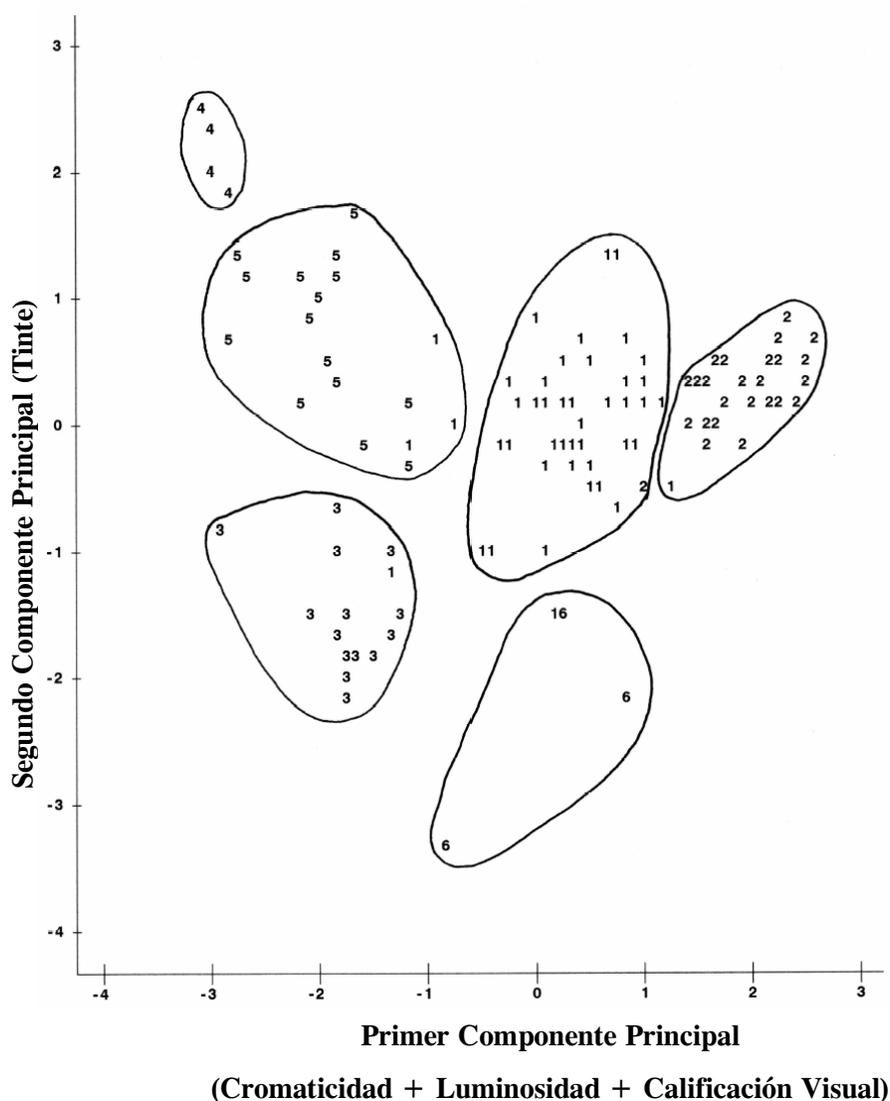


Figura 4.1. Dispersión de 114 poblaciones de maíz en el plano determinado por los dos primeros componentes principales. Grupos caracterizados por el color de grano: 1 = Amarillo, 2 = Blanco, 3 = Rojo, 4 = Púrpura, 5 = Azul, 6 = Anaranjado. Montecillo, México. 2003.



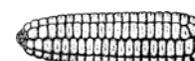
Cuadro 4.1. Vectores propios, varianza explicada y valores propios de los dos primeros componentes principales. Montecillo, México. 2003.

Vectores propios	CP₁	CP₂
Participación de las variables originales		
Luminosidad	0.572	0.124
Cromaticidad	0.594	0.077
Tinte	-0.116	0.989
Calificación visual	-0.551	0.003
Varianza explicada		
	0.63	0.24
Valores propios		
	2.52	0.98

CP₁ y CP₂ = Primero y segundo componentes principales.

desde el blanco hasta el color púrpura. Salinas *et al.* (1999) encontraron que para granos azules la luminosidad varió entre 24.6 y 41.0 y para granos rojos entre 13.1 y 37.4. En el presente estudio para los grupos azul y rojo la luminosidad fue de 15 a 27 y 15 a 23, respectivamente. De acuerdo al valor del tinte, las poblaciones de granos anaranjados y rojos tuvieron valores angulares que los ubican en el cuadrante rojo-amarillo; es decir, con ángulos menores a 90° (McGuire, 1992; Cook, 2000); los grupos restantes se ubicaron en el cuadrante amarillo-verde, comprendido entre 90° y 180°. Los valores de cromaticidad cercanos a 0 indican tonalidades intensas, valores mayores (hasta un límite de 60) indican tonalidades tenues; así, los grupos de grano blanco, amarillo y anaranjado presentaron tonalidades tenues y los grupos púrpura, azul y rojo mostraron tonos intensos (Cuadro 4.2), resultados consistentes con base en el primer componente principal (Figura 4.1).

Con la clasificación de las 114 poblaciones mediante el análisis multivariado de las variables colorimétricas L, C y H en los seis grupos señalados (Figura 4.1), fue posible conocer la variabilidad entre y dentro de grupos en cuanto al color predominante (H), concentración o pureza del color (C), y brillo (L) del grano. Esta



Cuadro 4.2. Variables del color de grano por grupo de poblaciones de maíz, con base en el análisis de conglomerados. Montecillo, México. 2003.

Grupo	NPG	V	L	C	H
2. Blanco	28	2.0 ± 0.2 [†]	50.6 ± 5.1	15.2 ± 1.6	95.4 ± 3.5
1. Amarillo	44	2.4 ± 0.6	32.1 ± 7.1	10.9 ± 1.4	96.1 ± 8.0
6. Anaranjado	4	4.0 ± 1.6	27.7 ± 4.0	11.3 ± 2.6	62.5 ± 13.3
3. Rojo	15	6.0 ± 1.0	19.4 ± 4.5	5.7 ± 1.1	75.7 ± 7.1
5. Azul	18	5.8 ± 1.4	21.6 ± 6.6	5.8 ± 1.5	108.5 ± 9.7
4. Púrpura	5	8.3 ± 0.2	13.7 ± 4.8	5.9 ± 1.3	134.0 ± 4.7

[†]Desviación estándar

NPG= Número de poblaciones por grupo

V = Calificación visual del color;

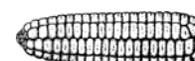
L = Luminosidad

C = Cromaticidad

H = Tinte.

metodología posibilita la detección de poblaciones con mayor contenido de pigmentos de interés nutraceutico como los carotenoides y las antocianinas de las poblaciones de grano amarillo y púrpura de los grupos 1 y 4, respectivamente. Yoshinaga *et al.* (1999) en *Ipomoea batatas* (L.) Lam, muestran las ventajas de la aplicación de esta metodología al seleccionar poblaciones con alto contenido de antocianinas relacionado con el color púrpura brillante de la pasta elaborada con este tubérculo.

Se ha encontrado dentro de la raza Chalqueño variados colores de grano, la cual fue calificada usando una escala visual (Herrera *et al.*, 2004); así, los resultados del presente estudio señalan la posibilidad de analizar la variabilidad del color con base en un análisis multivariado de los parámetros L, C y H de manera integral, sobre todo si existe el interés de establecer un programa de mejoramiento genético enfocado a la derivación de genotipos con mayor contenido de antocianinas y carotenoides, pigmentos de gran importancia en la nutraceutica (Egesel *et al.*, 2003; Irani *et al.*, 2003).



En el Cuadro 4.3 se puede ver que en todos los casos, el grupo 2 (blanco) superó ($P \leq 0.05$) a los otros grupos en la expresión de todos los caracteres estudiados, excepto en longitud de la mazorca, número de granos por hilera y peso de grano por mazorca, en las que no hubo diferencias significativas entre grupos.

Las poblaciones del grupo 2 (blanco) presentaron precocidad intermedia, olote grueso, mazorcas con más hileras y granos pequeños. Los grupos 1 y 3 (amarillo y rojo) mostraron valores estadísticamente similares ($P \leq 0.05$) pero menores al grupo de los blancos; los grupos 4 y 5 (púrpura y azul) de granos oscuros, se caracterizaron por su floración precoz, mazorca gruesa con olote angosto y granos más grandes; el grupo 6 (anaranjado) se distinguió por ser precoz, con las mazorcas de menor número de hileras y grano de tamaño medio. Según Mani *et al.* (2000), las variables: DMz, HMz y PGrMz tienen heredabilidad alta (mayor a 55 %), mientras que la correspondiente a la LMz es baja (15 %), lo que permite postular que en poblaciones de los grupos 2 y 4 existe el potencial genético para mejorar tales caracteres, principalmente las del grupo 4 que presentaron granos de mayor tamaño.

El grupo blanco se caracterizó por su floración masculina y femenina intermedias (81 y 86 días, respectivamente); en contraste, el grupo de granos azules presentó floraciones precoces (74 y 78 días). La precocidad es una característica ligada a las condiciones climáticas locales de donde provienen las poblaciones estudiadas, también fue un criterio de selección aplicado a esos genotipos durante su adaptación a los Valles Altos (Mendoza C M C y Ortiz C J, 2003; comunicación personal). Generalmente, las floraciones masculina y femenina de las poblaciones criollas de grano azul, cultivadas en los Valles Altos de la Mesa Central de México, varía entre 104 y 110 días, respectivamente (Arellano *et al.*, 2003; Herrera *et al.*, 2004). Sin embargo, la floración masculina de algunas variedades de grano azul derivadas de la raza Chalqueño oscila entre 80 y 86 días (Antonio *et al.*, 2004).



Cuadro 4. 3. Variables agronómicas de poblaciones de maíz agrupadas con base en el análisis multivariado del color de grano. Montecillo, México. 2003.

Grupo	DFM	DFF	LMz	DMz	DOI	HMz	GrH	LGr	AGr	PGrMz
2. Bco	81.2 a	86.5 a	11.9 a	4.1 b	2.5 a	15.5 a	24.1 a	0.80 c	0.85 c	83.3 a
1. Am	75.7 b	80.0 b	12.3 a	4.0 b	2.3 b	14.1 bc	25.0 a	0.88 bc	0.92 b	78.7 a
6. An	74.2 c	78.4 bc	11.1 a	4.0 b	2.3 b	13.3 c	23.8 a	0.89 bc	0.96 ab	78.4 a
3. Ro	75.7 b	80.0 b	11.7 a	4.2 ab	2.3 b	14.3 bc	24.2 a	0.96 ab	0.94 ab	82.0 a
4. Pu	75.3 bc	79.2 bc	11.8 a	4.4 a	2.3 b	14.3 bc	23.3 a	1.00 a	0.97 ab	80.0 a
5. Az	74.2 c	78.0 c	12.0 a	4.3 ab	2.3 b	13.7 bc	23.4 a	0.97 ab	1.00 a	79.4 a
DSH	1.2	1.6	1.16	0.25	0.13	0.88	2.1	0.12	0.06	21.3
CV (%)	2.3	3.0	13.7	8.7	8.0	8.7	12.7	20.0	10.0	12.0

Bco= Blanco
 Am= Amarillo
 An= Anaranjado
 Ro= Rojo
 Pu= Púrpura
 Az= Azul

LMz= Longitud de la mazorca (cm)
 DMz= Diámetro de la mazorca (cm)
 DOI= Diámetro del olote (cm)
 HMz= Número de hileras por mazorca
 GrH= Número de granos por hilera
 LGr= Longitud de grano (cm)
 AGr= Ancho del grano (cm)
 PGrMz= Peso del grano por mazorca

DFM= Días floración masculina
 DFF= Días a floración femenina
 DSH = Diferencia significativa honesta
 CV = Coeficiente de variación

Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

CONCLUSIONES

Los parámetros obtenidos con el colorímetro (luminosidad, tinte y cromaticidad) y su análisis multivariado, permitieron separar las 114 poblaciones en seis grupos de colores de grano: blanco (con 28 poblaciones), amarillo (con 44), anaranjado (con 4), rojo (con 15), azul (con 18) y púrpura (con 5).

Las características agronómicas que variaron significativamente entre grupos fueron: días a floración masculina y femenina, número de hileras por mazorca, largo y ancho del grano; así, las poblaciones pigmentadas fueron precoces, de grano grande, olote angosto y mazorcas anchas. En cambio, las variables longitud



de la mazorca, número de granos por hilera y peso de grano por mazorca, no difirieron significativamente entre grupos.

La metodología usada permitió conocer la diversidad genética entre poblaciones, al integrar en el análisis el color predominante (H), la concentración (C), y el brillo (L) del grano; por lo que se propone su aplicación para detectar poblaciones con el mayor contenido de pigmentos de interés nutracéutico, como los carotenoides y las antocianinas, de los grupos de amarillos y púrpura, 1 y 4, respectivamente, y que sean la base de los programas de mejoramiento genético para este fin.

LITERATURA CITADA

- Antonio M M, J L Arellano V, G García S, S Miranda C, J A Mejía C, F V Gonzáles C (2004)** Variedades criollas de maíz azul raza Chalqueño. Características agronómicas y calidad de semilla. *Revista Fitotecnia Mexicana* 27:9-15.
- Arellano V J L, C Tut C, A María R, Y Salinas M, O R Taboada G (2003)** Maíz azul de los valles altos de México. I. Rendimiento de grano y caracteres agronómicos. *Revista Fitotecnia Mexicana* 26:101-107.
- Cross H Z, W L Alexander (1984)** Effects of parents and planting dates on *R-nj* expression in maize. *Euphytica* 33: 577-582.
- Dallas E J (2000)** Métodos Multivariados Aplicados al Análisis de Datos. International Thompson Editores. México, D. F. 566 p.
- Cook R (2000)** A Guide to Understanding Color Communication. Grandville, MI, USA. 28 p.
- Egesel C O, J C Wong, R J Lambert, T R Rocheford (2003)** Combining ability of maize inbreds for carotenoids and tocopherols. *Crop Science* 43:818-823.
- Herrera C B E, F Castillo G, J J Sánchez G, J M Hernández C, R A Ortega P, M M Goodman (2004)** Diversidad del maíz Chalqueño. *Agrociencia* 38: 191-206.
- Irani N G, M Hernandez J, E Grotewold (2003)** Regulation of anthocyanin pigmentation. *Recent Advances in Phytochemistry* 37:59-78.
- Mani V P, N P Gupta, G S Bisht, R Singh (2000)** Genetic variance and heritability of some ear traits in prolific maize (*Zea mays* L.). *Crop Research* 20:217-220.



- McGuire R G (1992)** Reporting objective color measurements. *Horticultural Science* 27: 1254-1255.
- Salinas M Y, M Soto H, F Martínez B, V González H, R Ortega P (1999)** Análisis de antocianinas en maíces de grano azul y rojo provenientes de cuatro razas. *Revista Fitotecnia Mexicana* 22:161-174.
- Salinas M Y, F Martínez B, M Soto H, R Ortega P, J L Arellano V (2003)** Efecto de la nixtamalización sobre las antocianinas del grano de maíces pigmentados. *Agrociencia* 37: 617-628.
- Santacruz V A, M P Widrlechner, K E Ziegler, R J Salvador, M J Millard, P K Bretting (2004)** Phylogenetic relationships among North American popcorns and their evolutionary links to Mexican and South American popcorns. *Crop Science* 44:1456-1467.
- Sánchez G J J, M M Goodman, C W Stuber (2000)** Isozymatic and morphological diversity in the races of maize of México. *Economic Botany* 54:43-59.
- SAS Institute Inc. (1995)** SAS Language and Procedure: Usage, Version 6, First Edition. SAS Institute, Cary, NC, USA.
- Yoshinaga M, O Yamakawa, M Nakatani (1999)** Genotypic diversity of anthocyanin content and composition in purple-fleshed sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam. *Breeding Science* 49: 43-47.



V. ACUMULACIÓN DE ANTOCIANINAS EN PERICARPIO Y ALEURONA DEL GRANO Y SUS EFECTOS MATERNOS EN POBLACIONES CRIOLLAS DE MAÍZ PIGMENTADO

RESUMEN

En México existe amplia variabilidad genética y fenotípica del maíz para color de grano debido a las antocianinas y otros pigmentos. El presente estudio se hizo para estimar los efectos maternos (EM) y la aptitud combinatoria general (ACG) que inciden sobre el tamaño y la capacidad de almacenamiento de antocianinas del pericarpio y la aleurona del grano de la generación F₁ semilla, de las cruzas posibles entre seis poblaciones criollas de maíz pertenecientes a varios grupos basados en el color de grano: rojo-1 (grupo púrpura), azul-1 y azul-2 (grupo azul), rojo-2 (grupo rojo), amarillo (grupo amarillo) y blanco (grupo blanco). Se observó una relación entre el color del grano con el contenido de antocianinas por kg de grano (CA_{kg}) y antocianinas por mil granos. El progenitor rojo-1 presentó el mayor CA_{kg} (1269 mg kg⁻¹ de grano) del cual 90.2 % del pigmento se acumuló en el pericarpio, superando al azul-1 por 95.5 %. El análisis estadístico indicó diferencias significativas entre las 30 cruzas (directas y recíprocas) y los seis progenitores ($P \leq 0.05$) en el peso del pericarpio y del grano; contenido de antocianinas en el pericarpio, en la aleurona y en el grano (con valores referidos a 1000 granos) y en el CA_{kg}; grosor del pericarpio, de la aleurona y total del tejido de almacén (pericarpio+ aleurona). Los EM y de ACG tuvieron la mayor importancia sobre las características estudiadas, siendo los mejores progenitores el rojo-1 y el azul-1.

Palabras clave: antocianinas, capa de aleurona, efectos maternos, maíz pigmentado, pericarpio, nutraceutica, *Zea mays* L.



INTRODUCCIÓN

En México existe amplia variabilidad genética y fenotípica en las razas de maíz, incluyendo la variación en color del grano desde el blanco, amarillo, rojo hasta el negro, con diferente intensidad (Hernández X., 1985), como resultado de la selección practicada por grupos étnicos, con intereses alimenticios, religiosos y ornamentales (Johannessen *et al.*, 1970). Los granos amarillos contienen carotenoides, los rojos y negros, antocianinas, mientras que los blancos carecen de estos pigmentos (Ford, 2000). Actualmente se reconoce la relevancia nutraceutica de las antocianinas como antioxidantes, anticancerígenas y reductoras de triglicéridos y de colesterol (De Pascual y Sánchez, 2008). Aun cuando México es un país rico en maíces con este tipo de pigmentos, no se les ha dado la importancia como recurso genético para generar conocimiento específico que haga eficiente su aprovechamiento; por lo que no se cuenta con variedades mejoradas, tecnología de producción en campo y para su uso industrial, ni de su aprovechamiento nutraceutico (Antonio *et al.*, 2004). Bajo este contexto, para la implementación de un programa de mejoramiento de maíz con alto contenido de antocianinas, es necesario conocer los efectos genéticos y los componentes de varianza de las posibles poblaciones base (Suriyagoda y Peiris, 2007) de las cuales se formen progenitores apropiados para la obtención de híbridos o variedades (Shattuck *et al.*, 1993); para este propósito, los diseños dialélicos permiten analizar un sistema de cruzamientos entre posibles progenitores, en tres niveles: 1) la aptitud combinatoria general y específica, 2) los componentes de la varianza genética (aditividad o dominancia), y 3) la varianza aditiva (Wright, 1985). Particularmente, la ruta de biosíntesis de antocianinas en maíz involucra siete genes que codifican enzimas estructurales, seis genes que codifican factores de transcripción y dos genes codificadores de proteínas transportadoras del pigmento hacia las vacuolas (Cone, 2007), algunos de ellos con más de dos alelos por locus y que además presentan epistasis; sin embargo, tales genes se encuentran en diferentes cromosomas, indicando la ausencia de ligamiento (Ford, 2000). El



presente estudio se hizo con el propósito de evaluar los efectos maternos, los recíprocos y la aptitud combinatoria que inciden sobre el tamaño y la capacidad de almacenamiento de antocianinas en el pericarpio y la aleurona de granos formados en la generación F₁ semilla, derivada de las cruzas directas y recíprocas posibles entre seis poblaciones nativas de maíz de color de grano contrastado, desde el púrpura hasta el blanco. Se espera que la acumulación de antocianinas sea diferente entre las estructuras del grano dependiendo del color, y que al hacer las cruzas posibles entre las poblaciones sea significativa la influencia del progenitor materno sobre la acumulación de tales pigmentos, dependiendo de la constitución genética de la estructura correspondiente al grano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material genético y sitio experimental

Mediante análisis multivariado de componentes principales y de agrupamiento, se definieron seis grupos de poblaciones contrastados por su color de grano (Espinosa *et al.*, 2006), y de estos grupos se seleccionaron seis poblaciones similares en precocidad y porte, pero contrastadas en su color de grano: 1. Rojo-1 (grupo púrpura), población formada en el Colegio de Postgraduados para los Valles Altos de México (recombinación de una población Peruana de grano púrpura con otra de grano azul de Querétaro, México); 2. Azul-1 (grupo azul), de Tlaxcala; 3. Azul-2 (grupo azul, población de menor tonalidad), de Hidalgo; 4. Rojo-2 (grupo rojo), de Puebla; 5. Amarillo intenso (grupo amarillo), del Edo. de México; y 6. Blanco (grupo blanco), del Edo. de México. En el Campo Experimental del Colegio de Postgrados, en Montecillo, Texcoco, Edo. de México, se hicieron las cruzas de un dialélico completo y se incrementaron los seis progenitores. La siembra de cada población se hizo el 25 de mayo de 2004 en parcelas de dos surcos de 5 m de largo por 0.7 m de ancho, la distancia entre plantas fue de 25 cm. La fertilización, el riego y el control de maleza se hicieron



con base en las recomendaciones que se practican en la región (INIA, 1981). La cosecha (semilla F₁) se hizo en el mes de noviembre del mismo año.

Biomasa del grano y de sus componentes

De las 30 cruzas (15 directas y 15 recíprocas) y los seis progenitores se tomaron tres mazorcas y de la parte media de cada una se obtuvieron 25 granos, los cuales se humedecieron con agua destilada durante 3 h para separar el pericarpio (tejido de origen materno derivado del ovario) y la semilla (endospermo conteniendo la capa de aleurona, que es la de interés en este estudio, más el embrión). Los 25 granos disecados en sus componentes, se secaron por 24 h a 70 °C y se pesaron en una balanza analítica con precisión de 0.0001 g, para obtener el peso promedio del pericarpio por grano (P_{per} , en mg), el peso de semilla (P_{sem} , en mg) y el peso individual del grano (P_{grn} , en mg, como la suma de $P_{per} + P_{sem}$). Cada mazorca se consideró como una repetición.

Grosor de pericarpio y de aleurona

Para medir el grosor del pericarpio (G_{per}) y el de la aleurona (G_{ale}) se adaptó la metodología de Wolf *et al.* (1969), para lo cual se tomaron 3 granos de la parte media de cada una de tres mazorcas de cada craza y progenitor, y se humedecieron por 8 h para hacer cortes transversales semi-finos entre el ápice del escutelo y la corona del grano, bajo un microscopio estereoscópico Zeiss® con aumento de 10 X, usando una navaja metálica (Gillette®). Los cortes se colocaron en portaobjetos y se observaron en un microscopio óptico (Zeiss®) con aumento de 100 X. Se hicieron mediciones del G_{per} y G_{ale} en dos sitios al azar del lado opuesto al del embrión (Figura 5.1), que es donde se tiene la mayor concentración del pigmento, usando un micrómetro ocular. Con la suma de $G_{per} + G_{ale}$ se obtuvo el grosor total del tejido de síntesis y almacenamiento de antocianinas por grano (G_{tejaln}). Las unidades del micrómetro se transformaron a micras (μ).



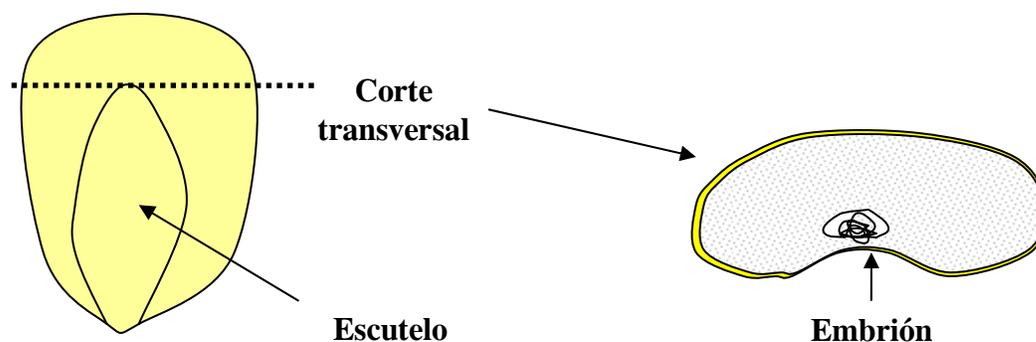


Figura 5.1. Diagrama correspondiente al corte transversal del grano para la medición del grosor del pericarpio y de la aleurona.

Contenido de antocianinas en el grano y sus componentes

El pericarpio y la semilla (endospermo con capa de aleurona + embrión) de los 25 granos por repetición se pulverizaron en un molino eléctrico (General Electric®, 0.25 HP, 1725 rpm) y las partículas se pasaron por una malla de 0.5 mm. La extracción de antocianinas totales se hizo a partir de 1 g de harina de la semilla que contenía la aleurona, y de 200 mg de harina de pericarpios. Se agregaron 25 mL y 5 mL, respectivamente, de solución de extracción (SE) compuesta con ácido clorhídrico (1N) y etanol de caña (96 °GL), en proporción 85:15 (v/v) con pH de 1.0. Las muestras se refrigeraron por 24 h a 4 °C y posteriormente la fase superior se decantó en tubos Corex y se centrifugó a 5000 rpm (1200 gravedades) por 20 min a 4°C (centrífuga Hettich EBA 12 R®, Germany). De cada repetición se tomaron tres submuestras de 250 µL del extracto y se colocaron en una microplaca de 96 celdas para determinar su absorbancia en un espectrofotómetro Multiskan (Ascent®, Thermo Electron Co., Finland), previamente calibrado con 250 µL de SE, a una longitud de onda de 540 nm, que es la que absorben mayormente las antocianinas. Al valor de la absorbancia de cada cruza y progenitor se le sustrajo el valor de la absorbancia del progenitor blanco, para eliminar la interferencia de cualquier compuesto diferente a las antocianinas. El contenido total de



antocianinas se calculó con base en la fórmula propuesta por Abdel-Aal y Hucl (1999):

$$A = (Ab / \xi) \times (Ve / 1000) \times PM \times (1 / Ph) \times 10^6,$$

A es la concentración de antocianinas, **Ab** es la absorbancia del extracto, ξ es el coeficiente de extinción de la cianidina 3-glucósido ($25965 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), **Ve** es el volumen total del extracto, **PM** es el peso molecular de la cianidina 3-glucósido (449), **Ph** es el peso total de la harina de cada muestra. El contenido total de antocianinas se expresó en $\text{mg } 1000^{-1}$ granos en pericarpio (A_{per}), en la capa de aleurona (A_{ale}), en el grano completo ($A_{\text{grn}} = A_{\text{per}} + A_{\text{ale}}$) y en mg kg^{-1} de grano (A_{kg}).

Análisis estadístico

Se hizo el análisis de varianza y la prueba de medias de Tukey de las variables de los progenitores, usando el sistema SAS para Windows versión 9. Debido a la amplitud de dispersión de los valores, que estuvo en correspondencia con la variación del color de las mazorcas, las variables A_{grn} , A_{per} , A_{ale} y A_{kg} fueron transformadas, con base en la propuesta de Edwards *et al.* (2001) que consiste en obtener la raíz cuártica del cociente del valor máximo observado con cada uno de los datos por variable. El análisis de varianza de todas las variables se hizo usando el algoritmo de Mastache y Martínez (2003), con el Modelo 1 y Método I de Griffing (1956); con ello, la variación entre las cruzas se partió en los correspondientes efectos principales de aptitud combinatoria general (ACG), efectos maternos de los progenitores (EM), los de interacción para aptitud combinatoria específica (ACE) y los efectos recíprocos (ER) en las cruzas:

$$Y_{ijk} = \mu + g_i + g_j + s_{ij} + m_i - m_j + r_{ij} + e_{ijk}$$

Y_{ijk} es la variable analizada, μ es la media común a las observaciones, g_i es el efecto de ACG del progenitor **i**, g_j es el efecto de la ACG del progenitor **j**, s_{ij} es el efecto de la ACE de la craza (**i,j**), m_i es el EM del progenitor **i**, m_j es el EM del



progenitor j , r_{ij} es el ER de la craza (i, j), e_{ijk} es el error aleatorio, considerando que se distribuye independientemente en forma aleatoria ($0, \sigma_e^2$).

La prueba de significancia entre los valores de ACG y EM entre progenitores se hizo calculando la varianza, como lo cita Griffing (1956), la cual se aplicó en el cálculo de una diferencia significativa (DSH):

$$ACG_{DSH} = [q_\alpha(p, GL_e)] \left[\sqrt{\left(\frac{p-1}{2rp^2} \right) (CME)} \right] \quad \text{y} \quad EM_{DSH} = [q_\alpha(p, GL_e)] \left(\sqrt{\frac{CME}{2r}} \right)$$

q_α es el cuantil para la prueba de Tukey con p progenitores, con los grados de libertad del error GL_e en el análisis de varianza y r número de repeticiones. CME es el cuadrado medio de error del análisis de varianza del Modelo I y Método I.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características de los progenitores

Pericarpio. Los granos de los progenitores azul-2, rojo-1 y rojo-2 tuvieron pericarpios pigmentados, desde trazas de rojo hasta púrpura; el pericarpio de los granos de los progenitores azul-1, amarillo y blanco no presentó antocianinas (Figura 5. 2).

Todas las poblaciones presentaron varias capas de células en el pericarpio, las cuales no se contaron. Su peso y proporción fueron mayores ($P \leq 0.05$) en el progenitor rojo-1 (40.3 mg por grano, que representa el 7.8 % del peso del grano), seguido del blanco (25.7 mg por grano) y menor e igual en los progenitores restantes (15.1 a 20.4 mg por grano) (Cuadro 5.1).

El G_{per} fue mayor ($P \leq 0.05$) en los progenitores rojo-1 (109.4 μ) y rojo-2 (107.2 μ), en comparación con los otros progenitores, siendo este último el que presentó mayor contribución al G_{tejaln} (73 %) (Cuadro 5.1). Wolf *et al.* (1969) e Ito y Brewbaker (1991) encontraron que el G_{per} en el lado opuesto al embrión fluctuó



desde 34 μ hasta 237 μ . En el presente estudio, el progenitor rojo-1 acumuló el mayor contenido de A_{per} (586.9 mg 1000⁻¹ granos) en comparación ($P \leq 0.05$) con los otros progenitores; en tanto que el azul-1, el amarillo y el blanco no acumularon este pigmento (Cuadro 5.2), aunque es posible que el azul-1 presentara otros compuestos que contribuyeron a la absorbancia del extracto y que no se determinaron. El azul-2 y el rojo-2 mostraron escaso contenido de A_{per} (de 1 a 6 mg 1000⁻¹ granos).

Estructura	Progenitor					
	Rojo-1	Rojo-2	Azul-1	Azul-2	Amarillo	Blanco
Pericarpio						
Aleurona						
Grano						

Figura 5.2. Colores del grano completo y sus estructuras (pericarpio y capa de aleurona) de seis poblaciones criollas de maíz, contrastadas en color de grano. Montecillo, México, 2004.

Siendo México un centro de origen y domesticación del maíz, se esperaría que dentro de las poblaciones criollas existan algunas con mayor grosor del pericarpio que el que mostraron las seis poblaciones estudiadas, lo cual significa que sería posible seleccionar aquellas con mayor tamaño (%) de este tejido, con el que se aumentaría el potencial de acumulación del pigmento en el grano.

Aleurona. La capa de aleurona presentó los colores blanco, amarillo, rojo, azul, y púrpura (Figura 5.2). El rojo-1 presentó variación, desde rojo hasta púrpura, ya que su constitución genética se derivó de la recombinación de una hembra de pericarpio y aleurona púrpuras con un macho de aleurona azul. En todos los



progenitores la aleurona consistió de una sola capa de células; sin embargo, existen mutantes con aleurona constituida con al menos dos capas de células cuyo grosor total varía de 50 a 120 μ (Nesticky y Piovarci, 1984). Sus colores rojo hasta púrpura indican la presencia de antocianinas y el amarillo de carotenoides (Ford, 2000). El mayor G_{ale} lo tuvo el rojo-1 (53 μ) y los demás progenitores fueron inferiores e iguales entre sí (36 a 40 μ). La proporción de la aleurona en el G_{tejal} del progenitor rojo-1 (32.6 %) fue similar a la del progenitor amarillo (31.4 %), pero difirieron cualitativamente en el tamaño del grano (Cuadro 5.1). Al respecto, Wolf *et al.* (1972) encontraron variación del G_{ale} de 25 μ a 52 μ . Esto indica que la capa de aleurona del progenitor rojo-1 fue relativamente gruesa y con células de mayor tamaño.

Cuadro 5.1. Biomasa y grosor de los tejidos de almacenamiento (pericarpio y capa de aleurona) y biosíntesis de antocianinas en el grano de seis poblaciones criollas de maíz de color de grano contrastados. Montecillo, México, 2004.

Prog	Peso (mg)		Grosor (μ)		
	Pericarpio	Grano	Pericarpio	Aleurona	G_{tejal}
Rojo-1	40.3a (7.8) ^ξ	514a (100) ^ξ	109.4a (67) ^ξ	53.0 a (33) ^ξ	162.5a (100) ^ξ
Rojo-2	20.4 b (4.6)	443a (100)	107.2a (73)	40.0 b (27)	147.3ab (100)
Azul-1	19.7 b (5.7)	341a (100)	89.9ab (69)	40.6 b (31)	130.5 bc (100)
Azul-2	15.1 b (4.7)	316a (100)	80.1 b (68)	36.8 b (32)	117.0 c (100)
Amarillo	17.1 b (5.4)	313a (100)	74.2 b (67)	35.7 b (33)	109.9 c (100)
Blanco	25.7ab (5.6)	454a (100)	85.5 b (69)	39.0 b (31)	124.5 bc (100)
DSH	18.0	257	21.1	10.4	24.4

Prog= Progenitor

DSH= Diferencia significativa honesta

G_{tejal} = Grosor de los tejidos de almacenamiento

Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

^ξLos valores entre paréntesis corresponden a la proporción del pericarpio con respecto al peso de grano, el grosor del pericarpio y de la aleurona con relación al G_{tejal} .



El contenido más alto de A_{ale} ($P \leq 0.05$) lo presentó el progenitor azul-1 (126.2 mg 1000⁻¹ granos), y su pericarpio fue incoloro; valores intermedios los presentaron el rojo-1 (63.6 mg 1000⁻¹ granos) y el azul-2 (47.8 mg 1000⁻¹ granos), siendo el progenitor rojo-2 el que acumuló la menor cantidad (19 mg 1000⁻¹ granos). Los progenitores de grano amarillo y blanco no sintetizaron antocianinas (Cuadro 5.2). Es evidente la falta de correspondencia entre el G_{ale} con su capacidad de síntesis del pigmento, ya que el progenitor azul-1 aún cuando presentó el mayor A_{ale} , no fue el de mayor grosor.

Cuadro 5.2. Contenido de antocianinas en pericarpio, en capa de aleurona y en grano completo de seis poblaciones criollas de maíz de colores contrastados. Montecillo, México, 2004.

Prog	Pericarpio			Grano	
	(mg 1000 ⁻¹ granos)			(mg kg ⁻¹)	
Rojo-1	586.9 (0.880 a) [‡]	63.6 (0.789 b) [‡]	650.6 (0.900 a) [‡]	1269.4 (0.914 a) [‡]	(100.0 %) [¶]
Rojo-2	6.0 (0.281 b)	19.0 (0.593 c)	25.1 (0.402 c)	57.0 (0.424 d)	(-95.5 %)
Azul-1	0.2 (0.122 cd)	126.2 (0.951 a)	126.5 (0.602 b)	371.7 (0.678 b)	(-71.0 %)
Azul-2	1.0 (0.178 bc)	47.8 (0.739 bc)	48.8 (0.471 c)	154.0 (0.542 c)	
Amarillo	0.0 (0.000 d)	0.0 (0.000 d)	0.0 (0.000 d)	0.0 (0.000 e)	
Blanco	0.0 (0.000 d)	0.0 (0.000 d)	0.0 (0.000 d)	0.0 (0.000 e)	
DSH	(0.130)	(0.158)	(0.119)	(0.109)	

Prog= Progenitor

DSH= Diferencia significativa honesta.

Valores con la misma letra en columnas, dentro del paréntesis, son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

[‡]Los valores entre paréntesis son los valores transformados con los cuales se hizo el análisis de varianza.

[¶]Los valores porcentuales indican la diferencia con respecto al progenitor rojo-1.



Grosor total del tejido de síntesis y almacenamiento de antocianinas. Las poblaciones de grano rojo-1 (162.5 μ) y rojo-2 (147.3 μ) presentaron el mayor G_{tejalm} , aunque difirieron en capacidad de biosíntesis y acumulación del pigmento (Cuadros 5.1 y 5.2). La variabilidad encontrada en el tamaño del pericarpio y de la aleurona (peso, grosor y proporción) indica la oportunidad de seleccionar poblaciones de maíz con mayor capacidad de almacenamiento de antocianinas, al considerar tales estructuras del grano en el proceso de mejoramiento genético. En este sentido, el progenitor rojo-1 tuvo mayor contenido de antocianinas (1269.4 mg kg⁻¹ de grano) las que principalmente se acumularon en el pericarpio (90.2 %), superando al azul-1 y demás progenitores en al menos 71 %. Se observó también una relación entre el color del grano con el contenido de pigmento por kg de grano, lo cual también lo reportan Abdel-Aal *et al.*, (2006) en maíces con diversos grados de coloración y usando la misma técnica de cuantificación de antocianinas (rojo-2, 50-70 mg kg⁻¹; azul-1, 196-322 mg kg⁻¹; y rojo-1, 1277 mg kg⁻¹ de grano). Salinas *et al.* (2003), encontraron que durante el proceso de nixtamalización del maíz las antocianinas del pericarpio se pierden más que las de la aleurona. Sin embargo, si el objetivo es la extracción del pigmento para usos industriales y nutraceuticos (Yang *et al.*, 2008), el progenitor rojo-1 sería el mejor ya que presentó el mayor contenido de antocianinas distribuido en el tejido de almacenamiento.

Análisis de varianza del modelo dialélico

Puesto que las poblaciones progenitoras se seleccionaron convencionalmente, con base en el color de grano y a los días a floración, de acuerdo a Espinosa *et al.* (2006), en el presente trabajo, se optó por usar el modelo de efectos fijos, descrito por Griffing (1956). En consecuencia, no existe una población base sobre la cual estimar los componentes de varianza genética, y sólo interesa la información genética de este conjunto particular de progenitores (Wright, 1985). Así, el análisis de las cruzas permite determinar la relevancia de los efectos maternos



(EM) en la progenie, lo cual es posible mediante la estructura de un diseño dialélico completo (Roach y Wulff, 1987).

El grano de maíz (cariópside) se compone de tres tejidos genéticamente distintos: el pericarpio diploide, totalmente materno; el endospermo triploide, producto de tres juegos de cromosomas, dos de la madre y uno del padre, y el embrión (esporofito), tejido diploide producto de la fusión de una célula huevo con una célula espermática (Gonzalo *et al.*, 2007). La presente investigación se enfocó en determinar la ACG del grosor y contenido de antocianinas en la capa de aleurona, ya que en la generación F₁ semilla estudiada, este tejido fue triploide, producto de la cruce de los progenitores, mientras que el pericarpio fue completamente de origen materno, lo que permitió determinar los EM del pericarpio y de la capa de aleurona. El análisis estadístico indicó diferencias significativas entre las 30 cruza y los seis progenitores ($P \leq 0.05$) en todas las variables estudiadas (P_{per} , P_{grn} , G_{per} , G_{ale} , G_{tejal} , A_{per} , A_{ale} , A_{grn} y A_{kg}) (Cuadro 5.3). También hubo significancia ($P \leq 0.05$) para la ACG en la mayoría de las variables, con excepción del G_{per} , G_{ale} y del G_{tejal} , lo cual es justificado porque el pericarpio proviene sólo del aporte genético de la madre; inclusive, su interpretación estadística es imprecisa porque la ACG se refiere a cualquier estructura fenotípica resultante de la combinación de gametos en una cruce (Griffing, 1956). El efecto sobresaliente de la ACG indica que el tipo de acción génica del contenido de antocianinas en las estructuras del grano F₁, fue en mayor magnitud la aditividad (Mahto y Ganguli, 2003).

Según Gilbert (1958), si el cuadrado medio debido a la ACG supera al de ACE, es factible predecir el comportamiento de los progenitores en sus cruza, de tal manera que aquellos progenitores con valores altos de ACG contribuyen en mayor medida en la expresión de la característica bajo estudio. También el efecto de la ACE fue significativo ($P \leq 0.05$) para todas las variables, excepto para P_{grn} . Adicionalmente, el EM fue significativo ($P \leq 0.05$) en casi todas las variables a



excepción del G_{ale} y el G_{tejalm} , lo que indica que hay mayor contribución de la madre en las cruzas. El ER sólo resultó significativo ($P \leq 0.05$) para el G_{tejalm} , por lo que las cruzas directa y recíproca no fueron equivalentes. La predominancia de los EM se determinó por la mayor magnitud de sus cuadrados medios (1.4 a 40.9 veces) con respecto a los de ER.

Cuadro 5.3. Cuadrados medios del análisis de varianza de la biomasa del grano, grosor del tejido de almacenamiento y contenido de antocianinas, en un dialélico completo entre seis poblaciones criollas de maíz de color de grano contrastado. Montecillo, México, 2004.

FV	Gl	P_{per}	P_{grn}	G_{per}	G_{ale}	G_{tejalm}	A_{per}	A_{ale}	A_{grn}	A_{kg}
Cruzas	35	0.09**	13.2*	4541.3**	551.0**	5931.3**	0.144**	0.200**	0.140**	0.158**
ACG	5	0.30**	47.0**	3204.2 ^{ns}	708.0 ^{ns}	5428.9 ^{ns}	0.594**	1.163**	0.715**	0.833**
ACE	15	0.06*	6.9 ^{ns}	3019.8**	497.8**	3365.1**	0.016**	0.019**	0.013**	0.013**
EM	5	0.12**	20.1**	12958.0*	672.2 ^{ns}	15812.3 ^{ns}	0.350**	0.153**	0.217**	0.225**
ER	10	0.01 ^{ns}	2.3 ^{ns}	3278.8**	491.4**	5091.3**	0.009 ^{ns}	0.008 ^{ns}	0.005 ^{ns}	0.006 ^{ns}
Error	72	0.03	7.0	469.6	86.1	603.0	0.005	0.007	0.003	0.004
$\frac{EM}{ER}$		12.0	8.6	4.0	1.4	3.1	38.1	17.6	40.9	36.1
CV		25.7	21.7	23.4	21.5	18.2	30.4	16.2	15.4	15.3

FV= Fuente de variación

Gl= Grados de libertad

CV= Coeficiente de variación

P_{per} = Peso del pericarpio

P_{grn} = Peso de grano

G_{per} = Grosor de pericarpio

G_{tejalm} = Grosor del tejido de almacenamiento de antocianinas

G_{ale} = Grosor de la aleurona

A_{per} = Contenido de antocianinas en el pericarpio de mil granos

A_{ale} = Contenido de antocianinas en la aleurona de mil granos

A_{grn} = Contenido de antocianinas en mil granos

A_{kg} = Contenido de antocianinas por kilogramo de grano

Todas las variables de contenido de antocianinas corresponden a valores transformados.

En G_{per} , en G_{ale} y en G_{tejalm} , los grados de libertad del error fueron igual a 396, por el mayor número de repeticiones. **= significancia al 1 % de error, ns= no significativo.



Efectos maternos y de aptitud combinatoria general

Los EM y la ACG tuvieron la mayor importancia relativa sobre la expresión de las variables estudiadas (Cuadro 5.3). El progenitor rojo-1 tuvo EM significativos ($P \leq 0.05$) sobre G_{per} , A_{per} , A_{grn} , y A_{kg} ; también de ACG de P_{grn} , A_{grn} y A_{kg} (Cuadro 5.4). Este progenitor tuvo valores similares ($P \leq 0.05$) de los EM en el G_{per} con el rojo-2, azul-1, azul-2 y con el amarillo; en A_{kg} fue similar ($P \leq 0.05$) al azul-1. Tanto el rojo-1 como el azul-1 presentaron valores altos de EM sobre A_{ale} .

Se ha señalado que para los EM existen tres clases: el efecto genético del embrión, el efecto genético del endospermo y el efecto fenotípico del tejido materno (óvulo) (Gonzalo *et al.*, 2007). La influencia de los EM sobre A_{ale} , P_{per} y P_{grn} no fue significativa (Cuadro 5.4), lo cual no coincide con el análisis de varianza (Cuadro 5.3). Esto se explica porque la prueba de medias de los valores de ACG y de EM se hizo en base a los valores observados y el análisis de varianza sobre los valores transformados. No obstante, el efecto significativo del EM indica que los genes responsables de la biosíntesis de antocianinas se expresaron en mayor magnitud al ser transmitidos por la madre, lo cual fue reportado por Fujii y Kuwada (1916) como efecto del doble número de cromosomas que aporta el progenitor materno, con respecto al progenitor paterno que aporta un solo juego de cromosomas para desarrollar el endospermo triploide. Este efecto de dosis también lo reportaron Larson *et al.*, (1986) al estudiar el gen *Pr*, que codifica la enzima flavonoide-3'-hidroxilasa, ya que al aumentar el número de alelos dominantes (de cero a tres) en la estructura genética del endospermo del maíz, se produce mayor cantidad de cianidina-3-glucósido. Sin embargo, Sokolov (2006) indica que este fenómeno no está en concordancia con las reglas Mendelianas, donde se supone una expresión igual de los genes al transmitirse maternalmente o paternalmente a la progenie; en cambio, señala que los estudios recientes de tipo molecular explican que el efecto de la madre sobre el grano con pigmentación de



Cuadro 5.4. Valores de los efectos maternos y de la aptitud combinatoria general sobre las características morfológicas del grano y acumulación de antocianinas de seis poblaciones criollas de maíz contrastantes en color de grano. Montecillo, México, 2004.

Pro	EM [‡]						ACG [‡]					
	G _{per}	P _{per}	P _{grn}	A _{per}	A _{ale}	A _{grn}	A _{kg}	P _{grn}	A _{ale}	A _{grn}	A _{kg}	
Rojo-1	9.7 a	3.0	29.6	90.0 a	12.9	103.0 a	244.1 a	25.5 a	15.5 b	177.4 a	365.5 a	
Rojo-2	0.4 a	-1.3	6.1	-29.1 b	-6.9	-36.1 b	-86.7 b	30.9 a	-2.2 c	-23.1 b	-52.8 b	
Azul-1	2.1 a	1.2	8.1	-9.5 b	11.8	2.3 b	-1.3 a	-6.4 a	31.6 a	-7.7 b	14.0 b	
Azul-2	9.9 a	-1.4	-40.5	-26.5 b	-8.6	-35.2 b	-81.1 b	-52.6 b	4.2 b	-21.8 b	-26.3 b	
Amarillo	10.9 a	-1.6	-10.8	-11.2 b	-4.5	-15.8 b	-38.9 b	-31.2 b	-24.4 d	-63.1 c	-147.5 c	
Blanco	-11.4 b	0.1	7.4	-13.5 b	-4.6	-18.1 b	-35.8 b	33.6 a	-24.6 d	-61.6 c	-152.8 c	
DSH	17.8	9.5 ^{ns}	140.0 ^{ns}	115.6	36.6 ^{ns}	108.7	246.0	52.1	13.6	40.5	91.6	

DSH=Diferencia mínima significativa (Griffing, 1956)

G_{per}= Grosor de pericarpio

P_{per}= Peso del pericarpio

P_{grn}= Peso de grano

A_{per}= Contenido de antocianinas en el pericarpio de mil granos

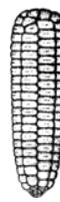
A_{ale}= Contenido de antocianinas en la aleurona de mil granos

A_{grm}= Contenido de antocianinas en mil granos

A_{kg}= Contenido de antocianinas por kilogramo de grano

‡Los valores del ACG y EM del contenido de antocianinas se calcularon con los valores observados

Valores en columna con la misma letra son iguales estadísticamente (Tukey, $\alpha=0.05$)



la aleurona, se debe a la “impresión alélica”, ya que la mayor expresión de algunos alelos de los genes depende del progenitor que los transmite.

Los resultados del presente trabajo, aportan conocimientos de genética cuantitativa, como los efectos aditivos y maternos, que apoyan los criterios a considerar en el mejoramiento genético del maíz por selección, con fines de aumentar la producción de antocianinas por unidad de superficie.

CONCLUSIONES

El pericarpio y la capa de aleurona constituyeron el tejido de biosíntesis y almacenamiento de antocianinas.

En el progenitor rojo-1, además de la capa de aleurona, el pericarpio acumuló la mayor cantidad del pigmento.

El tamaño de la biomasa, grosor y proporción del pericarpio y de la aleurona varió entre progenitores, sin relacionarse con el contenido de antocianinas en el grano; no obstante, el contenido total de antocianinas estuvo relacionado con el color de grano, de tal forma que los más oscuros tuvieron la mayor concentración de pigmento con base en el número y peso de grano.

El tamaño de la capa de aleurona y su contenido de antocianinas, en la generación F₁ semilla, varió entre cruzas por efecto de la aptitud combinatoria general (ACG) y los efectos maternos (EM), principalmente. Sin embargo, en las características del pericarpio predominaron los EM.

Los efectos aditivos (ACG) y EM explicaron el contenido de antocianinas en el grano y de sus componentes morfológicos.



LITERATURA CITADA

- Abdel-Aal E S M and P Hucl (1999)** A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chemistry* 76 (3): 350–354.
- Abdel-Aal E S M, J C Young, I Rabalski (2006)** Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 4696-4704.
- Antonio M M, J L Arellano V, G García de los S, S Miranda C, J A Mejía C y F V González C (2004)** Variedades criollas de maíz azul raza chalqueño: características agronómicas y calidad de semilla. *Revista Fitotecnia Mexicana* 27 (1): 9 – 15.
- Cone K C (2007)** Anthocyanin synthesis in maize aleurone tissue. *Plant Cell Monographs* 8: 121-139.
- De Pascual T S and M T Sánchez B (2008)** Anthocyanins: from plant to health. *Phytochemistry Review* 7: 281–299.
- Edwards J, D Stoltzfus, P A Peterson (2001)** The *C1* locus in maize (*Zea mays* L.): effect on gene expression. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 718–724.
- Espinosa T E, Ma del C Mendoza C y F Castillo G (2006)** Diversidad fenotípica entre poblaciones de maíz con diferentes grados de pigmentación. *Revista Fitotecnia Mexicana* 29 (Número especial 2): 19-23.
- Ford R H (2000)** Inheritance of kernel color in corn: explanations and investigations. *The American Biology Teacher* 62 (3): 181-188.
- Fujii K and Kuwada (1916)** On the composition of factorial formula for zygotes in the study of inheritance of seed characters of *Zea mays* L. with notes on seed pigments. *The botanical Magazine* 30 (351): 83-88.
- Gilbert N E G (1958)** Diallel cross in plant breeding. *Heredity* 12: 477–492
- Gonzalo L M, T J Vyn, J B Holland and L M McIntyre (2007)** Mapping reciprocal effects and interactions with plant density stress in *Zea mays*. *Heredity* 99: 14–30.
- Griffing B (1956)** A generalized treatment of the use of diallel crosses in quantitative inheritance. *Heredity* 10: 31-50.



- Hernández X E (1985)** Maize and man in the greater southwest. *Economic Botany* 39 (4): 416-430.
- INIA (1981)** Guía para la asistencia técnica agrícola. Valle de México. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Campo Agrícola Experimental Valle de México, Chapingo, Edo. de México. 135 p.
- Ito G M and J L Brewbaker (1991)** Genetic analysis of pericarp thickness in progenies of eight corn hybrids. *Journal of the American Society of Horticultural Science* 116 (6): 1072-1077.
- Johannessen C L, M R Wilson, W A Davenport (1970)** The domestication of maize: process or event?. *Geographical Review* 60 (3): 393-413.
- Larson R, J B Bussard and E H Coe (1986)** Gene dependent flavonoid 3'-hidroxilación in maize. *Biochemical Genetics* 24(7-8):615-624.
- Mahto R N and D K Ganguli (2003)** Combining ability analysis in inter varietal crosses of maize (*Zea mays* L.). *Madras Agricultural Journal* 90 (1-3): 29-33.
- Mastache L A A y A Martínez G (2003)** Un algoritmo para el análisis, estimación y predicción de experimentos dialélicos balanceados. *Revista Fitotecnia Mexicana* 26 (3) 191-200.
- Nesticky M and Piovarci A (1984)** Influence of aleurone thickness on lysine content of maize kernels. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung* 92 (2): 173-176.
- Roach D A and R D Wulff (1987)** Maternal effects in plants. *Annual Review of Ecological Systems* 18: 209-235.
- Salinas M Y, F Martínez B, M Soto H, R Ortega P, y J L Arellano V (2003)** Efecto de la nixtamalización sobre las antocianinas del grano de maíces pigmentados. *Agrociencia* 37: 617-628.
- Shattuck V I, B Christie and C Corso (1993)** Principles for Griffing's combining ability analysis. *Genetica* 90: 73-77.
- Sokolov V A (2006)** Imprinting in plants. *Russian Journal of Genetics* 42 (9): 1043-1052.
- Suriyagoda L D B and B L Peiris (2007)** Estimating genetic parameters from diallel experiments using SAS/IML. *Sri Lankan Journal of Applied Statistics* 8: 83-94.



Wolf M J, I M Cull, J L Helm, M S Zuber (1969) Measuring thickness of excised mature corn pericarp. *Agronomy Journal* 61: 777-779.

Wolf M J, H C Cutler, M S Zuber and U Khoo (1972) Maize with multilayer aleurone of high protein content. *Crop Science* 12: 440-442.

Wright A J (1985) Diallel designs, analyses, and reference populations. *Heredity* 54: 307-311.

Yang Z, G Fan, Z Gu, Y Han, Z Chen (2008) Optimization extraction of anthocyanins from purple corn (*Zea mays* L.) cob using tristimulus colorimetry. *European Food Research Technology* 227 (2): 409-415.



**VI. APTITUD COMBINATORIA DEL RENDIMIENTO DE
ANTOCIANINAS Y DE CARACTERÍSTICAS AGRONÓMICAS EN
POBLACIONES CRIOLLAS DE MAÍZ PIGMENTADO**

RESUMEN

Los maíces de granos rojos, azules y púrpuras contienen antocianinas de gran importancia en la prevención de enfermedades humanas. La selección por color ha transcurrido con la domesticación del maíz en México y se considera relevante en la actualidad. Para lograr la definición de metodologías eficientes de selección se necesita la aplicación de diseños genéticos que permitan calcular la contribución genética en la variación cuantitativa de la característica de interés. Este estudio se enfocó al uso del diseño genético de Griffing para conocer los efectos de aptitud combinatoria general (ACG) y específica (ACE), maternos (EM) y recíprocos (ER) de la concentración de antocianinas por unidad de peso de grano (CA_{kg}) y el rendimiento de antocianinas por unidad de superficie (RA_{ha}). Se estableció un experimento de cruza dialélicas entre cinco poblaciones criollas contrastadas en su color de grano, donde se midieron variables agronómicas. En otro experimento se obtuvo la semilla F_2 , con polinización controlada, para medir la concentración de antocianinas en el grano completo. Con base en los dos experimentos se calculó el rendimiento de antocianinas por planta (RA_{pta}), el RA_{ha} y la heterosis. Hubo semejanza entre progenitores en las variables agronómicas pero difirieron en su capacidad de acumular antocianinas. Los efectos de ACG fueron superiores en la mayoría de las características agronómicas con respecto a la ACE. El RA_{pta} presentó efectos significativos de ACG, ACE y ER, siendo la población rojo-1 la de mayor ACG. Hubo heterosis entre cruza para CA_{kg} , las mejores fueron rojo-1 x rojo-2, rojo-1 x azul-1 y rojo-1 x azul-2; y para RA_{ha} las mejores fueron rojo 1 x rojo-2 y rojo-1 x azul-2. Con base en estos resultados se propone hacer mejoramiento genético para rendimiento de antocianinas con metodologías de selección e hibridación.

Palabras clave: antocianinas, aptitud combinatoria, heterosis, maíz criollo.



INTRODUCCIÓN

Una amplia variación genética en sus características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas, aunadas a su adaptabilidad, han permitido la selección de maíces para usos especiales (Pajic, 2007). Por varias décadas el objetivo primario de los programas de fitomejoramiento de maíz ha sido el incremento en la productividad y rendimiento de grano; en los lustros recientes se le está dando atención al desarrollo de variedades mejoradas que incorporen tanto composición como concentración de compuestos fenólicos, antocianinas, carotenoides, glucosinolatos y fitoestrógenos, relevantes en el mejoramiento de la salud humana (Della Pena, 1999), acentuado por el hecho de que los fitoquímicos (nutracéuticos) presentan una demanda mundial creciente (Basu *et al.*, 2007). El interés por el grano de maíz pigmentado se debe al contenido de varios compuestos de importancia nutracéutica, tales como las antocianinas y los ácidos fenólicos, que son antioxidantes y antimutagénicos (Pedreschi y Cisneros, 2006). Particularmente, el color del grano se ha seleccionado por los mesoamericanos durante la domesticación del maíz, dando lugar a las variantes: negro, púrpura, café, rojo, anaranjado, amarillo, blanco y variegados, que se usan en alimentos y en ocasiones especiales (Johanneseen, 1982).

Para que la selección sea eficaz, es necesario conocer los parámetros genéticos (heredabilidad, varianzas genéticas y correlaciones genéticas) de las características en las poblaciones, que se calculan mediante el análisis estadístico de datos fenotípicos de las progenies (Dekkers y Hospital, 2002). Existen varios diseños genéticos apropiados para calcularlos (Suriyagoda y Peiris, 2007). Especialmente, el esquema de cruza dialélicas permite estudiar el control genético de características cuantitativas, mediante la valoración de la aptitud combinatoria general (ACG) y específica (ACE), así como analizar su heterosis (Shattuck *et al.*, 1993).

En maíces de grano púrpura, azul, rojo y blanco, es nula la información publicada sobre la aptitud combinatoria del contenido de antocianinas en el grano, aun



cuando tales pigmentos tienen importancia nutraceutica. Los estudios pioneros de la pigmentación del grano de maíz por antocianinas consistieron en determinar su herencia desde el enfoque Mendeliano (Shull, 1911; East, 1912; Emerson, 1912). Sin embargo, a través de la investigación se encontró que no todos los alelos del color del grano segregan de manera predecible y en proporciones precisas (Coulter, 1920; Lindstrom, 1923). Entre las razones por las cuales se presenta variación en el color del grano están: efectos maternos (Fujii y Kuwada, 1916; Larson *et al.*, 1986), influencia de transposones (Peterson, 2005, Krishnaswamy, 2007), la ocurrencia de fenómenos epigenéticos (Alleman *et al.*, 2006, Henderson y Jacobsen, 2007) y cambios sutiles a nivel transcripcional de los genes de la ruta biosintética (Singh, 1998).

En un trabajo previo, Espinosa *et al.* (2008) reportan que el contenido de antocianinas en carióspsides de maíz de cruzamientos F_1 , estuvo influido por los efectos maternos y aditivos, principalmente, y que los efectos de dominancia no fueron relevantes. Para darle continuidad al estudio del contenido de antocianinas en maíz, este trabajo tuvo como objetivo la estimación de la aptitud combinatoria (ACG y ACG) del rendimiento de antocianinas y otras características de interés agronómico, en la generación F_2 de las cruza posibles (directas y recíprocas) entre poblaciones criollas contrastadas en color de grano. Se espera que los progenitores de grano de color rojo y azul manifiesten alta ACG y que se presenten efectos maternos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio experimental y material genético

Se estudió la generación F_2 semilla de las cruza posibles (directas y recíprocas) entre cinco poblaciones criollas de maíz, como representativas de los grupos delimitados en el estudio de Espinosa *et al.* (2006), con el propósito de explorar diferentes grados de coloración y contenido de antocianinas en el grano (Espinosa



et al., 2008), las cuales son: rojo-1 (del grupo púrpura), azul-1 (del grupo azul), azul-2 (del grupo azul), rojo-2 (del grupo rojo) y blanco (del grupo blanco).

Estudio agronómico

Con las semillas de la generación F₁ de las 20 cruzas posibles y los cinco progenitores, se estableció un experimento en el Campo Experimental del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, en el Edo. de México, con fecha de siembra el 12 de mayo de 2005. De cada material genético se sembraron dos surcos de 5 m de longitud con 21 plantas cada uno, bajo un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones. El manejo agronómico se hizo de acuerdo con las recomendaciones de la región.

Se midieron las siguientes variables: días a floración masculina (DFM) y femenina (DFF), altura de la planta (ALT, en cm), número de mazorcas por planta (NMzP), calculado con base en el número de mazorcas cosechadas/número de plantas en competencia completa por parcela; número de hileras por mazorca (NHMz), número de granos por hilera (NGH), número de granos por mazorca (NGMz=NHMz x NGH), peso individual del grano (PIG, estimado del peso de tres muestras de 500 granos por parcela), rendimiento de grano por planta (RGP=NMzP x NGMz x PIG, en g) y el rendimiento de grano por hectárea (RG_{ha}=RGP x DEN, en ton ha⁻¹, siendo DEN la densidad de población de 50 000 pta ha⁻¹).

Estudio bioquímico

Se establecieron las cruzas y los progenitores en dos lotes diferentes, uno se sembró el 12 de mayo de 2005, en un terreno de suelo franco arcilloso; el segundo lote se sembró el 27 de mayo del mismo año, en suelo franco arenoso, con dimensiones de unidad experimental similares entre lotes, con una repetición. En estos dos lotes y en cada unidad experimental se hicieron manualmente de 15 a 20 polinizaciones fraternales, permitiendo la segregación de la generación F₂ semilla.



En ambos lotes las mazorcas se desgranaron mezclando los granos de las plantas dentro de cada parcela, luego se tomó una muestra aleatoria de 1000 granos de cada cruce y progenitor. En cada muestra se separaron y contaron los granos por clases (tonalidades) de color, dada la segregación presente en esta generación filial; posteriormente se calcularon las frecuencias relativas (%) de cada clase de grano.

Para la cuantificación de antocianinas, que se hizo en el Laboratorio de Calidad del Maíz del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP-CEVAMEX), se tomaron tres muestras aleatoriamente de 40 g de grano de cada cruce y progenitor, con 12 % de humedad. Los granos se molieron con un molino eléctrico tipo ciclón (Cyclone® Sampler Mill. UD Co., Colorado, U.S.A) colectando la harina que pasó la malla de poros de 0.5 mm de diámetro. La harina se conservó en congelación (< 0 °C) en sobres de papel hasta su análisis. Previo a la extracción de antocianinas, las muestras de harina se secaron en una estufa a 60 °C durante 24 h; de cada una se tomó una submuestra de 5 g con la ayuda de una balanza granataria y se colocó en un matraz Erlenmeyer de 125 mL. Se agregaron 20 mL de solución de extracción (SE) compuesta de ácido Trifluoracético (TFA, Sigma®) al 1% en metanol grado reactivo (Baker®), dejándose en refrigeración durante 24 h. Pasado este tiempo se midió el volumen del sobrenadante y se tomó del mismo, una alícuota de 5 mL para filtrarse en papel Watman® No. 5; el filtrado se diluyó 3 veces con la SE y se tomaron 3 mL para medir su absorbancia en celdas de cuarzo a 520 nm (Abs_{520}) y 700 nm (Abs_{700}), simultáneamente, en un espectrofotómetro (Perkin Elmer®).

Se hizo una segunda extracción agregando 20 mL de solución al residuo de harina en el mismo matraz; se aplicó el mismo procedimiento hasta determinar la absorbancia del extracto. Para conocer el contenido total de antocianinas, a la absorbancia de cada muestra y de cada repetición se le sustrajo la absorbancia de la turbidez (Abs_{700}) y la absorbancia del extracto del grano blanco ($Abs_{\text{grano blanco}}$) para contrarrestar la interferencia de otros compuestos diferentes a las



antocianinas, quedando: $Abs_{ajustada} = Abs_{520} - Abs_{700} - Abs_{grano\ blanco}$. Con el valor de $Abs_{ajustada}$ se determinó el contenido total de antocianinas por unidad de volumen (AT, mg L⁻¹) mediante la aplicación de una ecuación de regresión de una línea patrón [$AT = (Abs_{ajustada} \times 0.0636) - (0.0014)$, $R^2 = 0.999$], calibrada con diferentes concentraciones de pelargonidina clorada (Sigma®). El contenido de pigmento por unidad de peso (CA_{kg} , en mg kg⁻¹ de grano) en cada una de las dos extracciones se determinó con la aplicación de la ecuación siguiente:

$$CA_{kg} = \frac{(1000)(A)}{\left[\left(\frac{Pm}{Ve} \right) (1000) \right]} (Fd)$$

Pm es el peso de la muestra de harina (g), **Ve** es el volumen del extracto (mL), **Fd** es el factor de dilución. El contenido total de antocianinas resultó de la suma de las dos extracciones, con base al grano entero (pericarpio + aleurona).

Rendimiento de antocianinas por unidad de superficie

Con el promedio del CA_{kg} se calculó el rendimiento de antocianinas por planta (RA_{pta}), con base en el rendimiento de grano estimado en el estudio agronómico, con plantas manejadas bajo polinización libre, así: $RA_{pta} = (RGP \times A_{kg}) / 1000$. Con este valor se estimó el rendimiento potencial de antocianinas por unidad de superficie (RA_{ha} , kg ha⁻¹), considerando la densidad de plantas y el rendimiento de pigmento por planta, como sigue: $RA_{ha} = (RA_{pta})(DEN)$.

Se calculó la heterosis (He) y heterobeltiosis (Hb) en las variables CA_{kg} y RA_{ha} de la siguiente manera (Hochholdinger y Hoecker, 2007):

$$He = \left(Cruza - \left[\frac{P_1 + P_2}{2} \right] \right) (100) \text{ y } Hb = (Cruza - P_m) (100)$$

P₁ y **P₂** son los progenitores de la craza, **P_m** es el mejor progenitor en la característica de interés.



Análisis estadístico

El análisis estadístico para las variables DFM, DFF, ALT, NMzP, NGMz, PIG, RG_{ha} y RA_{pta}, en el arreglo de cruzas dialélicas, se calculó con base en el algoritmo computacional planteado por Mastache y Martínez (2003) correspondiente al Modelo I y Método I de Griffing (1956):

$$Y_{ijk} = \mu + g_i + g_j + s_{ij} + m_i - m_j + r_{ij} + e_{ijk}$$

Y_{ijk} es la variable analizada, μ es la media común a las observaciones, g_i es el efecto de ACG del progenitor i , g_j es el efecto de la ACG del progenitor j , s_{ij} es el efecto de la ACE de la craza (i,j), m_i es el EM del progenitor i , m_j es el EM del progenitor j , r_{ij} es el ER de la craza (i,j), e_{ijk} es el error aleatorio, considerando que se distribuye independientemente en forma aleatoria ($0, \sigma_e^2$).

La prueba de significancia entre los valores de ACG y EM de los progenitores se hizo calculando la varianza, como lo cita Griffing (1956), la cual se aplicó en el cálculo de una diferencia significativa (DSH):

$$ACG_{DSH} = [q_\alpha(p, Gle)] \left[\sqrt{\left(\frac{p-1}{2rp^2}\right)(CME)} \right] \quad \text{y} \quad EM_{DSH} = [q_\alpha(p, Gle)] \left(\sqrt{\frac{CME}{2r}} \right)$$

q_α es el cuantil para la prueba de Tukey con p progenitores, con los grados de libertad del error Gle en el análisis de varianza y r número de repeticiones. CME es el cuadrado medio del error del análisis de varianza del Modelo I y Método I.

Se hizo un análisis de varianza y la prueba de medias de Tukey para CA_{kg} y RA_{ha} de las cruzas, con un modelo completamente al azar con seis y tres repeticiones, respectivamente, mediante el sistema SAS® para Windows versión 9.0.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características de los progenitores

En el Cuadro 6.1 se observa que sólo existieron diferencias significantes ($P \leq 0.05$) entre los progenitores en el caso de las variables NMzP, PIG, RA_{pta} y CA_{kg}; en cambio, para el resto de las variables DFM, DFF, ALT, NHMz, NGH, NGMz y RG_{ha} no se presentaron diferencias. Aún cuando hubo diferencias entre las poblaciones en dos componentes morfológicos del rendimiento (NMzP y PIG), éstas no tuvieron impacto en el RG_{ha}. Se sabe que el rendimiento de grano depende en mayor magnitud del número de granos por planta y en menor magnitud del peso individual de grano (Maddoni y Otegui, 2006). Esto significa que al no haber diferencias en el número de granos por mazorca, el RG_{ha} no varió significativamente. Se considera que el número máximo de granos por mazorca en híbridos de maíz para obtener un alto rendimiento de grano, oscila entre 600 y 700 (Ritchie y Alagarswamy, 2003) por lo que las poblaciones criollas estudiadas presentaron valores aún bajos para este carácter, ya que fueron seleccionadas por uniformidad en el porte de la planta, por el período de floración y color contrastante de grano (Espinosa *et al.*, 2006) pero no necesariamente por rendimiento de grano alto; con estos resultados se corrobora que la diferencia entre los progenitores se centró en el color de grano.

Para la RA_{pta} y CA_{kg}, la población rojo-1 presentó los valores más altos (43.5 mg pta⁻¹ y 377.0 mg kg⁻¹, respectivamente). También se observa que la producción de antocianinas no presenta asociación con los valores de los componentes del rendimiento y de las características fenológicas, lo que brinda la oportunidad de formar variedades e híbridos con características agronómicas aceptables sin alterar la concentración del pigmento (Cuadro 6.1).

En relación a esto, Antonio *et al.* (2004) al evaluar poblaciones criollas de grano azul, pertenecientes a la raza Chalqueño, para las características agronómicas encontraron una amplia variabilidad fenotípica entre ellas, esto permite practicar selección en programas de mejoramiento genético.



Cuadro 6.1. Características agronómicas, componentes del rendimiento y contenido de antocianinas en cinco poblaciones criollas de maíz estudiadas en el experimento dialélico. Montecillo, Edo. de México, 2005.

Prog	DFM	DFE	ALP	NMzP	NHMz	NGH	NGMz	PIG	RG _{ha}	RA _{pta}	CA _{kg}
R1	80 a	83 a	210 a	1.6 a	12.7 a	22 a	277.0 a	253 a	5.7 a	43.5 a	376.9 a
R2	82 a	86 a	203 a	1.1 b	14.0 a	23 a	324.0 a	241 ab	4.5 a	12.0 c	131.5 c
A1	80 a	83 a	202 a	1.2 b	14.4 a	21 a	306.5 a	225 ab	4.3 a	25.4 b	292.3 ab
A2	83 a	90 a	207 a	1.3 ab	13.3 a	23 a	303.8 a	190 b	4.0 a	16.6 bc	204.3 bc
Bco	80 a	86 a	223 a	1.1 b	14.4 a	22 a	324.4 a	259 a	4.9 a	0.0 d	0.0 d
DSH	6.6	10.7	36.6	0.364	2.7	5.1	55.4	56.8	2.0	9.5	5.4
Prog= Progenitor			DFM= Días a floración masculina					PIG=			
R1= rojo-1			DFE= Días a floración femenina					RG _{ha} =			
R2= rojo-2			ALP= Altura de planta (cm)					por hectárea (ton ha ⁻¹)			
A1= azul-1			NMzP= Número de mazorcas por planta					RA _{pta} =			
A2= azul-2			NHMz= Número de hileras de granos por mazorca					por planta (mg pta ⁻¹)			
Bco= blanco			NGH= Número de granos por hilera					CA _{kg} =			
			NGMz= Número de granos por mazorca					en el grano completo			
								(mg kg ⁻¹ de grano)			

Valores con la misma letra son estadísticamente iguales según la diferencia mínima (DSH con $\alpha=0.05$).



Análisis dialélico

Hubo diferencias significativas ($P \leq 0.01$) entre las cruzas (directas y recíprocas) y progenitores, para todas las variables en estudio (Cuadro 6.2). El efecto de ACG resultó significativo ($P \leq 0.05$) en la mayoría de las variables, con excepción de NGMz. La ACE fue significativa en todas las variables, con excepción del NHMz y ALP. De acuerdo con Reif *et al.* (2007) y con base en el cociente entre los cuadrados medios de ACG/ACE, en casi todas las variables, a excepción de NGMz, fueron relevantes los efectos determinados por la acción génica aditiva. Jumbo y Carena (2008) encontraron efectos significativos de la ACG y de la interacción ACG x ambiente sobre el rendimiento de grano por hectárea, de variedades de maíz, pero los efectos de ACE, EM o ER no fueron significativos. En otro estudio de variedades de maíz, Mahto y Ganguli (2003) detectaron efectos significativos de la ACG y ACE para DFM, DFF, ALP, NHMz, NGH y PIG, siendo los cuadrados medios de la ACG mayores en comparación con los de la ACE. Barrera *et al.* (2005) reportan en su estudio de cruzas entre razas mejoradas de maíz, que para DFM, DFF y ALP, fueron significativos los efectos de ACG y ACE, pero no los de interacción ACG y ACE con el ambiente. Estos resultados indican que los efectos significativos aditivos y no aditivos dependen de las variedades, del ambiente, de su interacción, y de las variables consideradas. En el presente trabajo sólo se consideró un ambiente, por lo que se sugiere estudiar la ACG y ACE en varios ambientes y durante varios períodos de cultivo.

El ER sólo fue significativo ($P \leq 0.05$) para el rendimiento de antocianinas (RA_{pta}). Esto indica que la dirección de la cruce tuvo influencia en la producción del pigmento.

Aptitud combinatoria general

En el Cuadro 6.3 se muestran los efectos de ACG de cada progenitor. En todas las variables estudiadas hubo diferencias ($P \leq 0.05$) entre poblaciones, siendo la población rojo-2 (0.544 unidades) y azul-2 (1.336) las mejores en DFM; rojo-2 (0.201), azul-2 (1.441) y blanco (0.314) sobresalieron en DFF; rojo-1 (-1.455),



Cuadro 6.2. Cuadros medios del análisis de varianza de las cruzas posibles entre cinco poblaciones criollas de maíz con diferentes grados de pigmentación. Evaluación de la generación F₂, Montecillo, Edo. de México, 2005.

FV	Gl	DFM	DFP	ALP	NMzP	NHMz	NGH	NGMz	PIG	RG_{ha}	RA_{pta}
Bloque	2	0.21 ^{ns}	0.09 ^{ns}	40.53 ^{ns}	0.047 ^{ns}	1.20 ^{ns}	10.94 ^{ns}	707.46 ^{ns}	0.0005 ^{ns}	1.12 ^{ns}	14.57 ^{ns}
Cruzas	24	13.04 ^{**}	14.94 ^{**}	561.08 ^{**}	0.063 ^{**}	1.05 [*]	12.89 ^{**}	3394.51 ^{**}	0.004 ^{**}	3.23 ^{**}	729.54 ^{**}
ACG	4	33.49 ^{**}	28.81 [*]	1266.36 [*]	0.216 ^{**}	2.23 [*]	25.77 [*]	2993.12 ^{ns}	0.012 ^{**}	6.32 [*]	3075.78 ^{**}
ACE	10	14.46 ^{**}	20.62 ^{**}	417.70 ^{ns}	0.054 ^{**}	0.98 ^{ns}	17.89 ^{**}	5580.24 ^{**}	0.003 ^{**}	4.46 ^{**}	264.67 ^{**}
<i>ACE</i>		2.3	1.4	3.0	4.0	2.2	1.4	0.5	4.0	1.4	11.6
EM	4	2.10 ^{ns}	3.55 ^{ns}	628.81 ^{ns}	0.007 ^{ns}	0.97 ^{ns}	3.03 ^{ns}	1591.6 ^{ns}	0.001 ^{ns}	1.42 ^{ns}	466.37 ^{ns}
ER	6	4.32 ^{ns}	3.82 ^{ns}	284.70 ^{ns}	0.014 ^{ns}	0.44 ^{ns}	2.52 ^{ns}	1221.15 ^{ns}	0.0007 ^{ns}	0.34 ^{ns}	115.62 ^{**}
Error	48	3.61	6.07	215.06	0.016	0.57	5.15	1348.83	0.001	1.08	29.09
Total	74										
CV	2.4	3.0	6.6	10.1	5.3	9.1	10.4	11.8	17.2	16.6	

FV= Fuente de variación

Gl= Grados de libertad

ACG= Aptitud combinatoria general

ACE= Aptitud combinatoria específica

EM= Efecto materno

ER= Efecto recíproco

DFM= Días a floración masculinas

DFP= Días a floración femenina

*= Significancia al 5 % de error

**= Significancia al 1 % de error

^{ns}= No significativo

ALP= Altura de planta

NMzP= Número de mazorcas por planta

NHMz= Número de hileras de granos por mazorca

NGH= Número de granos por hilera

NGMz= Número de granos por mazorca

PIG= Peso individual del grano

RG_{ha}= Rendimiento de grano por ha

RA_{pta}= Rendimiento de antocianinas por planta



Cuadro 6.3. Efectos de ACG en variables agronómicas de cinco poblaciones criollas de maíz contratadas en color de grano. Evaluación de la generación F₂, Montecillo, Edo. de México, 2005.

Prog	Color	DFM	DFP	ALP	NMzP	NHMz	NGH	PIG	RG _{ha}	RA _{pta}
Rojo-1		-0.371 b	-0.803 b	-1.455 a	0.071 a	-0.400 b	0.251 a	0.018 a	0.614 a	11.687 a
Rojo-2		0.544 a	0.201 a	-2.446 b	-0.051 b	0.022 a	-0.150 a	0.006 a	-0.122 b	-1.359 c
Azul-1		-1.319 b	-1.153 b	-7.981 b	-0.067 b	0.380 a	-1.237 b	-0.005 b	-0.544 b	2.436 b
Azul-2		1.336 a	1.441 a	4.180 a	0.107 a	-0.029 a	0.920 a	-0.030 c	0.028 a	1.693 b
Blanco		-0.190 b	0.314 a	7.703 a	-0.060 b	0.027 a	0.021 a	0.010 a	0.024 a	-14.458d
DSH		1.254	1.626	9.675	0.083	0.500	1.497	0.020	0.685	3.558

Prog= Progenitor

DFM= Días a floración masculinas

DFP= Días a floración femenina

ALP= Altura de planta

NMzP= Número de mazorcas por planta

NHMz= Número de hileras de granos por mazorca

Valores en columna con la misma letra son iguales estadísticamente

NGH= Número de granos por hilera

PIG= Peso individual del grano

RG_{ha}= Rendimiento de grano por ha

RA_{pta}= Rendimiento de antocianinas por planta

DSH= Diferencia significativa honesta

(Tukey, 0.05)



azul-2 (4.180) y blanco (7.703) en ALP; rojo-1 (0.071) y azul-2 (0.107) fueron sobresalientes en NMzP. La mayoría de los progenitores fueron similares en NHMz, con excepción del rojo-1, y similares en NGH, con excepción de azul-1. Los progenitores rojo-1 (0.018), rojo-2 (0.006) y blanco (0.01) fueron semejantes en FIG; rojo-1 (0.614), azul-2 (0.028) y blanco (0.024) fueron similares en RG_{ha}. Sólo el rojo-1 presentó los valores más altos en RA_{pta} (11.6 unidades).

Cuando en un experimento dialélico se están estudiando variedades de polinización libre, como es el caso de la presente investigación, un valor alto de ACG de alguna variedad, indica una mayor frecuencia de genes que incrementan la expresión del carácter analizado además de una mayor desviación en términos de frecuencias génicas con respecto a la media de las poblaciones involucradas en el dialélico (Ferreira *et al.*, 2004). En este sentido, la población rojo-1 fue la mejor, considerando RA_{pta}, que es un característica de interés en este estudio.

Heterosis y heterobeltiosis en rendimiento de antocianinas

En el Cuadro 6.4 se muestra que el mejor progenitor ($P \leq 0.05$) para CA_{kg} fue el rojo-1 (377.0 mg kg⁻¹), siendo estadísticamente ($P \leq 0.05$) semejante a la mejor cruce (rojo-1 x rojo-2); mientras que el progenitor blanco no tuvo antocianinas. Algunas cruces presentaron valores positivos de heterosis, tales como: rojo-1 x rojo-2 (50.8 %), indicando un efecto de dominancia completa del progenitor rojo-1; rojo-1 x azul-2 (33.4%), azul-2 x azul-1 (30.4%) y rojo-2 x azul-2 (12.5%). Sin embargo, en algunas cruces recíprocas se presentaron valores negativos de heterosis para CA_{kg}: rojo-2 x rojo-1 (-21.6 %), azul-2 x rojo-1 (-36.0%), azul-1 x azul-2 (-19.3%) y azul-2 x rojo-2 (-22.7%). Las cruces restantes presentaron valores bajos de heterosis, siendo aún más bajos en las cruces recíprocas, en comparación con las directas. Generalmente, las cruces directas o recíprocas de los progenitores pigmentados (rojo-1, rojo-2, azul-1 y azul-2) con el progenitor blanco presentaron una reducción significativa de CA_{kg}, en relación a las cruces entre los progenitores rojos y azules.



Con respecto al rendimiento de antocianinas por unidad de superficie (RA_{ha}), el comportamiento de las cruzas no fue igual al presentado con base en el rendimiento del pigmento por unidad de peso (Cuadro 6.4).

Cuadro 6.4. Concentración y rendimiento de antocianinas de poblaciones criollas de maíz contrastadas en color de grano y en sus cruzas posibles (directas y recíprocas). Montecillo, México, 2005.

		Macho					Promedio	
Variable		rojo-1	rojo-2	azul-1	azul-2	blanco		
Hembra	rojo-1	CA_{kg}	377.0	383.6	265.2	339.3	54.9	283.9
		CA_{kgH}	0.0	50.9	-20.8	33.4	-70.9	-1.4
		RA_{ha}	2.2	2.3	1.7	2.9	0.4	1.9
		RA_{haH}	0.0	6.5	0.3	32.6	-62.6	-4.6
	rojo-2	CA_{kg}	199.3	131.6	188.3	189.0	19.3	145.4
		CA_{kgH}	-21.6	0.0	-11.2	12.5	-70.7	-18.1
		RA_{ha}	1.4	0.6	1.1	1.3	0.1	0.9
		RA_{haH}	-2.6	0.0	18.6	84.9	-59.2	8.3
	azul-1	CA_{kg}	184.4	199.5	292.4	212.9	77.7	193.3
		CA_{kgH}	-44.9	-5.9	0.0	-19.4	-46.8	-23.4
		RA_{ha}	1.0	1.0	1.3	1.3	0.4	1.0
		RA_{haH}	-41.4	7.6	0.0	19.6	-31.7	-9.1
	azul-2	CA_{kg}	185.9	129.8	324.0	204.3	18.2	172.4
		CA_{kgH}	-36.0	-22.7	30.5	0.0	-82.2	-22.0
		RA_{ha}	1.4	0.8	1.7	0.8	0.1	0.9
		RA_{haH}	-5.6	15.6	61.4	0.0	-74.1	-0.5
	Blanco	CA_{kg}	16.5	50.9	27.5	8.1	0.0	20.6
		CA_{kgH}	-91.2	-22.6	-81.2	-92.1	0.0	-57.4
		RA_{ha}	0.1	0.3	0.2	0.1	0.0	0.1
		RA_{haH}	-90.0	6.0	-76.2	-87.1	0.0	-49.4
Promedio	CA_{kg}	160.5	149.2	182.9	158.9	28.3	135.9	
	CA_{kgH}	-32.3	-0.0	-13.7	-10.9	-45.09	-20.4	
	RA_{ha}	1.0	0.8	1.00	1.0	0.1	0.8	
	RA_{haH}	-23.2	5.9	0.6	8.3	-37.9	-9.2	

CA_{kg} = Concentración de antocianinas ($mg\ kg^{-1}$), RA_{ha} =Rendimiento de antocianinas ($kg\ ha^{-1}$), H= valor de la heterosis por craza (%), $CA_{kg\ DSH}=145.16$, $RA_{ha\ DSH}=0.520$, DSH=Diferencia significativa honesta.



El RA_{ha} fue alto ($P \leq 0.05$) en las cruzas rojo-1 x azul-2 (2.9 kg ha^{-1}) y rojo-1 x rojo-2 (2.3 kg ha^{-1}), superando al mejor progenitor (rojo-1) por 32.6 % y 6.4 % (heterobeltiosis), respectivamente. Esto significa, que en la primera cruce la heterobeltiosis para rendimiento de antocianinas por unidad de superficie se relacionó con un mayor rendimiento de grano por unidad de superficie y no con una mayor concentración del pigmento por unidad de peso de grano.

Las cruzas que también presentaron valores positivos de heterosis para RA_{ha} fueron: rojo-1 x azul-1 (0.3 %), azul-2 x azul-1 (61.3 %), rojo-2 x azul-2 (85.0 %), rojo-2 x azul-1 (18.5 %) y blanco x rojo-2 (6.0 %). No obstante, las cruzas recíprocas presentaron valores de heterosis positivos bajos y valores negativos: azul-1 x rojo-1 (-41.4%), azul-1 x azul-2 (19.6 %), azul-2 x rojo-2 (15.6 %), azul-1 x rojo-2 (7.6 %), rojo-2 x blanco (-59.2%) y rojo-2 x rojo-1 (-2.5 %). En general, todas las cruzas con el progenitor blanco presentaron el RA_{ha} más bajo ($< 0.5 \text{ kg ha}^{-1}$), lo que significa que un alto rendimiento de pigmento se logrará a través de la heterobeltiosis del CA_{kg} y del RA_{ha} , usando progenitores contrastados en su contenido de antocianinas tanto en el pericarpio como en la capa de aleurona. En el estudio de estos progenitores (Capítulo V del presente documento) se encontró que los progenitores rojos presentaron antocianinas en el pericarpio y los azules únicamente en la capa de aleurona en forma contrastante.

Mediante un sistema de cruzas dialélicas entre variedades de lechuga con diferentes grados de pigmentación en las hojas, se ha encontrado heterosis en un intervalo de 19.2 % a 75.2 %, diferentes grados de dominancia y efectos aditivos del contenido de antocianinas (Zdravkovic *et al.*, 2002). En el presente estudio la heterosis tuvo valores desde -57.4 % hasta 8.3 %, y su magnitud también dependió de la dirección de las cruzas.

En el estudio genético de la acumulación de antocianinas en las anteras de las espiguillas del maíz, Hollick y Chandler (1998) cruzaron líneas contrastadas (colorida e incolora) en alelos del gen *Pl* (codificador de un factor de transcripción). Observaron segregación en diferentes grados de pigmentación de



las anteras y en diferentes frecuencias relativas. En el 10% de las plantas la intensidad de la pigmentación fue mayor al progenitor pigmentado, indicando un efecto de sobredominancia, dando lugar a la ocurrencia de heterosis; es decir, hubo una mayor expresión del gen *Pl* en el heterocigoto. No obstante, el nivel de expresión no incrementó, aun cuando incrementó el número de alelos (dosis) en las células y no fue uniforme en todas las anteras evaluadas, sugiriendo que hubo segregación de genes modificadores no identificados. Estudios posteriores por parte de Gross y Hollick (2007), indican que la interacción entre alelos del mismo locus, como ocurre en algunos loci involucrados en la biosíntesis de antocianinas (*red color, r1, booster, b1, pericarp, p1* y *purple plant, pl1*), puede ser represiva o activa, resultando un menor o mayor grado de pigmentación, como en el caso del gen *Pl*, cuyos alelos difieren en número y posición de segmentos faltantes, en su secuencia de bases, lo que implica cambios sutiles en la función de las proteínas codificadas por ellos. Por su parte, Springer y Stupar (2007) indican que una mayor expresión fenotípica de la pigmentación por antocianinas podría resultar de las interacciones epistáticas entre los factores de transcripción mas no por el resultado de las interacciones entre los genes estructurales; es decir, epistasis transcripcional. Esto explicaría los valores positivos y negativos de la heterosis encontrada en el presente estudio en las cruzas entre las poblaciones criollas contrastadas en el color de grano.

Desde la perspectiva económica, el rendimiento de antocianinas por unidad de superficie también es importante dado que el valor de este pigmento, grado alimenticio, es de aproximadamente 1000 USD por kilogramo (Cisneros, 2003). Esta es una razón por la cual es importante generar estrategias para aumentar el rendimiento de pigmento por medio del mejoramiento genético y a través de factores ambientales (Brown *et al.*, 2003; Cisneros, 2003).

Segregación de tonalidades de color en las cruzas

Los progenitores presentaron un sólo color (Cuadro 6.3). La mayoría de las cruzas segregaron de dos a cuatro tonalidades, con excepción de azul-1 x azul-2 y azul-2



x azul-1 (Cuadro 6.5) donde dominó (100%) el color del progenitor materno. Varias cruzas (azul-1 x blanco, blanco x azul-1) segregaron dos tonalidades y otras (rojo-1 x azul-1, azul-1 x rojo-1, azul-1 x rojo-2, rojo-2 x azul-1, azul-2 x rojo-2, rojo-2 x azul-2) tres tonalidades, independientemente de la dirección de los cruzamientos (directa o recíproca). Por el contrario, algunas cruzas (rojo-1 x rojo-2, azul-2 x blanco) segregaron dos tonalidades en el sentido directo y tres en el recíproco, otras cruzas (rojo-1 x azul-2, rojo-1 x blanco y rojo-2 x blanco) presentaron tres tonalidades en las directas y cuatro en las recíprocas.

Algunas cruzas directas presentaron valores positivos de heterosis en CA_{kg} (Cuadro 6.4) mientras que sus recíprocas presentaron valores negativos. Esto estuvo relacionado con la segregación de granos de menor intensidad de color en las cruzas recíprocas, en comparación con las directas, como en el caso de rojo-1 x azul-2, rojo-2 x rojo-1 y azul-2 x rojo-2. La cruce de mayor contenido de pigmento fue rojo-1 x rojo-2, la cual presentó un 83.1% de granos con una tonalidad similar al progenitor rojo-1. Sin embargo, esto no ocurrió en las cruzas azul-1 x azul-2 y azul-2 x azul-1, donde la tonalidad fue similar entre las cruzas, pero sí presentaron diferencias en el contenido de pigmento, lo que sugiere que el abatimiento en la capacidad de biosíntesis observada en las cruzas se debió a cambios en la capacidad de biosíntesis en la capa aleurona, los cuales no se reflejan en la tonalidad.

Fujii y Kuwada (1916) consideraron la constitución genética triploide ($3n$) del endospermo para comprender la herencia de la pigmentación. De este modo, la capa de aleurona de los granos azules presenta el genotipo AAA y en el blanco es aaa , tal que en la F_2 se manifiesten cuatro clases de cigotos, cuya constitución genética es AAA , AAa , Aaa y aaa . Suponiendo que cada literal A es una unidad de intensidad del color azul o rojo, entonces se genera un gradiente en el color del grano, cuando el número de loci se incrementa. Sin embargo, desde un enfoque Mendeliano, los primeros trabajos sobre los pigmentos del maíz encontraron que los factores (genes) responsables del color rojo o púrpura de la aleurona son



Cuadro 6.5. Clasificación de granos de la F₂ de cruza dialélicas entre cinco poblaciones criollas de maíz, con base en la tonalidad del color (imagen) y frecuencia (%) en cada cruce. Montecillo, Edo. de México, 2005.

Cruza	Ton I	%	Ton II	%	Ton III	%	Ton IV	%	Cruza	Ton I	%	Ton II	%	Ton III	%	Ton IV	%
R1 x A1		64		28		8	-	0	A1 x R2		82		9		9	-	0
A1 x R1		50		30		18		2	R2 x A1		73		25		2	-	0
R1 x A2		68		24		8	-	0	A1 x B		37		63	-	0	-	0
A2 x R1		41		43		11		5	B x A1		38		62	-	0	-	0
R1 x R2		83		17	-	0	-	0	A2 x R2		61		30		9	-	0
R2 x R1		76		18		6	-	0	R2 x A2		18		58		24	-	0
R1 x B		6		55		39	-	0	A2 x B		34		66	-	0	-	0
B x R1		3		39		14		4	B x A2		27		6		67	-	0
A1 x A2		100	-	0	-	0	-	0	R2 x B		32		57		11	-	0
A2 x A1		100	-	0	-	0	-	0	B x R2		17		38		26		19

Ton= Tonalidad del color (escala visual, I= mayor, IV=menor), R1= rojo-1, A1= azul-1, A2= azul-2, R2= rojo-2, B= blanco



dominantes sobre el blanco (Weatherwax, 1919) y la aleurona púrpura presenta xenia (efecto del progenitor macho) sobre el color rojo (Snyder, 1946). El color rojo del pericarpio también domina total o parcialmente al incoloro. En ciertos casos su herencia no es sencilla de entender, dado que existen varios alelos de cada locus y varios genes que modifican la expresión fenotípica del carácter, por lo que las frecuencias fenotípicas no cumplen las reglas mendelianas (Lindstrom, 1923). En este sentido, la diferencia entre las cruzas directas con respecto a las recíprocas en la tonalidad del color, indicaría un efecto genético del progenitor materno. Sin embargo, la diferencia entre ambas cruzas puede obedecer a efectos epigenéticos, como la impresión alélica, que ocurren comúnmente con algunos alelos de los factores de transcripción de los genes estructurales de la ruta de biosíntesis de antocianinas en el grano de maíz (Sokolov, 2006).

CONCLUSIONES

Con el estudio dialélico de cinco poblaciones criollas de maíz, contrastadas en su color de grano, se determinó un efecto significativo de la ACG en la mayoría de las características agronómicas estudiadas y un efecto significativo de ACE, ACG y ER sobre el rendimiento de antocianinas por planta. En esta última característica el mejor progenitor fue el rojo-1.

Entre cruzas hubo diferencias en el contenido de antocianinas por kg de grano y en el rendimiento de antocianinas por unidad de superficie; las mejores cruzas fueron rojo-1 x rojo-2 y rojo-1 x azul-2, respectivamente.

Las cruzas de mayor contenido de antocianinas en el grano no necesariamente fueron las mejores en el rendimiento del pigmento por unidad de superficie.

En rendimiento de antocianinas por unidad de superficie y en el contenido del pigmento por kg de grano se encontraron efectos de heterobeltiosis y heterosis en varias cruzas directas.

Todas las cruzas con el progenitor blanco presentaron bajo rendimiento de antocianinas por kg de grano y por hectárea, de manera que la segregación de



granos incoloros y de baja tonalidad se asoció con un bajo contenido de antocianinas en el grano.

El rendimiento de antocianinas por unidad de superficie se puede incrementar si se mejora la acumulación de antocianinas por planta, aprovechando la heterobeltiosis entre cruza de poblaciones rojas y azules, contrastadas en la ubicación del pigmento en las estructuras del grano.

LITERATURA CITADA

- Alleman M, L Sidorenko, K McGinnis, V Seshadri, J E Dorweiler, J White, K Sikkink and V L Chandler (2006)** An RNA-dependent RNA polymerase is required for paramutation in maize. *Nature* 442: 295-298.
- Antonio M M, J L Arellano V, G García de los S, S Miranda C, J A Mejía C y F V González C (2004)** Variedades criollas de maíz azul raza chalqueño. Características agronómicas y calidad de semilla. *Revista Fitotecnia Mexicana* 27 (1):9-15.
- Barrera G E, A Muñoz O, F Márquez S and A Martínez G (2005)** Aptitud combinatoria en razas de maíz mejoradas por retrocruza limitada. I: Carácter agronómico. *Revista Fitotecnia Mexicana* 28(3):231-242.
- Basu S K, J E Thomas, S N Acharya (2007)** Prospects for growth in global nutraceutical and functional food markets: a Canadian perspective. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 1(4):637-649.
- Brown C R, R Wrolstad, R Durst, C P Yang and B Clevidence (2003)** Breeding studies in potatoes containing high concentrations of anthocyanins. *American Journal of Potato Research* 80(4): 241-249.
- Cisneros Z L (2003)** The use of controlled postharvest abiotic stresses as a tool for enhancing the nutraceutical content and adding value of fresh fruits and vegetables. *Journal of Food Science* 68(5): 1560-1565.
- Coulter M C (1920)** Inheritance of aleurone color in maize. *The Botanical Gazette* 69(5):407-425.
- Dekkers J C M and F Hospital (2002)** The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. *Nature Reviews Genetics* 3:22-32.



- Della Penna D (1999)** Nutritional genomics: manipulating plant micronutrients to improve human health. *Science* 285:375-379.
- East E M (1912)** Inheritance of color in the aleurone cells of maize. *The American Naturalist* 46: 363-365.
- Emerson R A (1912)** The unexpected occurrence of aleurone colors in F2 of a cross between non colored varieties of maize. *The American Naturalist* 46: 612-615.
- Espinosa T E, Ma del C Mendoza C, F Castillo G (2006)** Diversidad fenotípica entre poblaciones de maíz con diferentes grados de pigmentación. *Revista Fitotecnia Mexicana* 29:19-23.
- Ferreira F M, J I R Júnior, C A P Pacheco, C H O Silva and S M Filho Jr. (2004)** Genetic components of combining ability in a complete diallel. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 4:338-343.
- Fujii K and Y Kuwada (1916)** On the comparison of factorial formula for zygotes in the study of inheritance of seed characters of *Zea mays* L. with notes on seed pigments. *The Botanical Magazine* 30(351):83-88.
- Fujii K and Y Kuwada (1916)** On the composition of factorial formula for zygotes in the study of inheritance of seed characters of *Zea mays* L. with notes on seed pigments. *The Botanical Magazine* 30 (351):83-88.
- Griffing B (1956)** A generalized treatment of the use of diallel crosses in quantitative inheritance. *Heredity* 10: 31-50.
- Gross S M and J B Hollick (2007)** Multiple trans-sensing interactions affect meiotically heritable epigenetic states at the maize *pl1* locus. *Genetics* 176:829–839.
- Henderson I R and S E Jacobsen (2007)** Epigenetic inheritance in plants. *Nature* 447 (May 24): 418-423.
- Hochholdinger F and N Hoecker (2007)** Towards the molecular basis of heterosis. *Trends in Plant Science* 12(9): 1360-1385.
- Hollick J B and V L Chandler (1998)** Epigenetic allelic states of a maize transcriptional regulatory locus exhibit overdominant gene action. *Genetics* 150:891–897.
- Johannessen C L (1982)** Domestication process of maize continues in Guatemala. *Economic Botany* 36(1):84-99.



- Jumbo M B and M J Carena (2008)** Combining ability, maternal, and reciprocal effects of elite early maturing maize population hybrids. *Euphytica* 162(3):325-333.
- Krishnaswamy L (2007)** Transposon biology: a historical perspective. *Current Science*, 93(7): 1021-1024
- Larson R, J B Bussard and E H Coe (1986)** Gene dependent flavonoid 3'-hidroxilation in maize. *Biochemical Genetics* 24(7-8):615-624.
- Lindstrom E W (1923)** Genetical research with maize. *Genetics* 5(3-4):327-356.
- Lindstrom E W (1923)** Genetical reserch with maize. *Genetics* 5(3-4):327-356.
- Maddoni G A and M E Otegui (2006)** Intra-specific competition in maize: contribution of extreme plant hierarchies to grain yield, grain yield components and kernel composition. *Field Crops Research* 97:155–166.
- Mahto R N and D K Ganguli (2003)** Combining ability analysis in inter varietal crosses of maize (*Zea mays* L.). *Madras Agricultural Journal* 90(1-3):29-33.
- Mastache L A A y A Martínez G (2003)** Un algoritmo para el análisis, estimación y predicción de experimentos dialélicos balanceados. *Revista Fitotecnia Mexicana* 26(3)191-200.
- Pajic Z (2007)** Breeding of maize types with specific traits at the Maize Research Institute, Zemun Polje. *Genetika* 39(2):169-180.
- Pedreschi R and L Cisneros Z (2006)** Antimutagenic and antioxidant properties of phenolic fractions from Andean purple corn (*Zea mays* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:4557-4567.
- Peterson P A (2005)** The plant genetics discovery of the century: transposable elements in maize. Early beginnings to 1990. *Maydica* 50 (2005): 321-338.
- Reif J C, F M Gumpert, S Fischer and A E Melchinger (2007)** Impact of interpopulation divergence on additive and dominance variance in hybrid populations. *Genetics* 176:1931-1934.
- Ritchie J T and G Alagarswamy (2003)** Model concepts to express genetic differences in maize yield components. *Agronomy Journal* 95:4-9.
- Shattuck V I, B Christie and C Corso (1993)** Principles for Griffing's combining ability analysis. *Genetics* 90:73-77.



- Shull G H (1911)** The genotypes of maize. *The American Naturalist* 45: 234-252.
- Singh K B (1998)** Transcriptional regulation in plants: the importance of combinatorial control. *Plant Physiol.* 118: 1111–1120.
- Snyder L H (1946)** *The Principles of Heredity*. D. C. Heath and Company. Boston, USA. 450 p.
- Sokolov V A (2006)** Imprinting in Plants. *Russian Journal of Genetics* 42(9):1043–1052.
- Springer N M and R M Stupar (2007)** Allelic variation and heterosis in maize: How do two halves make more than a whole?. *Genome Research* 17:264-275.
- Suriyagoda L D B and B L Peiris (2007)** Estimating genetic parameters from diallel experiments using SAS/IML. *Sri Lankan Journal of Applied Statistics* 8:83-94.
- Weatherwax P (1919)** Gametogenesis and fecundation in *Zea mays* as the basis of xenia and heredity in the endosperm. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 46(3):73-90.
- Zdravkovic J, D Stevanovic, T S Rajicic and M Zdravkovic (2002)** Genetic analysis of anthocyanin and vitamin C contents in lettuce. *Acta Hort.* 579:167-170.



**VII. ANTOCIANINAS ASOCIADAS AL COLOR AZUL Y ROJO DEL
GRANO DE POBLACIONES CRIOLLAS DE MAÍZ Y SUS CRUZAS
POSIBLES**

RESUMEN

Los granos de maíz de colores púrpura, azul y rojo contienen antocianinas, compuestos derivados del metabolismo secundario cuya estructura química es variable debido a la presencia de grupos hidroxilo, metilo, glucosa, ácidos orgánicos u otros copigmentos. En las antocianinas existe estrecha relación entre su estructura y su actividad biológica con el color del órgano de la planta que los acumula. Se estableció un experimento con el objetivo de identificar las antocianinas presentes en el grano de poblaciones criollas de maíz de colores rojo y azul, con diferente intensidad, y algunas cruzas entre ellas. Las cruzas directas y recíprocas entre las poblaciones se cultivaron en campo, para obtener la semilla F_2 por medio de polinización controlada. Se cuantificó la concentración de antocianinas por unidad de peso de grano (CA_{kg}). Se identificaron algunos tipos de antocianinas en el grano de los progenitores y cruzas sobresalientes por su CA_{kg} y se midió la actividad antioxidante. Se encontró cianidina, peonidina y pelargonidina en sus formas glucosiladas y aciladas. Hubo relación negativa de la cromaticidad del color del grano con el CA_{kg} . Las diferencias entre los colores azul y rojo de los progenitores se relacionaron con la presencia de estos tres tipos de antocianinas acumuladas en el grano en diferentes cantidades y combinaciones. Una alta actividad antioxidante la presentó el progenitor rojo-1, asociado a su mayor cantidad de antocianinas glucosiladas, aun cuando esta población no presentó el valor más alto de CA_{kg} .

Palabras clave: antocianinas, antioxidantes, anticancerígenos, maíz pigmentado, nutraceuticos de maíz.



INTRODUCCIÓN

El grano de maíz, además de sintetizar y acumular compuestos derivados del metabolismo primario (carbohidratos, proteínas, lípidos y otros) también, dependiendo del genotipo, puede producir metabolitos secundarios como: ácidos fenólicos, antocianinas, flobafenos, flavandioles y flavonoles (Shahidi y Naczki, 2004); siendo las antocianinas las que le confieren la propiedad óptica del color (Ford, 2000). Poblaciones de grano pigmentado son comunes de observar en las razas de maíz cultivadas en México (Ron *et al.*, 2006). Los colores más frecuentes son rojo, azul, negro-púrpura y sus combinaciones derivadas (Abdel-Aal *et al.*, 2006). Una molécula funcional de antocianina se conforma por una antocianidina o aglucon, moléculas de glucosa, y, en la mayoría de los casos, de grupos acilo. Se conocen más de 30 aglucones, pero el 90% de las antocianinas se basan en sólo seis: pelargonidina, cianidina, peonidina, delfinidina, petunidina y malvidina, las cuales se diferencian por la presencia o ausencia de grupos hidroxilo y metilo, unidos a los carbonos de su estructura química básica (Andersen y Jordheim, 2006). De esta manera, delfinidina tiene tres grupos hidroxilo (en los carbonos 3', 4' y 5'), cianidina dos (3' y 4') y pelargonidina uno (4'). La diferencia con las otros aglucones radica en el número y posición de los grupo hidroxilo y metilo, por lo que petunidina contiene dos grupos hidroxilo (4' y 5') y un metilo (3'), peonidina presenta un hidroxilo (4') y un metilo (3'); mientras que la malvidina tiene un hidroxilo (4') y dos metilos (3' y 5') (Escribano *et al.*, 2004). Las antocianinas basadas en peonidina se derivan de la cianidina, mientras que las basadas en malvidina se derivan de la petunidina y, a la vez, ésta se deriva de la delfinidina (Yu *et al.*, 2006); en consecuencia, las antocianinas glucosiladas básicas son cianidina-3-glucósido, pelargonidina-3-glucósido y delfinidina-3-glucósido, las que Crocker (1916) nombró como cianina, pelargonina y delfinina, respectivamente. Varios estudios bioquímicos del grano de maíz revelan que las antocianinas de los granos de color púrpura se conforman únicamente de los aglucones: cianidina, peonidina y pelargonidina (Jing *et al.*, 2007; Pedreschi y Cisneros, 2006; Abdel-Aal



et al., 2006; Salinas *et al.*, 2005; Aoki *et al.*, 2002; De Pascual *et al.*, 2002); las de los granos de color azul están conformadas de cianidina, peonidina, pelargonidina y malvidina (Cortés *et al.*, 2006; Salinas *et al.*, 2003); y la de los granos de color rojo con endospermo dulce contienen cianidina, pelargonidina y peonidina (Abdel-Aal *et al.*, 2006); mientras que los granos de color rojo de endospermo harinoso contienen pelargonidina y malvidina (Salinas *et al.*, 2003). Estos antecedentes indican que el grano de maíz pigmentado no contiene delphinidina ni petunidina, sino que el producto final es malvidina; entonces, significa que toda la delphinidina se convierte enzimáticamente a malvidina, o que su identificación no ha sido precisa. En adición, Cone (2007) sostiene que las antocianinas acumuladas en la capa de aleurona del grano están, en su mayoría, basadas en cianidina y pelargonidina, y que la biosíntesis de los tres tipos básicos de antocianinas requiere de la intervención de, al menos, siete genes estructurales que codifican las enzimas que actúan coordinadamente en la ruta biosintética, la cual se ramifica en el tercer nivel donde la naringenina es el sustrato de las enzimas flavonoide-3-hidroxilasa, flavonoide-3'-hidroxilasa y flavonoide-3'5'-hidroxilasa (Irani *et al.*, 2003); sin embargo, Halbwirth *et al.* (2003) y Cone (2007) indican otras ramificaciones de la ruta que conducen hacia la síntesis de cianidina y pelargonidina, que se originan en el cuarto nivel, a partir del sustrato común dihidrocaemferol que es usado por las enzimas flavonoide-3'-hidroxilasa y dihidroflavonol reductasa, respectivamente. Esto indica que al estar presente un gen recesivo de cualquiera de estas cuatro enzimas, se provocan cambios en la composición de antocianinas. En el presente trabajo, se tuvo como objetivo principal: determinar cuáles son las antocianinas básicas presentes en el grano de seis poblaciones criollas de maíz y algunas cruzas entre ellas, que fueron sobresalientes en el contenido total de antocianinas; las poblaciones azules acumularon sólo en la aleurona y las rojas tuvieron tanto en el pericarpio como en la capa de aleurona (Capítulo V del presente documento), para encontrar la relación entre la combinación de los tipos básicos de antocianinas con el color del



grano. Se espera que entre los colores de grano rojo-1, rojo-2, azul-1 y azul-2, y las cruza directas del progenitor rojo-1 (hembra) con los otros progenitores, haya una combinación de antocianinas que los distinga específicamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio experimental y material genético

Se estudiaron seis poblaciones criollas (nativas) de maíz contrastadas en su coloración: rojo-1, rojo-2, azul-1, azul-2, amarillo y blanco, pero similares fenológicamente y en porte de la planta. Las 30 cruza posibles entre esas poblaciones (15 directas y 15 recíprocas) y los seis progenitores, se establecieron en un lote, el 12 de mayo de 2005, en el campo Experimental del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Se uso una parcela de dos surcos de 5 m de longitud con 21 plantas cada uno. Se obtuvieron de 15 a 20 mazorcas sanas, producto de polinizaciones fraternales en cada parcela las cuales, a la cosecha, se desgranaron y se mezclaron los granos que se conservaron a 4 °C hasta su análisis químico.

Color de grano

Se obtuvieron los parámetros del color de grano: utilizando el método objetivo de McGuire (1992). Se calculó la luminosidad (L), la tonalidad (T) y la cromaticidad del color (C) de cada una de las seis poblaciones progenitoras y de todas las cruza posibles.

Antocianinas totales

Se determinó el contenido total y tipos de antocianinas (AT) en el grano de las cruza y sus progenitores, en el Laboratorio Nacional de Maíz del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). De cada cruza y progenitor se tomaron tres muestras de 40 gramos de grano, las que se molieron en un molino eléctrico tipo ciclón (Cyclone Sampler Mill®, UD Co. Colorado, U.S.A), hasta obtener harina con un tamaño de partícula menor a 0.5 mm. Para la extracción de las antocianinas, las muestras de harina se secaron en



una estufa a 60 °C durante 24 h; luego, de cada muestra se obtuvieron tres repeticiones de 5 g para ser colocada en un matraz Erlenmeyer de 125 mL, agregándole 20 mL de una solución extractora (SE) del pigmento, compuesta de ácido Trifluoracético (TFA, Sigma®) al 1 % en metanol grado reactivo (Baker®). Las muestras se refrigeraron durante 24 h a 6 °C. Al término del tiempo, se midió el volumen del sobrenadante y se tomó una alícuota de 5 mL para filtrarse en papel Watman® No. 5. Con el extracto filtrado se hizo una dilución de 1:3 con la SE, de la cual se tomaron 3 mL para medir su absorbancia en celdas de cuarzo en un espectrofotómetro (Perkin Elmer®) a 520 nm (Abs₅₂₀) y 700 nm (Abs₇₀₀), simultáneamente. Se hizo una segunda extracción, agregando 20 mL de SE al residuo de harina en el mismo matraz y se siguió el mismo procedimiento hasta obtener las lecturas de absorbancia correspondientes. Para determinar el contenido de antocianinas en cada extracción (AE) se calculó la diferencia entre Abs₅₂₀ y Abs₇₀₀, cuyo resultado (Abs) se aplicó en la ecuación de regresión calibrada de una línea patrón, determinada con diferentes concentraciones de pelargonidina clorada (Sigma®) [AE (mgL⁻¹)=(Abs x 0.0636)–(0.0014), R²=0.999]; finalmente, el contenido total de antocianinas (AT) se obtuvo de la suma del contenido en las dos extracciones (AE₁+ AE₂) por repetición.

Se determinó el AT en tres muestras de granos con y sin pericarpio de rojo-1, azul-1, rojo-1 x azul-1 y azul-1 x rojo-1, para conocer la distribución del pigmento en las estructuras del grano. La aportación del pericarpio se calculó sustrayendo el AT del grano sin pericarpio del AT del grano con pericarpio.

Por otra parte, el remanente del primer extracto filtrado de rojo-1, azul-1, rojo-1 x azul-1, azul-1 x rojo-1, amarillo y blanco, se usó para obtener un perfil de absorbancia en el intervalo de 400 a 700 nm, para confirmar la longitud de máxima absorbancia del extracto del grano amarillo y blanco que presentaron turbidez, considerando la absorbancia debida al almidón o proteínas del grano, disueltos con la solución de extracción de antocianinas (SE). Para ello se obtuvo el perfil de absorbancia de 3 mL de extracto filtrado de 1.0 g de almidón comercial



(Sigma®) y de 800 µL de extracto de 1.0 g de la proteína zeína (Sigma®) de maíz, aforado a 3 mL con SE. En todos los casos se usaron 3 mL de SE para calibrar el espectrofotómetro.

Separación de antocianinas por cromatografía de líquidos

La extracción de antocianinas para su separación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se hizo a partir de 15 g de grano entero de los progenitores y de las cruzas rojo-1 x azul-1, rojo-1 x azul-2, rojo-1 x rojo-2, las cuales fueron sobresalientes en el contenido total de antocianinas, no se hicieron los análisis del grano de los progenitores amarillo y blanco porque no presentaron antocianinas.

Se remojaron los granos en 100 mL de agua destilada durante 20 min para remover el embrión, se secaron en una estufa por 24 h y después se molieron. Posteriormente, se tomaron 5 g de harina de grano en un matraz de 125 mL agregando 20 mL de SE, dejándose en refrigeración por 24 h. El sobrenadante se filtró en papel Watman® No. 4 y los extractos se congelaron a 0 °C hasta su análisis. Se aplicó el mismo procedimiento en el caso de una muestra del progenitor rojo-1 a la cual se le desprendió el pericarpio para su análisis, ya que fue el progenitor con mayor acumulación de antocianinas en esta estructura. Se se tomó una muestra de 1.0 g de harina de pericarpio.

Para purificar el extracto de antocianinas, el sobrenadante se mezcló en un vaso de precipitados con 40 mL de resina amberlita (XAD-7, Sigma®), previamente activada con metanol al 100 %, durante 24 h. Se agitó la mezcla y se agregaron 40 mL de agua destilada conteniendo ácido acético glacial al 5 % en tres ocasiones, para su lavado, desechando el sobrenadante en cada ocasión. Posteriormente, la resina con el pigmento adherido se vertió en una bureta de 50 mL de capacidad. La elusión de las antocianinas adheridas a la resina se hizo agregando a la bureta una solución de ácido acético glacial al 5 % en metanol y dejando salir una gota por min. Este procedimiento duró entre 8 y 10 h por muestra; finalmente se recolectaron las antocianinas en frascos color ámbar para congelarse (0 °C) hasta su análisis.



En la separación se usó un cromatógrafo Perkin Elmer® (Serie 200) con inyector manual y con un Loop de 100 μL , detector con arreglo de díodos, bomba cuaternaria, horno de columna a 25 $^{\circ}\text{C}$, columna hypersil-ODS- C_{18} (20 cm x 4.6 mm). La fase móvil del canal A consistió de ácido fórmico-agua, en proporción 1:9 (v/v), y del canal B de ácido fórmico-agua-metanol, en proporción 1:4:5 (v/v/v). Todos los disolventes fueron grado HPLC, y antes de emplearse se filtraron usando una bomba de vacío y membranas de nylon blanco (GNWP, Millipore®) con poros de 0.2 μm . El programa de elusión de las antocianinas con los disolventes se desarrolló con un flujo constante de 1.2 mL min^{-1} a una presión de 97 bares, durante 20 min, combinando las soluciones de los recipientes de los canales A y B de la siguiente manera:

Tiempo (min)	Solución A (%)	Solución B (%)
0	90	10
17	0	100
21	0	100
22	90	10

Se inyectaron los estándares cianidina-3-glucósido, pelargonidina-3-glucósido, peonidina-3-glucósido y malvidina-3-glucósido (Polyphenols®, Sandes, Norway) previamente disueltos en metanol grado HPLC; su cromatograma se usó para determinar las antocianinas presentes en las muestras estudiadas (Figura 7.1). De cada muestra se inyectaron 100 μL de antocianinas purificadas, las veces necesarias para obtener el cromatograma con los picos mejor definidos.

Actividad antioxidante de las antocianinas

Se midió la actividad antioxidante del sobrenadante de la primera extracción de antocianinas del progenitor rojo-1 y azul-1, así como de sus cruzas azul-1 x rojo1, rojo-1 x azul-1 y rojo-1 x rojo-2. Para esto se preparó una solución de DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, 95 %, Sigma®) 60 μM en metanol al 80 %. Se usó un espectrofotómetro Perkin Elmer® y la absorbancia se tomó a 515 nm. Se calibró a cero la absorbancia con metanol al 80 %; posteriormente se obtuvo la absorbancia



de dos mL de solución de DPPH. A esta última solución se le agregaron 100 μ L de antocianinas disueltas en 900 μ L de metanol al 80 % y a partir de ese instante, se registraron las lecturas de absorbancia de la reacción, cada minuto durante 30 min. Para obtener la actividad antioxidante (%), la lectura inicial del DPPH sin antocianinas, se consideró como el 100 % de absorbancia, a partir de la cual, cada minuto se calculó la disminución porcentual en la absorbancia, por efecto de la capacidad reductora de las antocianinas.

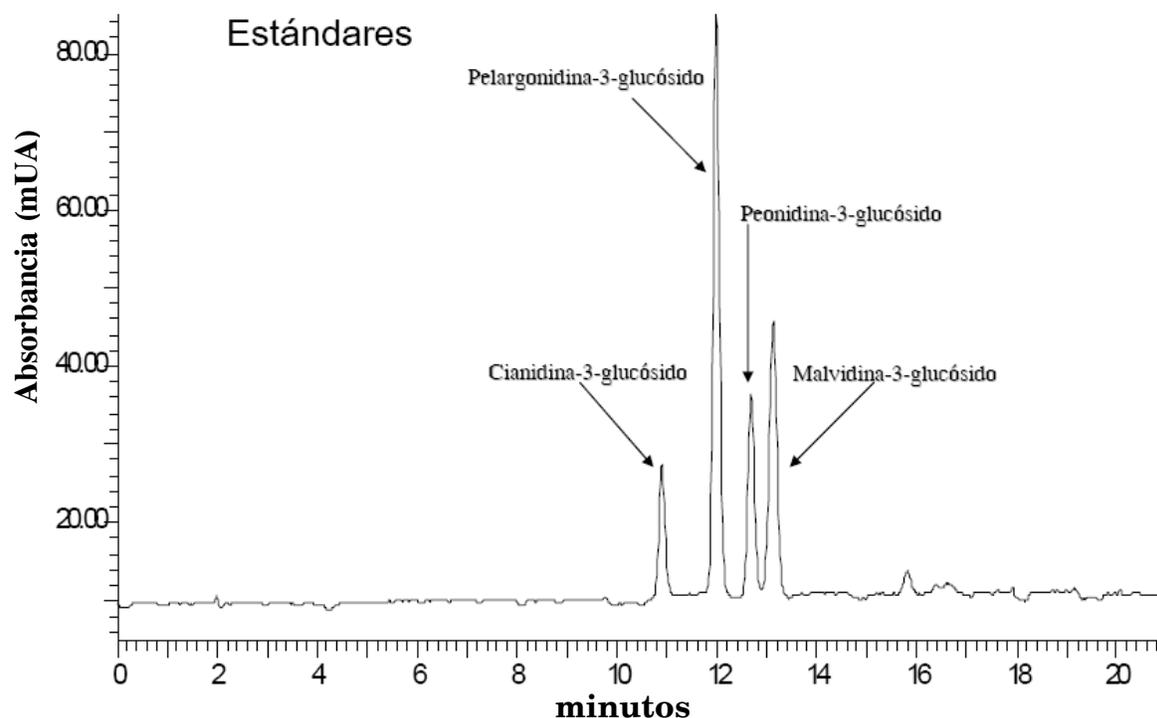


Figura 7.1. Cromatograma de cuatro antocianinas estándar usado para la determinación correspondiente, en los progenitores y las cruza de maíz criollo.

Análisis de datos

Se hizo un análisis gráfico del contenido de antocianinas, mediante la hoja de cálculo Excel® para Windows.

Se calculó la ecuación de regresión lineal del contenido total de antocianinas sobre la luminosidad, tinte y cromaticidad del color de grano.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El grano blanco y amarillo en la determinación de antocianinas

Los extractos de antocianinas de rojo-1, azul-1, rojo-1 x azul-1 y azul-1 x rojo-1 presentaron la máxima absorbancia en el intervalo de 510 a 540 nm, en comparación con los extractos de los progenitores de grano amarillo y blanco (Figura 7.2).

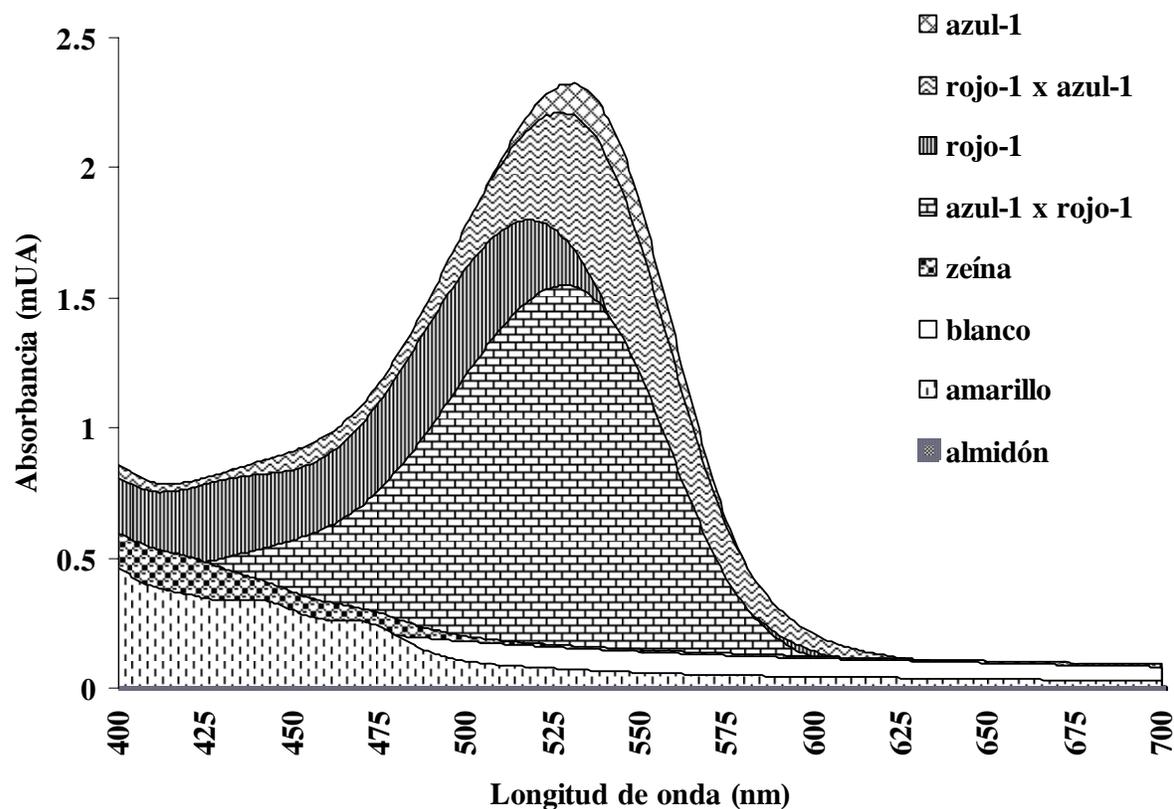


Figura 7.2. Perfil de absorbancia, en el intervalo de 400 a 700 nm, del extracto del maíz azul-1, rojo-1, el blanco, almidón y de zeína.

Harborne (1958) señala que la mayoría de las antocianinas presentan máxima absorbancia entre 498 y 544 nm; en la Figura 7.2 se observa que el grano amarillo y el blanco no presentaron este tipo de pigmento. Asimismo, el extracto del almidón comercial de maíz prácticamente no mostró absorbancia en el intervalo de 400 a 700 nm. El extracto de la proteína zeína tampoco presentó un pico de



alta absorbancia, sólo absorbió entre 0.6 y 0.1 mUA, conforme se incrementó la longitud de onda de 400 a 700 nm, en forma semejante al grano amarillo y blanco. Estos resultados indican que además de las antocianinas, durante el proceso de extracción también se obtuvo algún tipo de proteínas, similares a la zeína, solubles en soluciones ácidas y en alcohol, tal como lo sugirió Jing (2006) al extraer antocianinas del olote de maíz púrpura.

Se sabe que los granos de color amarillo y blanco no tienen la capacidad de biosintetizar y acumular antocianinas (Ford, 2000); sin embargo, algunos análisis bioquímicos del grano de maíz blanco y amarillo, mediante espectrofotometría, indican la presencia de antocianinas en el extracto (De la Parra *et al.*, 2007), lo cual, con base en los resultados mostrados en la Figura 7.2, no es posible atribuir esos valores a la presencia de estos pigmentos, sino más bien podrían ser otros compuestos que estén interfiriendo en las lecturas obtenidas. En el presente trabajo se midió la absorbancia a 700 nm, la cual corresponde a la absorbancia de la turbidez provocada por coloides del extracto, para ajustar la absorbancia de las antocianinas a 520 nm (Giusti y Wrolstad, 2001) en los progenitores y cruzas de grano pigmentado, al sustraerle la absorbancia del extracto del grano blanco.

Color de grano y concentración de antocianinas

El contenido de antocianinas fue alto en los progenitores azul-1 y rojo-1, con respecto al azul-2 y rojo-2 (Figura 7.3) así como en las cruzas rojo-1 x azul-1, rojo-1 x azul-2 y azul-2 x azul-1.

En general, los valores más altos (338 a 390 mg kg⁻¹) los mostraron las cruzas donde el progenitor rojo-1 fungió como hembra y los valores intermedios (161 a 270 mg kg⁻¹) se presentaron en las cruzas donde participó el progenitor rojo-2 como hembra y el progenitor rojo-1 como macho. Las cruzas que incluyeron al progenitor amarillo y blanco, en todos los casos, presentaron los valores más bajos (0 a 85 mg kg⁻¹).



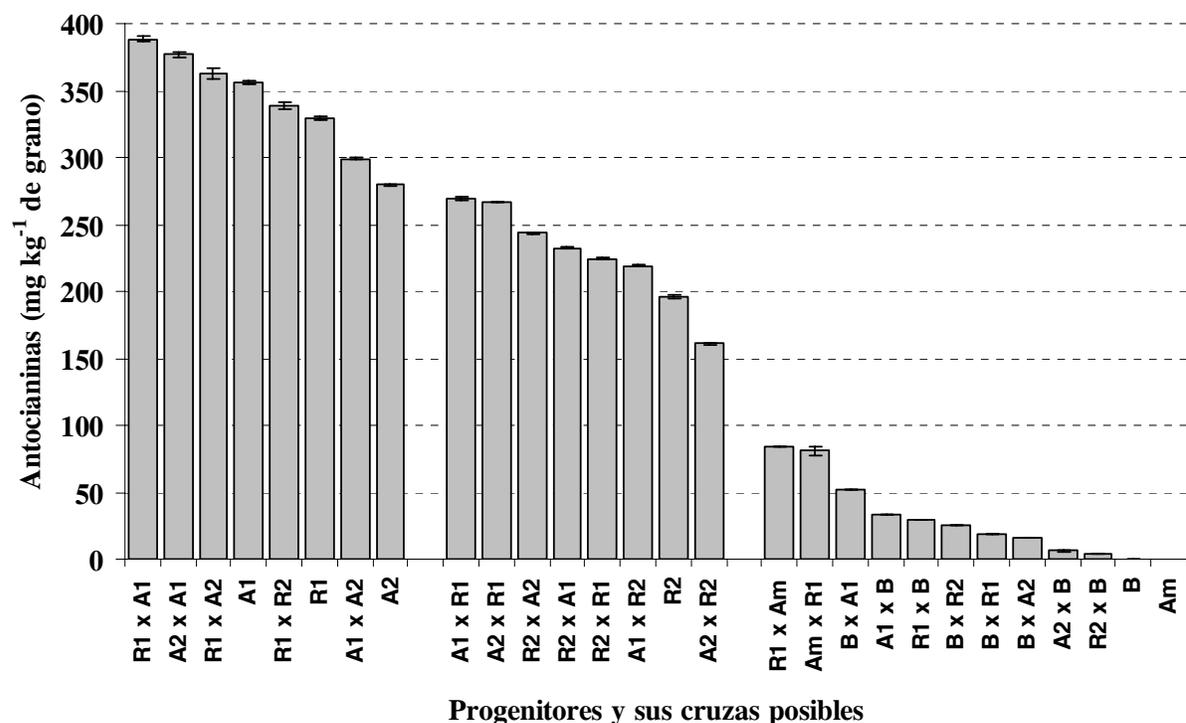


Figura 7. 3. Concentración de antocianinas en el grano de poblaciones criollas de maíz contrastadas en su color y en sus cruzas posibles. En cada barra se tiene el error estándar de tres repeticiones. R1= rojo-1, R2= rojo-2, A1= azul-1, A2=azul-2, Am= amarillo, B= blanco.

Las tres medidas del color del grano presentaron diferente grado de asociación con el contenido total de antocianinas (AT). La tonalidad (T) del grano de todas las cruzas y progenitores no tuvo relación con el contenido de antocianinas ($AT = -0.68T + 221.28$, $R^2=0.01$), con la luminosidad (L) la relación fue baja ($AT = -11.847L + 534.59$, $R^2=0.38$); en cambio, con la cromaticidad la relación fue mejor ($AT = -36.328C + 496.98$, $R^2=0.66$) (Figura 7.4). La mayor variabilidad de los valores de luminosidad, con respecto a la cromaticidad, se debe a la segregación de tonalidades de color del grano, como resultado de las cruzas entre los progenitores pigmentados con el progenitor amarillo y blanco.



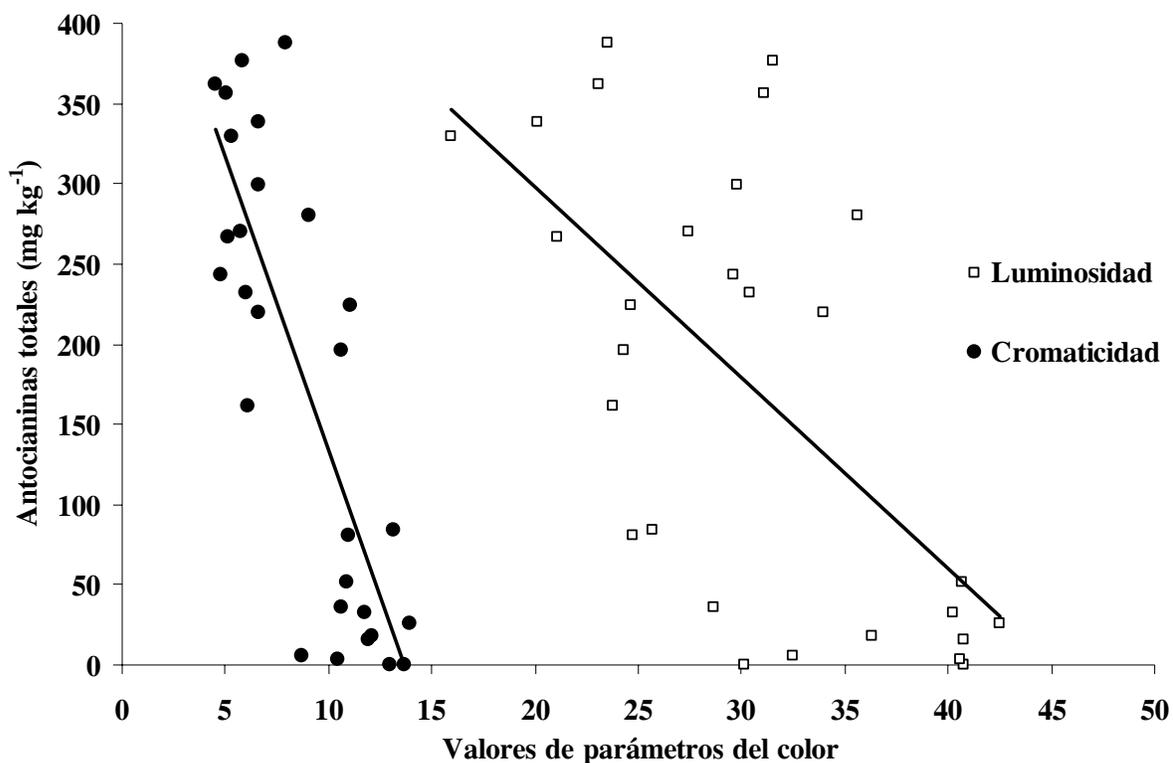


Figura 7.4. Relación entre la concentración de antocianinas en el grano con la cromaticidad en poblaciones y cruzas posibles de maíz.

Yang *et al.* (2007) midió el color del extracto del olote de maíz, usando el sistema colorimétrico CIE-Lab, encontrando correlación significativa de la cromaticidad del color con el contenido de antocianinas ($r=0.79$) y con la tonalidad ($r=0.92$). En otro estudio (Gazula *et al.*, 2007) en variedades de lechuga con diferentes tonalidades del follaje, de verde hasta rojo oscuro, encontraron un coeficiente de determinación (R^2) de 0.8, entre los valores de cromaticidad con la concentración de antocianinas en las hojas. Esto señala la posibilidad de obtener un modelo lineal con mayor ajuste entre el color de los extractos o de la harina con su contenido total de antocianinas, en poblaciones criollas de México de granos pigmentados.



El análisis de la distribución de las antocianinas en el pericarpio y en la capa de aleurona del grano de los dos progenitores con mayor contenido de antocianinas y sus cruzas, directa y recíproca, se muestra en la Figura 7.5. Se observa que el progenitor azul-1 acumuló el pigmento en la capa de aleurona (356.2 mg kg^{-1}), mientras que el rojo-1, lo concentró mayormente en el pericarpio (75 %) y en menor cantidad en la capa de aleurona, dando un total de 319.5 mg kg^{-1} . En la craza directa (rojo-1 x azul-1) la acumulación del pigmento fue proporcionalmente similar (casi 50 y 50 %) en el pericarpio y en la capa de aleurona, y la concentración total superó en 6 % al azul-1 y por 18.2 % al rojo-1; en cambio, en la craza recíproca (azul-1 x rojo-1) los granos presentaron menor contenido total de antocianinas (259.2 mg kg^{-1}), asociado principalmente al bajo contenido de pigmento en el pericarpio. Esto indica que hubo un efecto positivo del progenitor macho (azul-1) al presentarse en la craza directa una mayor acumulación de antocianinas en la capa de aleurona del grano del progenitor hembra (rojo-1).

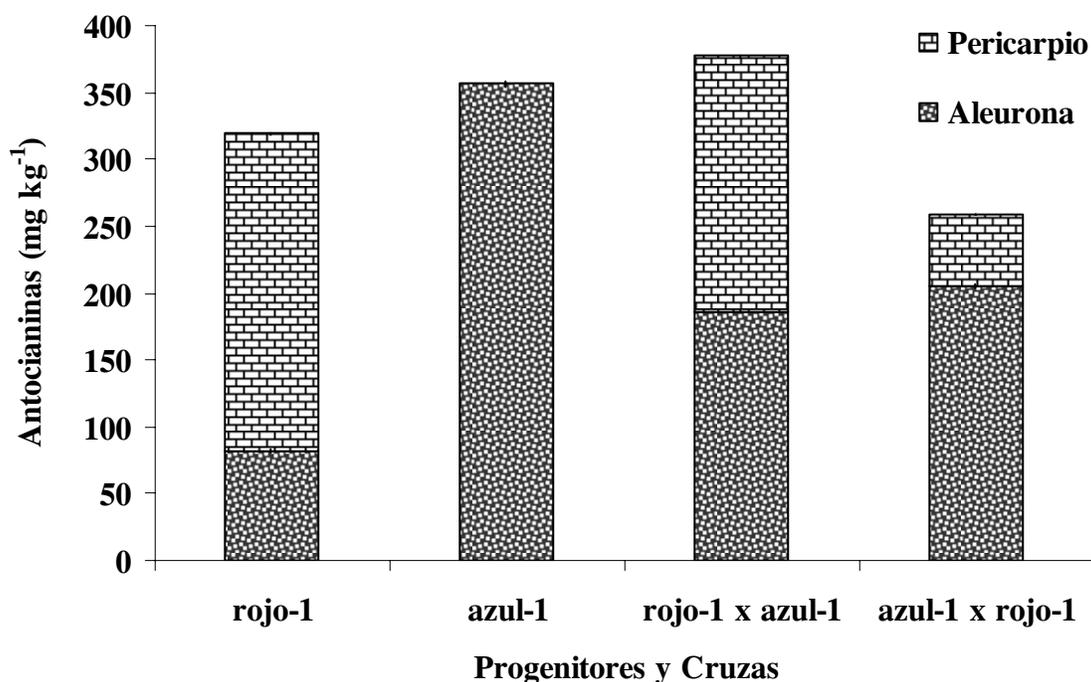


Figura 7.5. Contenido total de antocianinas y su distribución en las estructuras del grano de las poblaciones criollas azul-1, rojo-1 y sus cruzas.



El efecto de la dirección de la cruce se conoce como efecto recíproco y se ha observado en algunas variedades de maíz para caracteres agronómicos como diámetro del tallo y rendimiento de mazorca por planta (Mas *et al.*, 2001); así como para la concentración de almidón, aceite y proteína del grano (Letchworth y Lambert, 1998). Sin embargo, estudiar los efectos recíprocos en el caso del grano implica considerar los efectos genéticos del endospermo, del embrión y del citoplasma. El efecto recíproco en el endospermo puede explicarse por fenómenos epigenéticos, atribuibles, a genes sensibles a la dosis cromosómica, a factores de transcripción transmitidos maternalmente y a la actividad de productos codificados en organelos que se heredan maternalmente (Gonzalo *et al.*, 2007).

Tipos de antocianinas

La población de grano rojo-1 presentó las tres antocianinas básicas: cianidina, pelargonidina y peonidina, pero no malvidina, identificadas tanto en el extracto del grano completo como en el extracto de harina de pericarpio (Figuras 7.6 y 7.7); además, esta población (rojo-1) también presentó la versión acilada de cada una de estas tres antocianinas, lo que concuerda con los resultados de Jing (2006) y Jing *et al.* (2007) quienes analizaron el extracto de antocianinas del olote de una población de maíz de grano púrpura del Perú. A diferencia, González *et al.* (2008) reportan que en el pericarpio del grano de maíz púrpura (razas Peruano y Arrocillo) las antocianinas abundantes en el extracto fueron: cianidina-3-glucósido (27%), cianidina-3-malonil-glucósido (21%), peonidina-3-glucósido (12%) y peonidina-3-malonil-glucósido (9%). Por su parte, Abdel-Aal *et al.* (2006) identificaron, en extractos del grano completo, las antocianinas conformadas por cianidina, pelargonidina y peonidina, sin reportar la existencia de malvidina, lo cual está de acuerdo con lo encontrado en el presente estudio.

Las antocianinas encontradas en la población rojo-2 fueron del tipo cianidina glucosilada y cianidina acilada, cuya absorbancia fue notablemente mayor a pelargonidina glucosilada, pelargonidina acilada y a peonidina glucosilada; esta



última fue prácticamente nula en comparación con peonidina acilada (Figura 7.7). Las antocianinas que reportan Abdel-Aal *et al.* (2006) en maíz rojo son: cianidina > peonidina > pelargonidina.

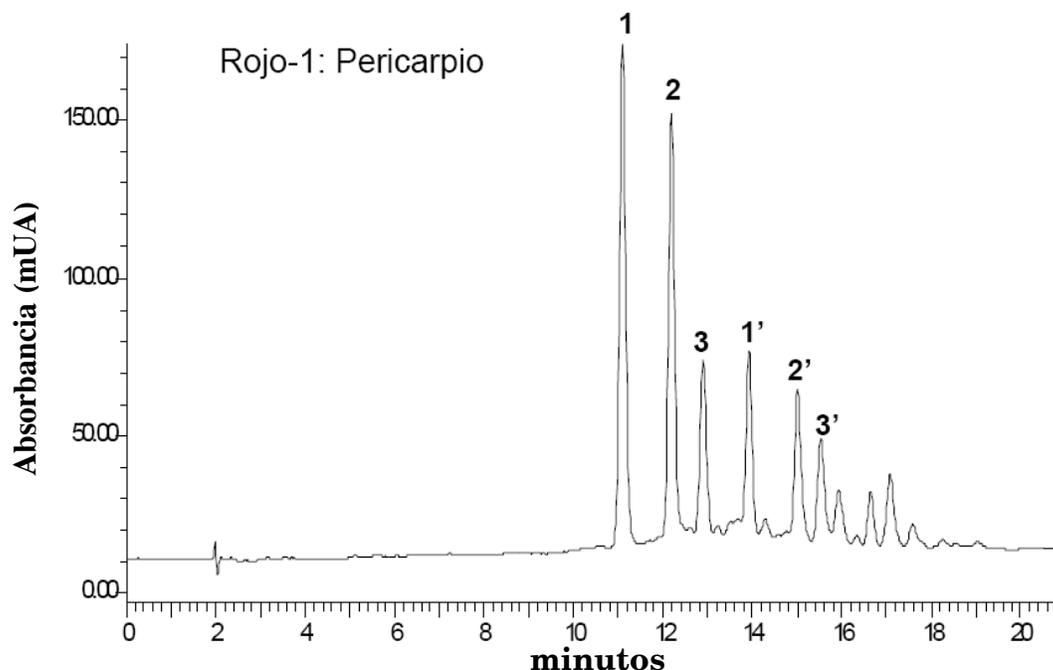


Figura 7.6. Antocianinas del pericarpio del grano de la población rojo-1. 1=Cianidina, 2=Pelargonidina, 3=Peonidina, glucosiladas. 1', 2' y 3' corresponden a las versiones aciladas de cada una de las antocianinas, respectivamente.

Las poblaciones azul-1 y azul-2 presentaron principalmente cianidina glucosilada (pico 1, de 25 a 30 miliunidades de absorbancia [mUA]) y cianidina acilada (Pico 1', 52 a 58 mUA) (Figura 7.8). Al respecto, Abdel-Aal *et al.* (2006) informan una mayor cantidad de antocianinas basadas en cianidina con respecto a pelargonidina y peonidina.

En general, el estudio de Abdel-Aal *et al.* (2006) revela que los maíces de color púrpura, azul y rojo contienen antocianinas conformadas por cianidina, pelargonidina y peonidina, no habiendo un tipo que los diferencie específicamente; por el contrario, sus diferencias se basan en las cantidades de cada tipo, ya que el azul se distingue por su mayor porcentaje de antocianinas del



tipo cianidina (glucosiladas y aciladas) y el rojo por su mayor cantidad de peonidina en relación al púrpura.

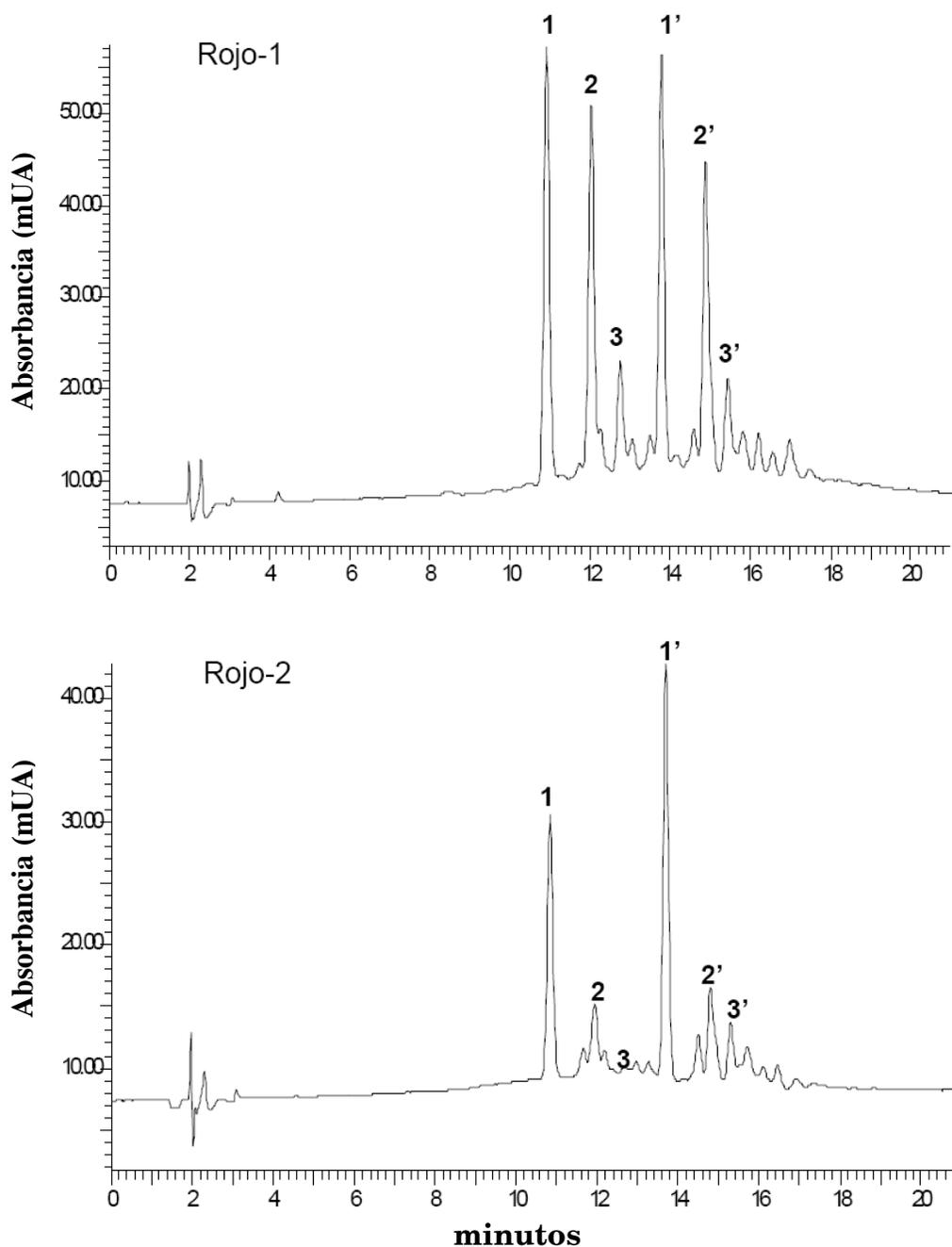


Figura 7.7. Antocianinas del grano de las poblaciones criollas rojo-1 y rojo-2. 1=Cianidina, 2=Pelargonidina, 3=Peonidina, glucosiladas. 1', 2' y 3' corresponden a las versiones aciladas de cada una de las antocianinas, respectivamente.



En el presente estudio se observó predominancia de las antocianinas basadas en cianidina acilada en los maíces azul-1, azul-2 y rojo-2, con respecto al rojo-1. El rojo-2 se diferenció de los azules en la menor cantidad de peonidina. En contraste, sólo la población rojo-1 presentó una mayor cantidad de antocianinas estructuradas de cianidina y pelargonidina, siendo mayor la absorbancia de las formas glucosiladas en comparación con las aciladas.

En la cruce rojo-1 x azul-1, los granos tuvieron los mismos tipos de antocianinas presentados por el progenitor hembra (Figura 7.7), sólo que la cantidad de las aciladas basadas en cianidina y pelargonidina fue mayor (>50 mUA) (Figura 7.9). En la cruce rojo-1 x azul-2, el patrón de absorbancia de los tipos de antocianinas fue similar al del progenitor macho (Figura 7.8). La diferencia con respecto al progenitor rojo-1 fue una mayor acumulación de cianidina acilada (>70 mUA). Una mayor absorbancia de cianidina (>60 mUA) y su versión acilada (>100 mUA) ocurrió en la cruce rojo-1 x rojo-2, con respecto al rojo-1.

Shiraishi *et al.* (2007), *in vivo* señalan que el color rojo tenue está asociado con la mayor acumulación de cianidina, el rojo intenso es un balance de cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina y malvidina; el rojo-morado posee la mayor cantidad de peonidina y malvidina; el morado oscuro tiene mayor cantidad relativa de cianidina y delphinidina glucosiladas; el azul resulta de delphinidina, mientras que el negro acumula casi exclusivamente malvidina. Estudios moleculares indican que los frutos verdes de la vid no presentan antocianinas, lo que se explica por la nula transcripción (ARN mensajero) de los genes estructurales de la ruta biosintética; en los rojos, la transcripción es 10 veces menor a la presentada en los genes de los frutos azul oscuro, los cuales acumulan abundantemente antocianinas del tipo delphinidina, petunidina y malvidina, correlacionando con una mayor expresión de los genes que codifican las enzimas flavonoide 3'-hidroxilasa (F3'H) y F3'5'H, flavonoide glucosil transferasa, glutatión s-transferasa y O-metil transferasa (Castellarin y Di Gaspero, 2007).



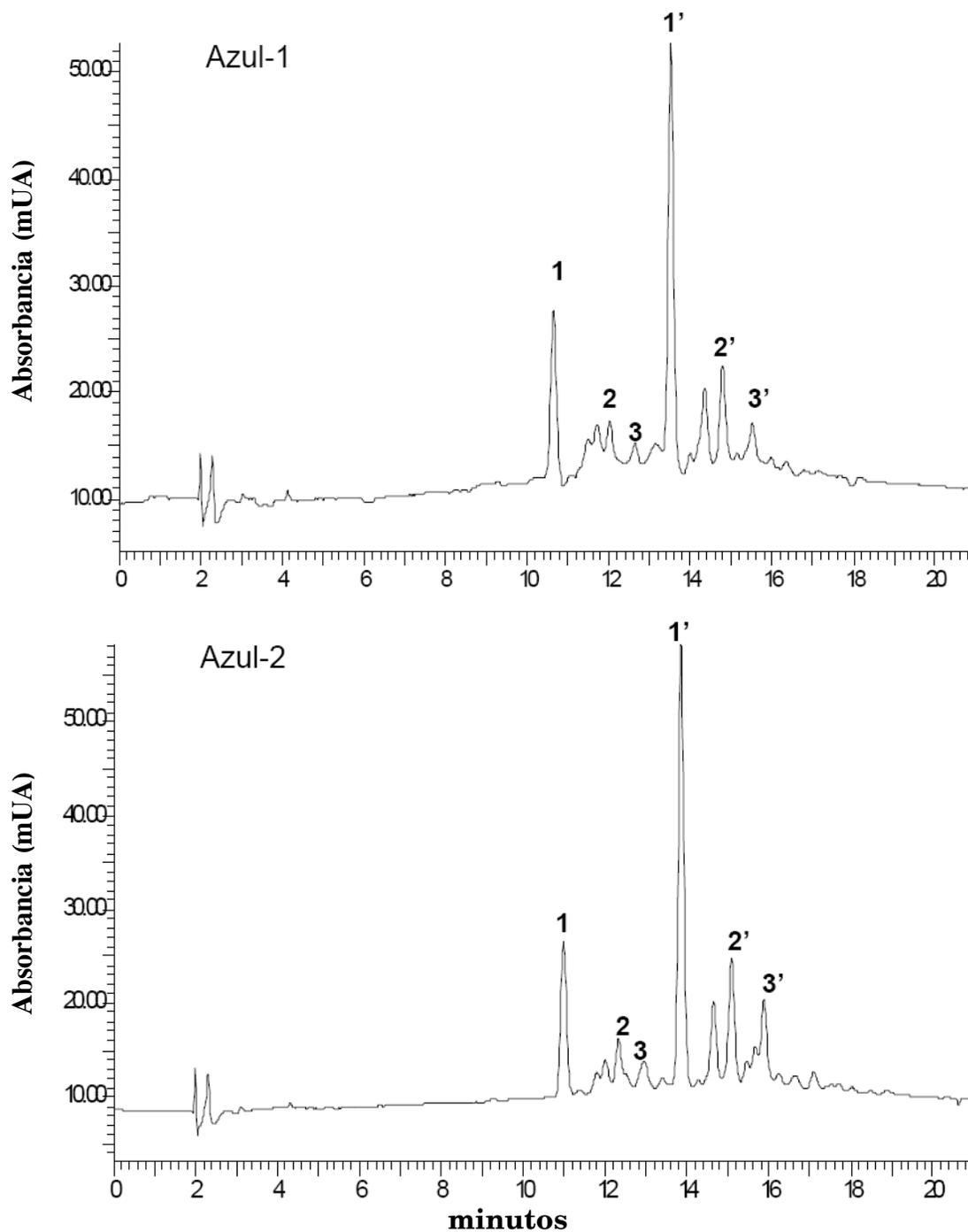


Figura 7.8. Antocianinas del grano de las poblaciones criollas azul-1 y azul-2. 1=Cianidina, 2=Pelargonidina, 3=Peonidina, glucosiladas. 1', 2' y 3' corresponden a las versiones aciladas de cada una de las antocianinas, respectivamente.



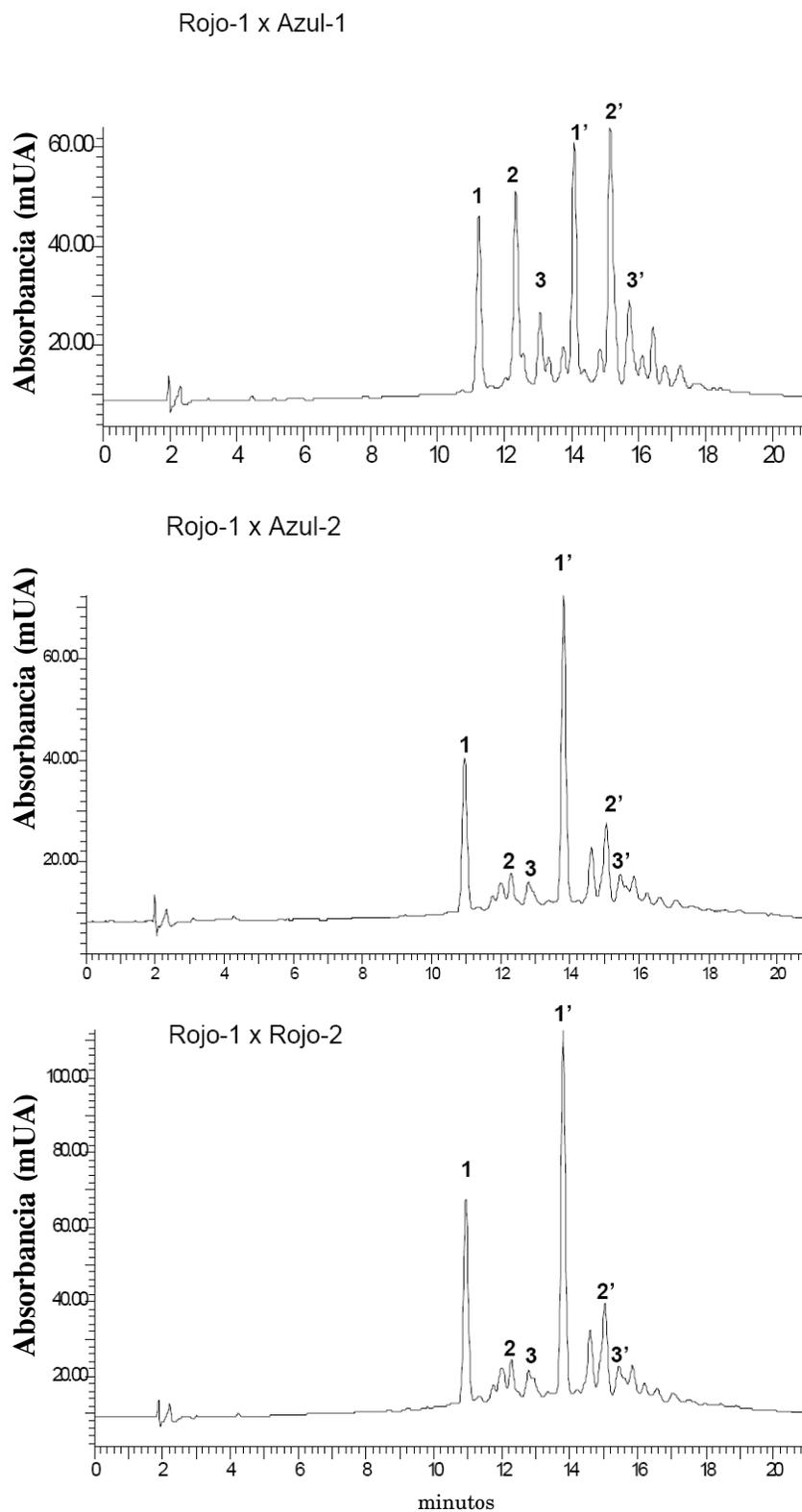


Figura 7.9. Antocianinas del grano de cruzas donde el progenitor rojo-1 fungió como hembra. 1=Cianidina, 2=Pelargonidina, 3=Peonidina, glucosiladas. 1', 2' y 3' son versiones aciladas de las antocianinas respectivas.



De esta manera, la mayor expresión de los genes estructurales tuvo correlación positiva con el contenido total de antocianinas, pero la expresión desigual de los genes tuvo relación con la proporción de cada tipo de antocianina, lo que finalmente explica la intensidad y la tonalidad del color de los frutos de la vid (Castellarin y Di Gaspero, 2007; Shiraishi *et al.*, 2007). A su vez, la mayor expresión de los genes estructurales se explicó por la intervención de los factores de transcripción (Castellarin y Di Gaspero, 2007). Además, tanto el contenido total como la cantidad de cada tipo de antocianina estuvo influenciado por el ambiente (Shiraishi *et al.*, 2007).

En la presente investigación, la ausencia de antocianinas basadas en malvidina confirma que la biosíntesis de su precursora, la delfinidina no ocurrió en el grano de las poblaciones y cruzas estudiadas. Con base en la ausencia de la delfinidina, Cone (2007) propuso que la ruta biosintética de antocianinas de maíz sólo tiene dos ramificaciones, a partir del sustrato dihidrocaemferol. Esto significa que la enzima F3'5'H, que dirige la rama hacia la delfinidina, no es funcional en las poblaciones estudiadas de maíz pigmentado. Además, los resultados sugieren que en el progenitor rojo-1, los genes estructurales que codifican las enzimas F3'H y dihidroflavonol reductasa (DFR) se expresaron en mayor nivel con respecto a las demás poblaciones, ya que se identificaron antocianinas del tipo cianidina, su derivada peonidina, y la pelargonidina. En las poblaciones de grano azul y rojo existió una predominancia de la enzima DFR sobre F3'H, ya que la absorbancia de las antocianinas basadas en cianidina superaron a los niveles de absorbancia de las basadas en pelargonidina. Además, los progenitores azules y rojos se distinguieron por la mayor absorbancia de las antocianinas tipo cianidina acilada, indicando una mayor conversión de la cianidina a la versión acilada por medio de las enzimas 3'-O-metil transferasas (Yu *et al.*, 2006).

Estos resultados indican que es necesario realizar estudios específicos para conocer la expresión de los genes estructurales y de los factores de transcripción que determinan las diferencias genéticas entre las poblaciones criollas de maíz de



granos azules y rojos y sus cruzas, además de correlacionar la actividad enzimática con la acumulación de cada tipo antocianina.

Actividad antioxidante

El método de la reacción del DPPH se considera sencillo y relativamente barato para estimar la actividad antioxidante de compuestos fenólicos, además de que ha permitido discriminar genotipos con base en esta propiedad química (Awika *et al.*, 2003). Al respecto, en la Figura 7.10 se observa que el extracto de antocianinas de la población rojo-1 tuvo alta actividad antioxidante (mayor a 90 %) en 30 min de reacción, en comparación con las cruzas rojo-1 x azul-1, azul-1 x rojo-1, rojo-1 x rojo-2 y azul-1.

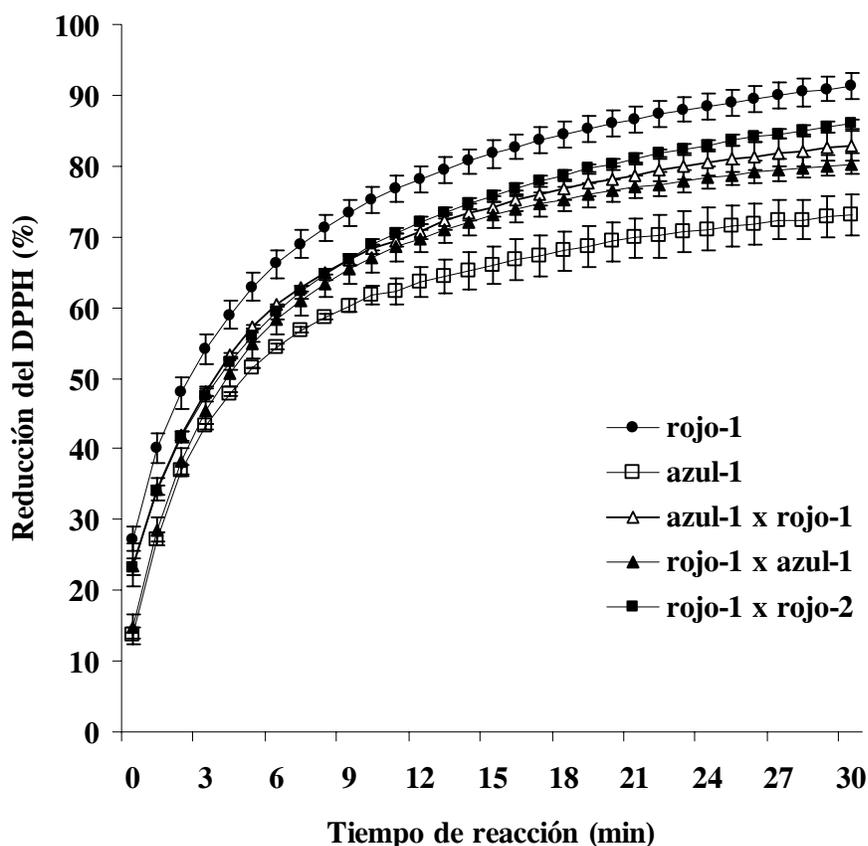


Figura 7.10. Actividad antioxidante del extracto de antocianinas de las poblaciones criollas rojo-1, azul-1 y algunas cruzas, sobresalientes por su mayor contenido de antocianinas.



La mayor actividad antioxidante del rojo-1 indica que además de la cianidina, la pelargonidina contribuyó a esa actividad, ya que en las demás poblaciones y cruza, la pelargonidina se presentó con valores bajos de absorbancia y también tuvieron mayor cantidad de cianidina acilada.

Nakajima *et al.* (2003) señalan que la mayor actividad antioxidante la presentan los aglucones, valores intermedios de actividad los presentan las antocianinas monoglucosiladas y los valores bajos las antocianinas aciladas, pero que la resistencia a la degradación por efecto de la luz fluorescente tiene un comportamiento inverso. Adicionalmente, Kuskoski *et al.* (2004) reportan que la delfinidina y cianidina presentan dos veces más actividad antioxidante que las basadas en peonidina, pelargonidina y malvidina; lo cual se debe al mayor número de grupos hidroxilo presentes en su estructura química.

Esta valoración de la calidad de los extractos indica que no sólo es importante la cantidad de antocianinas sino la proporción de cada tipo. Al respecto, estudios de las antocianinas extraídas del grano de arroz indican que la cianidina y su derivada peonidina tienen alta capacidad inhibitoria del crecimiento de células cancerosas (Chen *et al.*, 2005). Sin embargo, una comparación de varios tipos de antocianinas indicó que la mayor actividad antiangiogénica la presentó delfinidina (Lamy *et al.*, 2005). Otro estudio mostró que delfinidina y cianidina presentan actividad antiangiogénica, mientras que peonidina y malvidina no presentaron tal efecto (Oak *et al.*, 2006). Esto expone la necesidad de buscar en la variabilidad genética del maíz que presenta México, algunas variedades que contengan delfinidina.

CONCLUSIONES

Las poblaciones criollas de maíz contrastantes en color de grano presentaron diferencias en la concentración de antocianinas, sobresaliendo las poblaciones azul-1 y rojo-1 que acumularon la mayor cantidad de pigmento.



La cruza con mayor concentración de antocianinas (mg kg^{-1}) fue rojo-1 x azul-1, lo cual se explicó por una acumulación proporcional de antocianinas en el pericarpio y en la capa de aleurona. En cambio, las cruzas en las que intervino la población de grano amarillo y blanco presentaron el contenido más bajo del pigmento en el grano.

El contenido total de antocianinas en el grano tuvo asociación negativa con la cromaticidad del color del grano completo.

Las poblaciones azules y rojas acumularon antocianinas conformadas por cianidina, peonidina y pelargonidina, pero no presentaron malvidina. El progenitor rojo-1 tuvo mayor cantidad de antocianinas glucosiladas, basadas en cianidina, peonidina y pelargonidina, con respecto al azul-1, azul-2 y rojo-2. El rojo-2 presentó la menor acumulación de los tres tipos de antocianinas, particularmente la peonidina.

La actividad antioxidante no dependió de la cantidad total de antocianinas extraídas del grano, sino de la presencia de las antocianinas glucosiladas. La población rojo-1, al contar con antocianinas de este tipo presentó la actividad antioxidante más alta, mientras que la azul-1 y las cruzas entre éstas presentaron valores bajos, asociados a la mayor cantidad de antocianinas aciladas.

LITERATURA CITADA

Abdel-Aal E S M, J C Young and I Rabalski (2006) Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains. *J. of Agricultural and Food Chemistry* 54:4696-4704.

Andersen O M and M Jordheim (2006) The Anthocyanins. In: M Andersen and K R Markham (eds.) *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications*. Taylor & Francis Group, LLC, USA. pp 472-551.

Aoki H, N Kuze and Y Kato (2002) Anthocyanins isolated from purple corn (*Zea mays* L.). *Foods and Food Ingredients Journal of Japan*. 199:41-45.



- Awika J M, L W Rooney, X Wu, R L Prior and L Cisneros Z (2003)** Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *J. Agric. Food Chem.* 51:6657-6662.
- Castellarin S D and G Di Gaspero (2007)** Transcriptional control of anthocyanin biosynthetic genes in extreme phenotypes for berry pigmentation of naturally occurring grapevines. *BMC Plant Biology* 7:46-56.
- Chen P N, S C Chu, H L Chiou, C L Chiang, S F Yang and Y S Hsieh (2005)** Delphinidin, a dietary anthocyanidin, inhibits vascular endothelial growth factor receptor-2 phosphorylation. *Carcinogenesis* 27(5):989–996.
- Cone K C (2007)** Anthocyanin synthesis in maize aleurone tissue. *Plant Cell Monographs* 8:121-139.
- Cortés G A, Y Salinas M, E San Martín M and F Martínez B (2006)** Stability of anthocyanins of blue maize (*Zea mays* L.) after nixtamalization of separated pericarp-germ tip cap and endosperm fractions. *Journal of Cereal Science* 43: 57–62.
- Crocker W (1916)** Anthocyanins. *Botanical Gazette* 61(4): 349-352.
- De La Parra C, S O Serna S and R H Liu (2007)** Effect of processing on the phytochemical profiles and antioxidant activity of corn for production of masa, tortillas, and tortilla chips. *J. Agric. Food Chem.* 55:4177-4183.
- De Pascual T S, C Santos B and J C Rivas G (2002)** LC-MS analysis of anthocyanins from purple corn cob. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82(9): 1003-1006.
- Escribano B M T, C Santos B and J C Rivas González (2004)** Anthocyanins in cereals. *Journal of Chromatography* 1054(A):129-141.
- Ford R H (2000)** Inheritance of kernel color in corn: explanations & investigations. *The American Biology Teacher* 62(3):181-188.
- Gazula A, M D Kleinhenz, J C Scheerens and P P Ling (2007)** Anthocyanin levels in nine lettuce (*Lactuca sativa*) cultivars: influence of planting date and relations among analytic, instrumented, and visual assessments of color. *Hortscience* 42(2):232–238.
- Giusti M M and R E Wrolstad (2001)** Anthocyanins. Characterization and measurement with UV-visible spectroscopy. In: R E Wrolstad (Ed.) *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. New York: Wiley. pp: 1-13



- Gonzalo M, T J Vyn, J B Holland and L M McIntyre (2007)** Mapping reciprocal effects and interactions with plant density stress in *Zea mays* L. *Heredity* 99(1):14-30.
- González M S, J J Pérez A, Y Salinas M, N Mateus, A M S Silva, V de Freitas and C Santos B (2008)** Flavanol-anthocyanin pigments in corn. NMR characterisation and presence in different purple corn varieties. *Journal of Food Composition and Analysis* (in press).
- Halbwirth H, S Marles, U Wienand, G Forkman and K Stich (2003)** Biochemical formation of anthocyanins in silk tissue of *Zea mays*. *Plant Science* 164:489-495.
- Harborne J B (1958)** Spectral methods of characterizing anthocyanins. *Biochem. J.* 70:22-28.
- Irani N G, J M Hernández and E Grotewold (2003)** Regulation of anthocyanin pigmentation. *Recent Advances in Phytochemistry* 37:59-78.
- Jing P, V Noriega, S J Schwartz and M M Giusti (2007)** Effects of growing conditions on purple corn cob (*Zea mays* L.) anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 55(21):8625-8629.
- Jing P (2006)** Purple corn anthocyanins: chemical structure, chemoprotective activity and structure/function relationships. Ph. D. Dissertation, Ohio State University, USA. 287 p.
- Kuskoski E M, A G Asuero, M C García P, A M Troncoso y R Fett (2004)** Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas* 24(4):691-693.
- Lamy S, M Blanchette, J Michaud L, R Lafleur, Y Durocher, A Moghrabi, S Barrette, D Gingras and R Béliveau (2005)** Cyanidin 3-glucoside and peonidin 3-glucoside inhibit tumor cell growth and induced apoptosis *in vitro* and suppress tumor growth *in vivo*. *Nutrition and Cancer* 53(2):232-243.
- Letchworth M B and R J Lambert (1998)** Pollen parent effects on oil, protein, and starch concentration in maize kernels. *Crop Sci.* 38:363-367.
- Mas M T, L Bosch, F Casañas, J Valero y F Nuez (2001)** Efectos recíprocos en semiexóticos de maíz (*Zea mays* L.). *Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg.* 16(3):417-428.
- McGuire R G (1992)** Reporting objective color measurements. *Horticultural Science* 27: 1254-1255.



- Nakajima N, M Sugimoto, H Yokoi, H Tsuji and K Ishihara (2003)** Comparison of acylated plant pigments: light-resistance and radical-scavenging ability. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67(8):1828–1831.
- Oak M H, J E Bedoui, S V F Madeira, K Chalupsky and V B Schini K (2006)** Delphinidin and cyanidin inhibit PDGFAB-induced VEGF release in vascular smooth muscle cells by preventing activation of p38 MAPK and JNK. *British Journal of Pharmacology* 149:283-290.
- Pedreschi R and L Cisneros Z (2006)** Antimutagenic and antioxidant properties of phenolic fractions from Andean purple corn (*Zea mays* L.). *J. Agric. Food Chem.* 54:4557-4567.
- Ron P J, J de J Sánchez G, A A Jiménez C, J A Carrera V, José G Martín L, M M Morales R, L de la Cruz L, S A Hurtado de la P, S Mena M y J G Rodríguez F (2006)** Maíces nativos del occidente de México I. *Scientia-CUCBA* 8(1):1–139.
- Salinas M Y, G Salas S, D Rubio H and N Ramos L (2005)** Characterization of anthocyanin extracts from maize kernels. *Journal of Chromatographic Science* 43:483-487.
- Salinas M Y, F Martínez B, M Soto H, R Ortega P y J L Arellano V (2003)** Efecto de la nixtamalización sobre las antocianinas del grano de maíces pigmentados. *Agrociencia* 37:617-628.
- Shahidi F and M Naczk (2004)** Phenolic in Food and Nutraceuticals. CRC Press. N. Y. USA. 354 p.
- Shiraishi M, M Yamada, N Mitani and T Ueno (2007)** A rapid determination method for anthocyanin profiling in grape genetic resources. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 76(1):28–35.
- Yang Z, G Fan, Z Gu, Y Han and Z Chen (2007)** Optimization extraction of anthocyanins from purple corn (*Zea mays* L.) cob using tristimulus colorimetry. *European Food Research and Technology* 227(2):409-415.
- Yu O, M Matsuno and S Subramanian (2006)** Flavonoid compounds in flowers: genetics and biochemistry. *In: T Da Silva (ed) Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology. Volume I.* Global Science Books, UK. pp 282-292.



VIII. DISCUSIÓN GENERAL

Fisiología y genética de las antocianinas

Es común observar la expresión fenotípica debida a las antocianinas en la mayoría de los órganos de la planta de maíz: tallo, hojas, espiga, brácteas, olote y grano, principalmente; por eso, es importante conocer los avances logrados en el estudio de la ruta de biosíntesis de estos pigmentos. El conocimiento científico sobre las enzimas y su función se ha desarrollado en varias especies y no exclusivamente en maíz (Grotewold, 2006), por lo que el entendimiento general de la ruta de biosíntesis en el presente trabajo surgió del análisis de la información disponible hasta el momento.

Los estudios pioneros sobre el color de los órganos de la planta se hicieron en *Pisum* con el fin de analizar la aparición del color a través de generaciones después de hacer cruza entre variedades contrastantes en color de la flor, de la testa y de la semilla. Se descubrió que la pigmentación fue dominante sobre el color blanco de la flor, sobre el blanco de la testa y el verde de la semilla, siguiendo reglas proporcionales precisas. Sin embargo, en la cruza hechas en *Phaseolus* se desarrollaron varias tonalidades de la flor, indicando que varias formas gaméticas explicaban el carácter y cada una de ellas seguía la regla proporcional 3:1 (dominante:recesivo) (Mendel, 1866). En aquella época, el trasfondo de la investigación de Mendel fue la demostración de la variabilidad que se genera en los híbridos, descartando que la hibridación fuera un mecanismo de especiación.

Con respecto al carácter de pigmentación, los primeros trabajos en maíz (Shull, 1911; East, 1912; Emerson, 1912) consideraron que el color del pericarpio (rojo, amarillo oscuro, variegado e incoloro), el de la aleurona (azul, rojo y blanco), y el del endospermo (amarillo y blanco), eran caracteres de comportamiento Mendeliano. Desde entonces, el número de alelos descubiertos como responsables



de la pigmentación fue incrementándose, al observar en las poblaciones criollas colectadas una variación en el patrón de pigmentación de la aleurona (Kempton, 1919) y del pericarpio (Hayes, 1917). Los factores más estudiados en ese tiempo fueron *P* (púrpura, también simbolizado como *Pr*), *R* (rojo) y *C* (sin color), y en determinados casos se encontró que las combinaciones alélicas de estos factores producían granos segregantes con intensidad gradual de color, desde el blanco hasta el púrpura (Coulter, 1920).

De los siete alelos del color del pericarpio descubiertos hasta entonces, algunos manifiestan dominancia completa y otros dominancia incompleta. En el caso de la capa de aleurona, además de los cinco alelos asociados a la acumulación de antocianinas, se encontraron otros seis que alteran la intensidad y distribución del pigmento; uno de ellos se expresa dependiendo del progenitor que lo hereda (Lindstrom, 1923), particularmente un alelo originaba granos moteados al transmitirse por el macho (Coulter, 1920). Por otro lado, Fujii y Kuwada (1916) mencionan que en el estudio inicial del color del grano de maíz no se considera al endospermo como portador de tres juegos de cromosomas ($3n$), por lo que el entendimiento Mendeliano de los caracteres del endospermo, p.e. el color, no fue completo. Así, el número de alelos en el endospermo y en la capa de aleurona están triplicados, dos de los cuales son aportados por el progenitor femenino y uno por el masculino, por lo que la intensidad del color está en función del número de alelos dominantes (de 0 a 3) presentes en la constitución genética del endospermo, dando lugar a cuatro clases de intensidad para un locus. Considerando este principio, también es factible entender que una mayor influencia genética materna es la explicación de las diferencias encontradas entre cruza recíprocas.

Se sabe que la biosíntesis de estos pigmentos se desarrolla en una ruta compleja, donde los dos sustratos iniciales son la malonil-CoA, derivada de la acetil CoA de la mitocondria, y la cumaril-CoA derivada del aminoácido fenilalanina. A partir de los dos sustratos se desencadena la serie de reacciones donde intervienen ocho



enzimas: chalcona sintetasa, chalcona isomerasa, flavonoide hidroxilasas (tres enzimas), dihidroflavonol reductasa, antocianidina sintetasa y flavonoide glucosil transferasa, que dan origen a tres antocianinas básicas: cianidina-3-glucósido, pelargonidina-3-glucósido y delphinidina-3-glucósido (Irani *et al.*, 2003).

Después de que se realiza la biosíntesis en el citoplasma, las antocianinas son transportadas hasta la vacuola, envueltas en membranas derivadas del retículo endoplásmico. También se conjugan con glutatión, por medio de la enzima glutatión s-transferasa, con lo cual penetran la membrana de la vacuola ayudadas por un transportador (Kitamura, 2006). Una vez en la vacuola, estas moléculas son transformadas estructuralmente, cuando las enzimas flavonoide glucosiltransferasas unen moléculas de glucosa y grupos acilo (ácidos orgánicos) mediante las aciltransferasas, brindando mayor solubilidad, estabilidad e intensidad del color a las antocininas (Tanaka *et al.*, 2008). Esto indica que los procesos primarios del metabolismo, como la fotosíntesis, contribuyen con la glucosa para la conformación química de las antocianinas. También el metabolismo de los aminoácidos es relevante, ya que la fenilalanina es un sustrato para la ruta de los flavonoides, parte de éstos son las antocianinas, y para la ruta de biosíntesis de lignina (Andersen *et al.*, 2008)

Actualmente se sabe que la ruta de biosíntesis y sus enzimas participantes se deben a la presencia de siete genes estructurales y seis genes reguladores de su transcripción (Cone, 2007). Se han logrado avances sustanciales en la genética molecular tanto en maíz como en otras especies, particularmente en ornamentales donde el color de la flor es de importancia. La investigación reciente está enfocada en el estudio de los genes reguladores, ya que son los que determinan la intensidad del color ocasionada por una mayor acumulación de los pigmentos.



Agrupamiento de poblaciones criollas por su color de grano

Son aún escasos los estudios en maíz dirigidos al desarrollo de prácticas agronómicas que se relacionen con una mayor concentración de antocianinas por kg de grano (Jing, 2007). Con estos antecedentes, este trabajo se llevó a cabo con el fin de entender la variabilidad en colores de grano observada entre poblaciones criollas de maíz de México.

El color de grano del maíz es un carácter que se ha estudiado sólo en una escala visual subjetiva, como la que Alvarez y Lasa (1990 a y b) usaron: 1= blanco hasta 8= púrpura. Se ha encontrado que la forma y color del grano, el número de hileras, color de olote y longitud de la mazorca, presentan los más altos valores de repetibilidad, lo que permite considerarlos en la caracterización de poblaciones.

En la primera fase de la presente investigación se cuantificó el color del grano de 114 poblaciones criollas, colectadas en varios estados de la República Mexicana, adaptadas a los Valles Altos Centrales de México y evaluadas agronómicamente en el Campo Agrícola Experimental Montecillo, en el Colegio de Postgraduados; es decir, que pasaron por una etapa de premejoramiento (Nass y Paterniani, 2000). A partir de esta etapa las mejores poblaciones se clasificaron con base en su precocidad y color de grano (Cuadro 8.1).

Cuadro 8.1. Poblaciones criollas de maíz clasificadas por su color de grano. Montecillo, 2003.

Ensayo (Número)	Poblaciones (Número)	Características de mazorca y ciclo de vida
1	30	Grano blanco, precocidad intermedia
2	27	Granos blancos y amarillos, precocidad intermedia
3	22	Granos blancos y amarillos, super precoces
4	17	Granos rojos y azules, precocidad intermedia
5	18	Grano rojos y azules, super precoces



Además de los caracteres agronómicos, el interés del estudio fue analizar la variabilidad del color de grano entre las 114 poblaciones criollas, por medio de un colorímetro que cuenta con el sistema CIELab, cuyas lecturas permiten derivar algunos parámetros cuantitativos (tonalidad y cromaticidad), siguiendo la sugerencia de McGuire (1992); además se comparó con una escala visual del color (1=blanco hasta 8=púrpura), analizando las variables cuantitativas del color junto con la escala visual, mediante la técnica multivariada de componentes principales y de agrupamiento. Se encontró que la variabilidad entre poblaciones se clasifica en seis patrones de color: blanco, amarillo, anaranjado, rojo, azul y púrpura. Dentro de cada grupo hubo variabilidad en características agronómicas, indicando que es factible modificar las variables del desarrollo vegetativo y reproductivo, independientemente del color de grano. Similarmente, se ha encontrado que el color del grano es independiente de las características agronómicas y de calidad (Revilla *et al.*, 2008).

La aplicación de técnicas multivariadas para agrupar variedades con base en el color y forma de los granos, usando componentes principales y de agrupamiento se ha hecho en *Linum usitatissimum* (Dana e Ivo, 2008), particularmente se ha analizado la luminosidad (L), el valor “a”, de verde a rojo y el valor “b”, de azul a amarillo, así como algunas variables de la forma del grano. Con el mismo enfoque se han hecho estudios en *Byrsonima crassifolia* para frutos y semillas (Martínez *et al.*, 2005). En *Ipomoea batatas* el valor de L y el cociente b/a han permitido clasificar clones y después de las determinaciones del tipo de antocianinas se han encontrado diferencias entre grupos (Yoshinaga *et al.*, 1999). También, en el estudio de Salinas *et al.* (2003), en maíces de grano azul y rojo, se midió el color de la harina cruda y nixtamalizada, obteniendo los valores de L, los valores de las escalas del color de “a” y de “b”, pero no se obtuvo, como se hizo en el presente estudio, la cromaticidad y la tonalidad, que permiten una interpretación objetiva del color del grano producido por las antocianinas.



Análisis del efecto materno en la generación F₁ semilla

A partir de la agrupación de poblaciones por color de grano (Espinosa, *et al.*, 2006), dentro de los grupos se seleccionaron seis poblaciones: una del blanco y otra del amarillo, ambas originarias del Estado de México; del rojo, el rojo-2, del Estado de Puebla; dos poblaciones del grupo azul (azul-1, del Estado de Tlaxcala, y azul-2 del Estado de Hidalgo) y una del grupo púrpura el rojo-1, ésta es una población estable derivada de la cruce entre el morado peruano con una población azul criolla del Estado de Querétaro. La denominación de los colores se hizo debido a que el púrpura y el rojo, así como los azules, se diferenciaban en la intensidad del color, de tal manera que el número uno se asignó al color más intenso y el número dos al más tenue. También se consideraron los colores amarillo y blanco como poblaciones testigo, suponiendo que su estructura genética recesiva reprime su capacidad de producir antocianinas (Ford, 2000). Estas seis poblaciones tuvieron periodos de floración similares para facilitar su polinización en el sistema de cruzamientos dialélicos aplicados.

El análisis de las cruces posibles (directas y recíprocas) entre un grupo de progenitores permite verificar si un progenitor tiene el mismo efecto al participar como macho o como hembra y si la cruce simple (directa) entre un par de progenitores es similar a su cruce recíproca (Yates, 1947). Cuando el interés es denotar el comportamiento de los progenitores en sus cruces (habilidad o aptitud combinatoria), se planea una serie de cruzamientos entre los progenitores con otro grupo de poblaciones testigo o probadores, de tal manera que se busca aquel progenitor que tenga efectos positivos en sus cruces (los de mejor combinación), dependiendo de la característica bajo estudio (Hayes, 1946); lo que Sprague y Tatum (1942) denominaron aptitud combinatoria general (ACG). También, en el análisis estadístico de las cruces es importante detectar las mejores o peores combinaciones con respecto al comportamiento promedio de sus progenitores, lo que se denomina aptitud combinatoria específica (ACE). Así, la ACG y la ACE son



indicadoras de la acción génica aditiva o de dominancia, incluyendo la epistasis, respectivamente (Sprague y Tatum, 1942).

Griffing (1956) propuso varios métodos y modelos estadísticos para determinar los efectos de ACG y ACE, en función de los intereses del investigador y del carácter bajo estudio. Sin embargo, la extensión del análisis de varianza para determinar el efecto materno y recíproco sobre la variación fenotípica la sugirieron Corey *et al.* (1976), teniendo en cuenta que la ACG y ACE hacen referencia a efectos de los genes ubicados en el núcleo, mientras que los efectos maternos se derivan de la influencia del microambiente generado por el tejido materno durante el desarrollo de la semilla y de la influencia del citoplasma. En este sentido, Zhu y Weir (1994) interpretan como efectos extranucleares al efecto del tejido materno y el efecto citoplásmico, los cuales se engloban como efecto recíproco (ER) en los modelos de Griffing (1956); además, plantearon un modelo propio aplicado al análisis de características fenotípicas de frutos con endospermo triploide.

En la segunda fase de la presente investigación se formaron las cruzas directas y recíprocas para obtener la semilla F_1 , en la cual se midió el contenido de antocianinas y el tamaño, tanto del grano completo como de sus estructuras de almacenamiento de antocianinas: pericarpio y capa de aleurona, luego se estimaron estadísticamente los efectos maternos y de aptitud combinatoria (ACG y ACE) sobre la acumulación del pigmento y del tamaño de sus estructuras. De acuerdo con Wright (1985), los diseños dialélicos permiten analizar un sistema de cruzamientos entre progenitores, cuyo análisis puede conducirse en tres niveles: 1) la aptitud combinatoria general y específica, 2) los componentes de la varianza genética (aditividad o dominancia), y 3) la varianza aditiva. En los últimos dos niveles de análisis se requiere que las poblaciones tengan herencia diploide, que no haya epistasis ni efectos maternos o recíprocos, que presenten cierto nivel de homocigosis, equilibrio de ligamiento y que existan dos alelos por locus. Dado que pocos casos cubren estos requisitos, la mayoría de los análisis dialélicos se



enfocan a la estimación de la aptitud combinatoria general y específica (Baker, 1978).

La ruta de biosíntesis de las antocianinas en maíz implica, según McMullen (2001) y Springer y Stupar (2007), a genes estructurales cuya transcripción es regulada por otros genes, lo que evidencia la presencia de epistasis. Adicionalmente, cuatro genes estructurales (*c2*, *chi*, *a1* y *c1*) y dos reguladores (*c1* y *r1*) presentan más de dos alelos (Cuadro 2.3, Capítulo III).

En la presente investigación se determinaron los efectos de aptitud combinatoria y maternos. Las variables medidas en el grano F₁ fueron: contenido de antocianinas (mg kg⁻¹, mg 1000⁻¹ granos), grosor del pericarpio y de la capa de aleurona (μ). En esta generación, el pericarpio fue totalmente de origen materno, pues fue derivado del ovario (Earp, 2004) y la capa de aleurona, junto con el endospermo, fueron desarrollados a partir de la combinación genética entre los progenitores (Becraft y Crabb, 2000) implicados en el sistema dialélico. El análisis estadístico detectó efectos maternos, lo que concuerda con el progenitor rojo-1 que presentó la mayoría de su pigmento en el pericarpio y en menor cantidad en la aleurona; en el caso opuesto, los progenitores azules (azul-1 y azul-2) acumularon el pigmento en la capa de la aleurona, mientras que el progenitor rojo (rojo-2) tuvo pigmento en ambas estructuras, pero en menor cantidad que la de los anteriores progenitores. Los progenitores de color blanco y amarillo definitivamente no tuvieron antocianinas.

Como se esperaba, el progenitor que fungió como hembra tuvo efectos significativos en la acumulación de antocianinas en el pericarpio y en la aleurona, lo cual se reflejó en un mayor efecto genético aditivo del progenitor rojo-1 sobre el contenido de antocianinas en el grano completo, mientras que el progenitor azul-1 sólo influenció la acumulación del pigmento en la capa de aleurona. El efecto materno sobre la acumulación de antocianinas fue postulado por Fujii y Kuwada



(1916) y posteriormente ratificado por Larson *et al.* (1986) al relacionar una mayor dosis del gene *Pr*, aportada por el progenitor materno con la actividad de la enzima flavonoide-3'-hidroxilasa y con la acumulación de cianidina-3-glucósido en la capa de aleurona.

Tomando en cuenta que el grano es producto de los genomas de ambos progenitores, su desarrollo es susceptible a varias influencias: 1) la interacción entre factores maternos con genes del cigoto, 2) la interacción del tejido materno con los tejidos cigóticos (embrión y endospermo), y 3) la interacción del embrión con el endospermo. En particular, los efectos maternos son evidentes tanto en el embrión como en el endospermo y se ejercen vía gametofítica o esporofítica (tejidos del óvulo). El efecto gametofítico materno es factible cuando un factor citoplásmico se deposita en la célula central o en la célula huevo causando alguna mutación, por un efecto de dosis o por la presencia de impresión génica (efecto del progenitor). El efecto esporofítico tiene impacto a través del desarrollo de los tegumentos, que dan lugar a la testa, o de la pared del ovario, que da lugar al pericarpio (Spillane *et al.*, 2002).

El destacado efecto materno sobre la acumulación de antocianinas encontrado en la generación F₁ semilla, indica que las poblaciones usadas como hembra, con antocianinas en el pericarpio, tendrán un efecto positivo sobre el carácter cuando participen en las cruzas recíprocas. También estos resultados significan que el pericarpio y la aleurona son tejidos de acumulación del pigmento, por lo que es deseable que su tamaño y grosor sean mayores en la hembra. En contraste, el progenitor macho no tuvo influencia significativa en esta generación filial; sin embargo, varios estudios han demostrado que el polen y sus genes tienen efecto en el tamaño del grano; es decir, un efecto de heterosis a nivel de grano, por lo que se esperaría incrementar el potencial de acumulación de antocianinas por efecto de un mayor tamaño de grano.



Dado que hubo diferencias entre progenitores en el contenido de pigmento por kg de grano, el estudio indicó que el agrupamiento de las poblaciones apoyado en los parámetros del color, permitió definir grupos con diferente contenido de antocianinas. Con base en estos resultados, se planeó la tercera fase de la investigación para obtener la F₂ semilla, esperando que la recombinación de los genes diera lugar a cruzas sobresalientes puesto que se tuvieron progenitores contratantes en la cantidad y ubicación del pigmento en las estructuras del grano.

Aptitud combinatoria de la acumulación de antocianinas en la generación F₂

En la tercera fase de este estudio, se cuantificó el contenido de antocianinas en el grano entero y se determinaron los componentes del rendimiento de grano, para estimar el rendimiento de pigmento por hectárea y verificar la existencia de cruza sobresalientes. Aplicando el mismo modelo estadístico (Griffing, 1956) se encontró la mayor contribución de los efectos aditivos de los genes sobre el rendimiento de antocianina por planta, con respecto a los maternos.

Desde la perspectiva del mejoramiento genético, un dialélico es un sistema de cruzamientos que implica las cruza posibles entre un grupo de poblaciones, y se usa para el estudio de caracteres poligénicos. Los progenitores pueden ser individuos de una variedad de polinización libre, de una generación F₂ o de líneas altamente homocigóticas, de manera que los resultados obtenidos, son útiles en la planeación del mejoramiento genético intrapoblacional, interpoblacional o de hibridación (Soriano, 1999; 2000).

En este trabajo, el contenido de antocianinas en el grano se consideró como una variable cuantitativa, dado que el material genético usado consistió de poblaciones criollas, posiblemente portadoras de varios alelos de los genes de la ruta de biosíntesis de las antocianinas. Uno de los genes reguladores, el *R*, tiene alelos que causan variabilidad en el patrón de pigmentación de la aleurona, con lo



cual se generan tonalidades en el color del grano (Chandler y Stam, 2004), relacionadas con cambios en el contenido de antocianinas (Van der Walt y Brink, 1969). El contenido del pigmento está sujeto a más variación, ya que el pericarpio es otra estructura que contribuye al contenido de antocianinas por grano. Adicionalmente, algunos genes estructurales y algunos reguladores están sujetos a cambios en sus secuencias génicas por efecto de transposones, con lo cual se desarrollan variados patrones de pigmentación en la aleurona (Patterson *et al.*, 1991; Chang *et al.*, 2005; Edwards *et al.*, 2001). La variación observada en la segregación de tonalidades del presente estudio pudo estar influida por varios factores genéticos, lo cual se reflejó en la variación del contenido de pigmento por unidad de peso del grano, entre cruzas y progenitores.

En esta generación F₂, los efectos maternos no resultaron importantes, desde la perspectiva estadística, sobre la expresión de variables fenológicas y agronómicas. Solo los efectos recíprocos fueron significativos para el rendimiento del pigmento por planta. Esto indica que la dirección de las cruzas (directa y recíproca) tiene impacto en la acumulación de las antocianinas en el grano. En general, las cruzas directas tuvieron mayor rendimiento de antocianinas que las recíprocas, lo cual se explica por fenómenos epigenéticos (Gonzalo *et al.*, 2007). Se determinó la existencia de heterosis en algunas cruzas de progenitores pigmentados, como es el caso de la cruz roja-1 x rojo-2 similar al progenitor rojo-1, en cuanto al contenido de antocianinas por kg de grano, lo que indica que la dominancia completa es la que se está ejerciendo en la expresión de esta característica. Sin embargo, al calcular el rendimiento de antocianinas por unidad de superficie, las mejores cruzas fueron rojo-1 x azul-2 y rojo-1 x rojo-2, superando al mejor progenitor (rojo-1), lo cual sugiere la existencia de heterobeltiosis. En forma global, los resultados mostraron que un mayor rendimiento de antocianinas por kg de grano se logró al cruzar progenitores contrastados en su contenido de antocianinas ubicadas en el pericarpio y en la capa de aleurona. Las cruzas donde intervinieron el progenitor blanco y el amarillo fueron las de menor contenido. También los resultados



demuestran que un elevado rendimiento de antocianinas por unidad de superficie se logra al incrementar el rendimiento de grano y sus componentes, a través de la heterobeltiosis.

Estudios genéticos en lechuga han demostrado la existencia de heterosis para el contenido de antocianinas en las hojas (Zdravkovic *et al.*, 2002). En maíz solamente se ha reportado la presencia de sobredominancia y varios niveles de dominancia para la intensidad del color de las anteras, evaluado a través de una escala visual (Hollick y Chandler, 1998).

Adicionalmente, en esta generación F_2 se encontró segregación de varias tonalidades de color de grano, de menor intensidad que los colores que presentaron los progenitores, lo cual tuvo impacto negativo sobre la concentración de antocianinas por unidad de peso de grano. Esta parte de la investigación sugiere la conveniencia de desarrollar líneas de maíz de las tonalidades púrpura y rojo, con pigmentación en el pericarpio y en la capa de aleurona, y líneas de tonalidad azul con pigmento en la capa de aleurona, para la formación de híbridos que expresen heterobeltiosos en el rendimiento de pigmento atribuido al número de granos en la F_2 semilla. Se debe considerar que una línea hembra debe ser de alto potencial de almacenamiento de pigmento y el macho debe contar con la aleurona roja o azul, pero de grano grande y de mayor dureza. Esta estrategia permitiría también el aprovechamiento del efecto del macho (xenia) en la F_1 semilla, con fines de incrementar el rendimiento del pigmento en un solo ciclo de cultivo.

Los resultados obtenidos también indican que es factible hacer mejoramiento genético poblacional, teniendo como criterios de selección el contenido de pigmentos por grano y el almacenamiento de antocianinas en estructuras como pericarpio, capa de aleurona y eje embrionario; además, varios trabajos plantean la necesidad de considerar al olote como otro órgano de almacenamiento y fuente



de antocianinas para uso alimenticio (Yang *et al.*, 2008), también en las evaluaciones hechas en campo de poblaciones de maíz criollo, se han encontrado algunas sobresalientes para acumular antocianinas en altas concentraciones en órganos vegetativos como tallo, hojas, totomoxtles, espigas y estigmas que deben considerarse en la formación del arquetipo de maíz para alto contenido de este pigmento (Mendoza y Ortiz, 2008, comunicación personal). Bajo este contexto, se propone desarrollar un programa de mejoramiento genético por selección de familias de medios hermanos maternos que expresen el mayor contenido de antocianinas por mazorca; lo cual implica evaluar bioquímicamente una muestra representativa de los granos de cada familia. Como el análisis implica la destrucción de los granos, es necesario recurrir a la semilla remanente ya sea para continuar con el proceso de mejoramiento o para formar un compuesto balanceado y recombinado que sea ofrecido a los productores para su aprovechamiento.

Identificación de tipos de antocianinas en el grano

En la última fase de la investigación se encontró que son sólo tres las antocianinas que predominan en los extractos de las poblaciones y cruza pigmentadas: cianidina-3-glucósido, su derivada peonidina-3-glucósido y pelargonidina-3-glucósido, y sus respectivas formas aciladas, lo que concuerda con lo reportado por Abdel-Aal *et al.* (2006). En la industria alimentaria se prefieren las antocianinas aciladas (Cevallos y Cisneros, 2004) por su mayor estabilidad a los cambios de temperatura, radiación y pH (Nakajima *et al.*, 2003). Por otro lado, desde la perspectiva de la industria de nutraceuticos se ha descubierto que las antocianinas glucosiladas tienen mayor actividad antioxidante (Kuskoski *et al.*, 2004), mientras que otros estudios indican diferencias entre los tipos de antocianinas en su actividad antiangiogénica (Oak *et al.*, 2006). Los métodos analíticos son relativamente costosos, lo que implica el desarrollo de metodología alternativa para determinar la concentración de cada uno de los tipos de



antocianinas (Lee *et al.*, 2008). Una técnica sencilla para determinar las antocianinas presentes en un extracto es la cromatografía en capa fina (Nagai *et al.*, 1962) por lo tanto, otro criterio de evaluación de las familias de medios hermanos maternos y de las líneas es detectar la presencia de los diferentes tipos y seleccionar por ese criterio. Algunos trabajos reportan la existencia de delfinidina en el grano de maíz (Salinas *et al.*, 2003), la cual no se encontró en el presente trabajo, lo que hace necesario explorar una muestra más amplia de poblaciones criollas de maíz de México, para conocer con certeza si algunas de ellas presentan este tipo de antocianina, ya que se señala que este pigmento es más efectivo para prevenir problemas de salud como el cáncer.



IX. CONCLUSIONES GENERALES

Bajo las condiciones del presente estudio son de relevancia las siguientes conclusiones:

Los parámetros del color del grano (luminosidad, tinte y cromaticidad) y su análisis multivariado, permitieron separar 114 poblaciones nativas de maíz de México en seis grupos: blanco (28 poblaciones), amarillo (44), anaranjado (4), rojo (15), azul (18) y púrpura (5).

Entre los seis progenitores representativos de los grupos anteriores, hubo diferencias en biomasa, grosor y proporción del pericarpio y de la aleurona con respecto al grano completo, estas variables no se asociaron con el contenido de antocianinas en el grano.

Las antocianinas totales estuvieron asociadas con el color del grano, de tal forma que los progenitores más oscuros tuvieron la mayor concentración de pigmento contenido en 1000 granos y en un kg de grano.

En la generación F_1 semilla, el tamaño de la capa de aleurona y su contenido de antocianinas, varió entre las cruzas posibles de las poblaciones seleccionadas, por efecto de la aptitud combinatoria general (ACG) y los efectos maternos (EM), principalmente; en las características del pericarpio predominaron los EM.

En la F_2 semilla se determinó un efecto significativo de la ACG en la mayoría de las características agronómicas estudiadas, y de ACE, ACG y ER sobre el rendimiento de antocianinas por planta. En esta última característica el mejor progenitor fue el rojo-1.

La craza rojo-1 x azul-1 presentó la mayor concentración de antocianinas (mg kg⁻¹) lo cual se explicó por una acumulación proporcional de antocianinas en el pericarpio y en la capa de aleurona. En cambio, las cruzas en las que intervino la población de grano amarillo y blanco presentaron el contenido más bajo del pigmento en el grano.



Las poblaciones azules y rojas acumularon antocianinas conformadas por cianidina, peonidina y pelargonidina, pero no presentaron malvidina. El progenitor rojo-1 tuvo mayor cantidad de antocianinas glucosiladas, basadas en cianidina, peonidina y pelargonidina, con respecto al azul-1, azul-2 y rojo-2. El rojo-2 presentó la menor acumulación de los tres tipos de antocianinas, particularmente de peonidina.

El rendimiento de antocianinas por unidad de superficie se puede incrementar si se mejora la acumulación de antocianinas por planta, y aprovechando la heterobeltiosis entre cruces de poblaciones rojas y azules contrastadas en la ubicación del pigmento en las estructuras del grano.



X. LITERATURA CITADA

- Abdel-Aal E S M, J C Young and I Rabalski (2006)** Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains. *J. of Agric. and Food Chem.* 54: 4696-4704.
- Alvarez A and J M Lasa (1990 a)** Populations of maize from Cantabria.I. Morphological evaluation and variability. *An. Aula Dei* 20(1-2): 41-49.
- Alvarez A and J M Lasa (1990 b)** Populations of maize from Cantabria.II. Numerical taxonomy based on quantitative traits. *An. Aula Dei* 20(1-2): 41-49.
- Andersen J R, I Zein, G Wenzel, B Darnhofer, J Eder, M Ouzunova and T Lübberstedt (2008)** Characterization of phenylpropanoid pathway genes within European maize (*Zea mays* L.) inbreds. *BMC Plant Biology* 8:2-16.
- Antonio M M, J L Arellano V, G García de los S, S Miranda C, J A Mejía C y F V González C (2004)** Variedades criollas de maíz azul raza chalqueño. Características agronómicas y calidad de semilla. *Rev. Fitotec. Mex.* 27 (1): 9-15.
- Aragón C F, S Taba, J M Hernández C, J D Figueroa C y V Serrano A (2006)** Actualización de la información sobre los maíces criollos de Oaxaca. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. SNIB-CONABIO. Proyecto No. CS002. México D. F. 133 p.
- Baker R J (1978)** Issues in diallel analysis. *Crop Sci.* 18:533–536
- Becraft P W and Y A Crabb (2000)** Positional cues specify and maintain aleurone cell fate in maize endosperm development. *Development* 127: 4039-4048.
- Brush S B and H R. Perales (2007)** A maize landscape: ethnicity and agrobiodiversity in Chiapas Mexico. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 121:211–221.
- Caldwell M M, C L Ballaré, J F Bornman, S D Flint, L O Björn, A H. Teramura, G Kulandaivelu and M Tevini (2003)** Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation and interactions with other climatic change factors. *Photochemistry Photobiology Science* 2:29–38.



- Casati P, X Zhang, A L Burlingame and V Walbot (2005)** Analysis of leaf proteome after UV-B irradiation in maize lines differing in sensitivity. *Molecular & Cellular Proteomics* 4(11):1673-1685.
- Cevallos C B A and L Cisneros Z (2004)** Stability of anthocyanin-based aqueous extracts of Andean purple corn and red-fleshed sweet potato compared to synthetic and natural colorants. *Food Chemistry* 86: 69-77.
- Chandler V L and M Stam (2004)** Chromatin conversations: mechanisms and implications of paramutation. *Nature Reviews Genetics* 5: 532-544.
- Chang R Y, S Chopra and P A Peterson (2005)** Differential excision patterns of the *En* -transposable element at the *A2* locus in maize relate to the insertion site.
- Chen P N, S C Chu, H L Chiou, C L Chiang, S F Yang and Y S Hsieh (2007)** Cyanidin 3-glucoside and peonidin 3-glucoside inhibit tumor cell growth and induce apoptosis *in vitro* and suppress tumor growth *in vivo*. *Nutrition and Cancer* 53(2): 232–243.
- Cone K C (2007)** Anthocyanin synthesis in maize aleurone tissue. *Plant Cell Monographs* 8: 121-139.
- Corey L, D F Matzinger and C C Cockerham (1976)** Maternal and reciprocal effects on seedling characters in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Genetics* 82: 677-683.
- Cortés G A, E San Martín M, F Martínez B, G M Vázquez C (2005)** Tortillas of blue maize (*Zea mays* L.) prepared by a fractionated process of nixtamalization: analysis using response surface methodology. *Journal of Food Engineering* 66: 273–281.
- Cortés G A, Eduardo San Martín-Martínez, Fernando Martínez-Bustos, Griselda M. Vázquez-Carrillo (2005)** Tortillas of blue maize (*Zea mays* L.) prepared by a fractionated process of nixtamalization: analysis using response surface methodology. *Journal of Food Engineering* 66 273–281
- Coulter M C (1920)** Inheritance of aleurone color in maize. *The Botanical Gazette* 69(5):407-425.
- Dana W and W Ivo (2008)** Computer image analysis of seed shape and seed color for flax cultivar description. *Computers and Electronics in Agriculture* 61: 126-135



- De Pascual T S and M T Sánchez B (2008)** Anthocyanins: from plant to health *Phytochem Rev* 7:281-299.
- Doebley J F, B S Gaut and B D Smith (2006)** The Molecular Genetics of Crop Domestication. *Cell* 127: 1309-1321.
- Earp C F, C M McDonough, L W Rooney (2004)** Microscopy of pericarp development in the caryopsis of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Journal of Cereal Science* 39: 21–27.
- East E M (1912)** Inheritance of color in the aleurone cells of maize. *The American Naturalist* 46: 363-365.
- Edwards J, D Stoltzfus and P A Peterson (2001)** The *C1* locus in maize (*Zea mays* L.): effect on gene expression. *Theor. Appl. Genet.* 103:718–724
- Emerson R A (1912)** The unexpected occurrence of aleurone colors in F₂ of a cross between non colored varieties of maize. *The American Naturalist* 46: 612-615.
- Espinosa T E, Ma del C Mendoza C y F Castillo G (2006)** Diversidad fenotípica entre poblaciones de maíz con diferentes grados de pigmentación. *Revista Fitotecnia Mexicana* 29 (Número especial 2): 19-23.
- Ford R H (2000)** Inheritance of kernel color in corn: explanations and investigations. *The American Biology Teacher* 62 (3): 181-188.
- Fujii K and Y Kuwada (1916)** On the composition of factorial formula for zygotes in the study of inheritance of seed characters of *Zea mays* L. with notes on seed pigments. *The Botanical Magazine* 30 (351):83-88.
- Gonzalo M, T J Vyn, J B Holland and L M McIntyre (2007)** Mapping reciprocal effects and interactions with plant density stress in *Zea mays* L. *Heredity*, 1–17
- Goodman M M and R McK Bird (1977)** The races of maize IV; tentative grouping of 219 Latin American races. *Economic Botany* 31: 265-273.
- Griffing B (1956)** A generalized treatment of the use of diallel crosses in quantitative inheritance. *Heredity* 10: 31-50.
- Grobman A, Salhuana W, Sevilla R, Mangelsdorf E (1961)** Races of maize in Peru; their origin, evolution and classification. *Nat. Acad. Sci. Nat. Res. Council Pub.* 915, Washington D C. USA.



- Grotewold E (2006)** The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:761–80.
- Hayes H K (1917)** Inheritance of a mosaic pericarp pattern color of maize. *Genetics* 2: 261-282.
- Hayes H K (1946)** Yield genes, heterosis and combining ability. *The American Naturalist* 80(793):430-445.
- Hernández X E (1985)** Maize and man in the greater southwest. *Economic Botany* 39 (4): 416-430.
- Hollick J B and V L Chandler (1998)** Epigenetic allelic states of a maize transcriptional regulatory locus exhibit overdominant gene action. *Genetics* 150: 891–897.
- Irani N G and E Grotewold (2004)** Light-induced morphological alteration in anthocyanin-accumulating vacuoles of maize cells. *BMC Plant Biology* 5:7-21.
- Irani N G, M Hernandez J and Grotewold E (2003)** Regulation of anthocyanin pigmentation. *Recent Adv. Phytochem.* 37: 59-78
- Jing P (2006)** Purple corn anthocyanins: chemical structure, chemoprotective activity and structure/function relationships. Dissertation Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree Doctor of Philosophy the Graduate School of The Ohio State University, USA. 287 p.
- Jing P, V Noriega, S J Schwartz and M M Giusti (2007)** Effects of growing conditions on purple corn cob (*Zea mays* L.) anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 55(21):8625-8629.
- Johannessen C L (1982)** Domestication Process of Maize Continues in Guatemala. *Economic Botany*, 36: 84-99.
- Johannessen C L, M R Wilson and W A Davenport (1970)** The domestication of maize: process or event?. *Geographical Review* 60 (3): 393-413.
- Kempton J H (1919)** Inheritance of spotted aleurone color in hybrids of chinese maize. *Genetics* 4: 261-274.
- Kitamura S (2006)** Transport of flavonoides. In: E Grotewold (ed) *The Science of Flavonoides*. Springer, USA. pp: 123-146



- Kowalczyk E, P Krzesinski, M Kura, B Szmigiel and J Baszczyk (2003)** Anthocyanins in medicine. *Pol. J. Pharmacol.* 55:699–702.
- Kuskoski E M, A G Asuero, M C García P, A M Troncoso y R Fett (2004)** Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas* 24(4):691-693.
- Larson R, J B Bussard and E H Coe (1986)** Gene dependent flavonoid 3'-hidroxilation in maize. *Biochemical Genetics* 24(7-8):615-624.
- Lee J, C Rennaker and R E Wrolstad (2008)** Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry* 110:782-786.
- Lindstrom E W (1923)** Genetical reserch with maize. *Genetics* 5(3-4):327-356.
- Martínez M E, T Corona T, E Avitia G, A M Castillo G, T Terrazas S y M T Colinas L (2006)** Caracterización morfológica de frutos y semillas de Nanche (*Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K.). *Revista Chapingo Serie Horticultura* 12(1): 11-17.
- Matsuoka Y (2005)** Origin matters: lessons from the search for the wild ancestor of maize. *Breeding Science* 55: 383–390.
- Mazza G J (2007)** Anthocyanins and heart health. *Ann. Ist. Super Sanità* 43 (4): 369-374.
- McGuire R G (1992)** Reporting objective color measurements. *Horticultural Science* 27: 1254-1255.
- McMullen M D, M E Snook, E A Lee, P F Byrne, H Kross, T A Musket, K Houchins and E H Coe (2001)** The biological basis of epistasis between quantitative traits loci for flavone and 3-deoxyanthocyanin syntesis in maize (*Zea mays* L.). *Genome* 44:667-676.
- Mendel G (1866)** Versuche über pflanzenhybriden. *Verhandlungen des naturforschenden vereines in Brünn, Bd. IV für das Jahr, Abhandlungen.* pp: 3–47. (The present version derives from the Bateson translation, with some minor corrections and changes provided by Roger Blumberg). Disponible en <http://www.netSPACE.org/MendelWeb/>.
- Miranda C S (2003)** El origen genético y geográfico del maíz (*Zea mays* L.). En: A Muñoz O (Editor) *Centli-maíz. Prehistoria e Historia, Diversidad, Potencial, Origen Genético y Geográfico.* Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, México. pp: 157-159.



- Muñoz O A (2003)** Centli-maíz. Prehistoria e Historia, Diversidad, Potencial, Origen Genético y Geográfico. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, México. 210 pp.
- Nagai I, G Suzushino and Y Tsuboki (1962)** Genetic variation of anthocyanins of *Oriza sativa*. *Japan Journal of Genetics* 37(6):441-450.
- Nakajima N, M Sugimoto, H Yokoi, H Tsuji and K Ishihara (2003)** Comparison of acylated plant pigments: light-resistance and radical-scavenging ability. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67 (8):1828-1831.
- Nass L L and E Paterniani (2000)** Pre-breeding: a link between genetic resources and maize breeding. *Scientia Agricola* .57(3): 581-587.
- Oak M H, J E Bedoui, S V F Madeira, K Chalupsky and V B Schini K (2006)** Delphinidin and cyanidin inhibit PDGFAB-induced VEGF release in vascular smooth muscle cells by preventing activation of p38 MAPK and JNK. *British Journal of Pharmacology* 149:283–290.
- Pajic Z. (2007)** Breeding of maize types with specific traits at the Maize Research Institute, Zemun Polje. *Genetika* 39(2):169 -180.
- Patterson G I, L J Harris, V Walbot and V L. Chandler (1991)** Genetic analysis of B-Peru, a regulatory gene in maize. *Genetics* 126: 205-220
- Pedreschi P R (2005)** Fractionation of phenolic compounds from a purple corn extract and evaluation of antioxidant and antimutagenic activities. A Thesis Submitted to the Office of Graduate Studies of Texas A&M University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science, USA. 96 p.
- Pietrini F, M A Iannelli and A Massacci (2002)** Anthocyanin accumulation in the illuminated surface of maize leaves enhances protection from photoinhibitory risks at low temperature, without further limitation to photosynthesis. *Plant, Cell and Environment*. 25:1251–1259.
- Rangel M E, A Muñoz O, G Vázquez C, J Cuevas S, J Merino C y S Miranda C (2004)** Nixtamalización, elaboración y calidad de tortilla de maíces de Ecatlán, Puebla, México. *Agrociencia* 38: 53-61.
- Revilla P, A Landa, V M Rodríguez, M C Romay, A Ordás and R A Malvar (2008)** Maize for bread under organic agriculture. *Spanish Journal of Agricultural Research* 6(2): 241-247



- Ron P J, J de J Sánchez G, A A Jiménez C, J A Carrera V, J G Martín L, M M Morales R, L de la Cruz L, S A Hurtado de la P, S Mena M y J G Rodríguez F (2006)** Maíces nativos del Occidente de México I. Colectas 2004. Scientia-CUCBA 8(1):1-39.
- Salinas M Y, F Martínez B, M Soto H, R Ortega P, y J L Arellano V (2003)** Efecto de la nixtamalización sobre las antocianinas del grano de maíces pigmentados. Agrociencia 37: 617-628.
- Salinas M Y, J J López R, G B González F y G Vázquez C (2007)** Compuestos fenólicos del grano de maíz y su relación con el oscurecimiento de masa y tortilla. Agrociencia 41: 295-305.
- Salinas M Y, J J López R, G B González F y G Vázquez-C (2007)** Compuestos fenólicos del grano de maíz y su relación con el oscurecimiento de masa y tortilla. Agrociencia 41: 295-305.
- Serna S S O (2004)** Foods from maize. *In*: C Wrigley and C Walker (Editors) Encyclopedia of Grain Science. Elsevier.
- Shull G H (1911)** The Genotypes of Maize *The American Naturalist* 45: 234-252.
- Singh A, M T Selvi and R Sharma (1999)** Sunlight-induced anthocyanin pigmentation in maize vegetative tissues. *Journal of Experimental Botany* 50(339):1619–1625.
- Soriano V J M (2000)** The parametric restrictions of the Gardner and Eberhart diallel analysis model: heterosis analysis. *Genetics and Molecular Biology* 23 (4): 869-875.
- Soriano V J M, C D Cruz and A A Cardoso (1999)** Theory and analysis of partial diallel crosses. *Genetics and Molecular Biology* 22 (4):591-599.
- Spillane C, V Calzada J P and Grossniklaus U (2002)** Parent-of-origin effects and seed development: *In*: Hui TH, Khachatourians G G, McHughen A, Nip W K, Scorza R (Eds.) *Genetics and epigenetics. Transgenic Plants and Crops*, New York:Marcel-Dekker Inc.
- Sprague G F and Tatum L A. (1942)** General vs. specific combining ability in single crosses of corn. *J. Amer. Soc. Agron.* 34:923-32,
- Springer N M and R M Stupar (2007)** Allelic variation and heterosis in maize: How do two halves make more than a whole?. *Genome Research* 17:264-275



- Tanaka Y, N Sasaki and A Ohmiya (2008)** Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal* 54:733–749.
- Van der Walt W J and R A Brink (1969).** Geographic distribution of paramutable and paramutagenic *R* alleles in maize. *Genetics* 61: 677-695.
- Wellhausen E J, L M Roberts, E Hernández X, P C Mangelsdorf (1951)** Razas de Maíz de México. Su origen, Características y distribución. Folleto Técnico No. 5. Oficina de Estudios Especiales, Secretaría de Agricultura y Ganadería. México, D.F. 273 p.
- Wright A J (1985)** Diallel designs, analyses, and reference populations. *Heredity* 54: 307-311.
- Yang Z , G Fan, Z Gu, Y Han, Zang Chen (2008)** Optimization extraction of anthocyanins from purple corn (*Zea mays* L.) cob using tristimulus colorimetry
- Yates F (1947)** Analysis of data from all possible reciprocal crosses between a set of parental lines. *Heredity* 1:287-301
- Yoshinaga M, O Yamakawa and M Nakatani (1999)** Genotypic diversity of anthocyanin content and composition in purple-fleshed sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). *Breeding Science* 49:43-47.
- Zdravkovic J, D Stevanovic, T. Sretenovic-Rajicic and M. Zdravkovic (2002)** Genetic analysis of anthocyanin and vitamin C contents in lettuce. *Acta Hort.* 579: 167-170.
- Zhu J and B S Weir (1994)** Analysis of cytoplasmics and maternal effects. II. Genetic models for triploid endosperms. *Theor. Appl. Genet* 89: 160-166.

