



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
GENÉTICA**

**LAS ANTOCIANINAS DEL MAÍZ:  
SU DISTRIBUCIÓN EN LA PLANTA Y PRODUCCIÓN**

**CARMEN GABRIELA MENDOZA MENDOZA**

**T E S I S**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO**

2012

La presente tesis titulada: **Las antocianinas del maíz: Su distribución en la planta y producción**; realizada por la alumna: **Carmen Gabriela Mendoza Mendoza**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
GENÉTICA**

**CONSEJO PARTICULAR**

**CONSEJERO**



\_\_\_\_\_  
**DRA. MA. DEL CARMEN MENDOZA CASTILLO**

**ASESOR**



\_\_\_\_\_  
**DR. FERNANDO CASTILLO GONZÁLEZ**

**ASESOR**



\_\_\_\_\_  
**DRA. ADRIANA DELGADO ALVARADO**

Montecillo, Texcoco, Estado de México 21 de Septiembre de 2012

# LAS ANTOCIANINAS DEL MAÍZ: SU DISTRIBUCIÓN EN LA PLANTA Y PRODUCCIÓN

Carmen Gabriela Mendoza Mendoza, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2012

El presente estudio tuvo como objetivo conocer la dinámica de acumulación de antocianinas en la planta de maíz y en cada uno de sus órganos en el periodo comprendido entre 30 y 138 días después de la siembra (dds); así como valorar el potencial de las poblaciones de maíz pigmentado para acumular antocianinas, mediante la determinación de la concentración de antocianinas totales (AT) durante la etapa reproductiva del cultivo. El estudio de la dinámica de acumulación del pigmento indicó que en el maíz existe un patrón de acumulación de antocianinas bien definido (tanto en la planta como en los órganos que la conforman); la acumulación comenzó en los entrenudos y láminas foliares maduras en sentido acrópeto; visualmente fue más abundante (coloración morada intensa) a partir de 77 dds e inició su declive a 98 dds (la coloración se tornó opaca), aunque no en todos los órganos de la planta. La secuencia de pigmentación de los órganos fue: vainas foliares, láminas foliares, tallo, espiga, jilotes inferiores, brácteas de la mazorca, pedúnculo, olote y grano; en los que el sentido de la acumulación de antocianinas fue basípeto en unos y acrópeto en otros. El grado de pigmentación que presentaron las poblaciones fue variable entre sí e inclusive, entre los órganos de la planta de una misma población. Aunque a 98 dds se inició la degradación de algunos órganos, la determinación de AT mostró que en los 20 días comprendidos entre 98 y 118 dds la concentración de AT aumentó y los órganos que aportaron la mayor cantidad de AT fueron las brácteas y las vainas foliares, siendo 118 dds el momento en el que se obtuvieron los máximos rendimientos por unidad de superficie,  $48.7 \text{ kg ha}^{-1}$  en la población completamente pigmentada,  $40.5 \text{ kg ha}^{-1}$  en la de planta pigmentada-grano no pigmentado y  $2.0 \text{ kg ha}^{-1}$  en la de planta verde y grano pigmentado. A 138 dds las antocianinas redujeron su concentración en la planta en 60 y 65 %.

**Palabras clave:** *Zea mays* L., maíz pigmentado, antocianinas totales, dinámica de acumulación.

# THE ANTHOCYANINS OF MAIZE: DISTRIBUTION IN THE PLANT AND POTENTIAL OF PRODUCTION

Carmen Gabriela Mendoza Mendoza, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2012

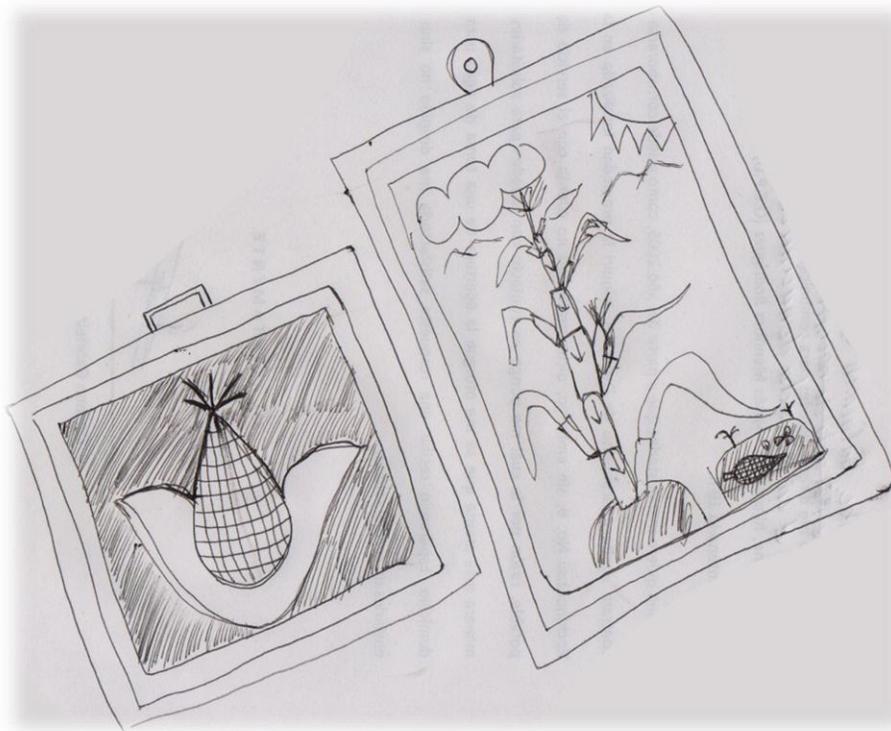
The objective of this research was to study the dynamic of accumulation of anthocyanins in the plant of maize and into each one of its organs during the period between 30 and 138 days after sowing (das); also it was evaluated the potential of the purple maize populations to accumulate anthocyanins by the quantification of total anthocyanins content (TAC) at the reproductive phenological stage of the crop. The study of the dynamic of accumulation showed that there is a well-defined pattern of accumulation (both in the plant and in its organs); the accumulation started in the mature internodes and leaves blades in acropetal direction; visually the accumulation of anthocyanins was most abundant (intense purple coloration) from 77 das and began to decline at 98 das (the color became dull), although this didn't happen into all the organs of the plant. The sequence in which the organs were pigmented was: leaves sheaths, leaves blades, stalk, spike, young ears, husks of the cob, peduncle, corncob and grain; the direction of accumulation of anthocyanins in the organs was basipetal in some of them and in others it was acropetal. The degree of pigmentation that the populations of purple maize exhibited was variable between them and even between the organs of the same population. While at 98 das the degradation of some organs started, the determination of TAC showed that in the 20 days between 98 and 118 das the concentration of TAC increased and the organs that provided the largest amount of TAC were the husks of the cob and the leaves sheaths; at 118 das the highest yields of TAC per hectare were obtained, 48.7 kg ha<sup>-1</sup> in the fully pigmented population, 40.5 kg ha<sup>-1</sup> in the pigmented plant-non pigmented grain population and 2.0 kg ha<sup>-1</sup> in the non pigmented plant-pigmented grain population. At 138 das the concentration of anthocyanins in the plant was reduce in 60 and 65 %.

**Key words:** *Zea mays* L., purple corn, total anthocyanins, dynamic of accumulation.

## DEDICATORIA

Especialmente a mi papi: **Moisés Mendoza Rodríguez**, quien ya no está físicamente a mi lado, pero que con sus enseñanzas, cariño y todo el tiempo que compartimos juntos, me hace tenerlo presente todo los días. Moisecillo, espero que tus deseos de tener una “Gaby mejorada” se estén cumpliendo, quiero ser la F1 de alto vigor híbrido que algún día me dijiste que sería.

A mi mami, **Ma. del Carmen Mendoza Castillo**, que ha estado conmigo al pie del cañón, ahora entiendo eso que dicen que una madre hace todo por sus hijos. Ha sido increíble compartir este tiempo contigo y conocerte en el ámbito profesional, este es fruto de un trabajo en equipo ¡Te quiero!



## AGRADECIMIENTOS

**Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por proporcionarme el soporte financiero que me permitió realizar los estudios de Maestría en Ciencias.

**Al Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo**, por ser el espacio en el que pude llevar a cabo mi proyecto de investigación y en donde conté con las enseñanzas de excelentes académicos.

A los integrantes de mi Consejo Particular:

**Dra. Ma. del Carmen Mendoza Castillo**, por poner en mis manos este proyecto tan interesante y novedoso, en especial por sus consejos y señalamientos realizados durante mi proceso de formación y por su constante apoyo durante la fase final de esta investigación.

**Dr. Fernando Castillo González**, a quien admiro por su gran dedicación al trabajo y habilidades en cuestiones de análisis, gracias por resolver mis dudas, aportar siempre información relevante a mi formación académica y por su paciencia.

**Dra. Adriana Delgado Alvarado** por su valioso apoyo, asesoría y disponibilidad ya nunca hubo un “pero”; por señalarme que existe la forma de sobrellevar las situaciones adversas y por confiar en mí. su infinita confianza.

Al **Dr. Ramón Marcos Soto Hernández**, por permitirme trabajar libremente en su laboratorio, pues siempre hubo disponibilidad para todo, desde utilizar un espacio, un equipo, un reactivo, por ser un gran ejemplo de que el trabajo interdisciplinario es posible.

Al **Dr. Kato** y al **Dr. Molina**, porque han sido indirectamente mis profesores de toda la vida pues he tenido la dicha de conocerles desde hace varios años.

A **Moisés** y **Carmen Mendoza** (mis papás), porque gracias a su ejemplo y motivación me ha gustado seguir sus pasos, les amo y admiro profundamente.

A **Moyito** (mi hermano), quien con sus ocurrencias y palabras de aliento me dio ánimo para terminar con gusto la escritura de la tesis.

A **Javito**, por haber revisado mis escritos y encontrar los detalles que yo ya no podía identificar, por apoyarme en todo y ser mi brazo derecho.

A mis **amigos**, por estar presentes cuando más lo necesité y por enviarme mensajes positivos para que no decayera el ánimo y terminara con este proyecto. Los quiero.

## CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE CUADROS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xi
<b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>1</b>
1.1. Objetivo General.....	17
1.2. Objetivos Específicos.....	17
1.3. Hipótesis General.....	18
<b>CAPÍTULO II. DINÁMICA DE ACUMULACIÓN DE ANTOCIANINAS EN LA                   PLANTA DE MAÍZ DE POBLACIONES PIGMENTADAS.....</b>	<b>19</b>
2.1. Resumen.....	19
2.2. Introducción.....	20
2.2.1. Objetivo General.....	21
2.2.2. Objetivos Específicos.....	21
2.2.3. Hipótesis.....	21
2.3. Revisión de Literatura.....	22
2.4. Materiales y Métodos.....	32
2.5. Resultados y Discusión.....	33
2.5.1. Patrón de acumulación de antocianinas en el cultivo de maíz.....	33
2.5.2. Dinámica de acumulación de antocianinas en cada órgano de la planta.....	45
2.5.2.1. En las vainas y láminas foliares.....	45
2.5.2.2. En el tallo.....	48
2.5.2.3. En la inflorescencia masculina: espiga.....	49
2.5.2.4. En la inflorescencia femenina: jilotes, brácteas, olote, pedúnculo y granos.....	51
2.5.3. Patrones de acumulación de antocianinas en poblaciones contrastantes en pigmentación.....	54
2.6. Conclusiones.....	55

	Pág.
2.7. Literatura Citada.....	56
<b>CAPÍTULO III. CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS TOTALES EN LA PLANTA DE MAÍZ Y VALORACIÓN DE SU POTENCIAL DE PRODUCCIÓN .....</b>	<b>61</b>
3.1. Resumen.....	61
3.2. Introducción.....	62
3.2.1. Objetivo General.....	63
3.2.2. Objetivos Específicos.....	63
3.2.3. Hipótesis.....	63
3.3. Revisión de Literatura.....	64
3.4. Materiales y Métodos.....	71
3.4.1. Material genético y sitio experimental.....	71
3.4.2. Preparación de la muestra.....	74
3.4.3. Extracción y cuantificación de antocianinas totales....	75
3.4.4. Valoración del potencial de producción de antocianinas de los distintos órganos de la planta de maíz.....	77
3.4.5. Análisis estadístico.....	78
3.5. Resultados y Discusión.....	78
3.5.1. Análisis de varianza del contenido de antocianinas totales.....	78
3.5.2. Concentración de antocianinas totales.....	80
3.5.2.1. En los órganos de la planta en poblaciones de maíz contrastantes en pigmentación (Poblaciones x Órganos de la planta).....	80
3.5.2.2. En las poblaciones durante la etapa reproductiva de la planta de maíz (Poblaciones x Muestras).....	82
	Pág.

3.5.2.3.	En los órganos durante la etapa reproductiva de la planta de maíz (Órganos de la planta x Muestreos).....	84
3.5.3.	Valoración del potencial productivo de antocianinas en poblaciones de maíz pigmentado.....	86
3.5.3.1.	Concentración de antocianinas totales por planta	88
3.5.3.2.	Estimación del rendimiento de antocianinas por unidad de superficie.....	90
3.6.	Conclusiones.....	91
3.7	Literatura citada.....	91
CAPÍTULO IV.	DISCUSIÓN GENERAL.....	96
CAPÍTULO V.	CONCLUSIONES GENERALES.....	100
CAPÍTULO VI.	BIBLIOGRAFÍA DE INTRODUCCIÓN Y DISCUSIÓN GENERAL.....	101
APÉNDICE	.....	109

## ÍNDICE DE CUADROS

	Título	Pág.
<b>Cuadro 1.</b>	Contenido de antocianinas totales en distintas especies vegetales.....	69
<b>Cuadro 2.</b>	Contenido de antocianinas totales en diferentes órganos de la planta de maíz.....	70
<b>Cuadro 3.</b>	Valores de cuadrados medios del análisis de varianza para el contenido de antocianinas totales en poblaciones de maíz contrastantes en pigmentación durante la etapa reproductiva del cultivo. Montecillo, México. 2010.....	79
<b>Cuadro 4.</b>	Valores promedio del contenido de antocianinas totales en la interacción Poblaciones x Órganos de la planta. Montecillo, México. 2010.....	81
<b>Cuadro 5.</b>	Valores promedio del contenido de antocianinas totales en la interacción Poblaciones x Muestreos. Montecillo, México. 2010.....	83
<b>Cuadro 6.</b>	Valores promedio del contenido de antocianinas totales en la interacción Órganos de la planta x Muestreos. Montecillo, México. 2010.....	84
<b>Cuadro 7.</b>	Valores estimados de rendimiento de antocianinas totales por unidad de superficie en diferentes tiempos de valoración de las poblaciones pigmentadas de maíz. Montecillo, México. 2010.....	90

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Título	Pág.
<b>Figura 1.</b>	Estructura química de las antocianinas.....	2
<b>Figura 2.</b>	Ruta de biosíntesis de las antocianinas.....	4
<b>Figura 3.</b>	Patrón de acumulación de antocianinas en los órganos de la planta de maíz a través del ciclo de cultivo, con énfasis en vainas y láminas foliares y en la espiga.....	36
<b>Figura 4.</b>	Patrón de acumulación de antocianinas en los órganos de la planta de maíz a través del ciclo de cultivo, con énfasis en el tallo, jilotes inferiores y brácteas de la mazorca.....	37
<b>Figura 5.</b>	Sentido en el que se presenta la acumulación de antocianinas en los órganos de la planta de maíz a través del ciclo de cultivo, con énfasis en la espiga, las vainas y láminas foliares.....	38
<b>Figura 6.</b>	Sentido en el que se presenta la acumulación de antocianinas en los órganos de la planta de maíz a través del ciclo del cultivo, con énfasis en el tallo, los jilotes inferiores y las brácteas de la mazorca.....	39
<b>Figura 7.</b>	Espigas de las poblaciones de planta verde que a 77 dds presentaron trazas de pigmentación por antocianinas.....	42
<b>Figura 8</b>	Vainas foliares de poblaciones de planta verde que en el período comprendido entre 45 y 50 dds presentaron trazas de pigmentación por antocianinas.....	42
<b>Figura 9.</b>	Contraste en pigmentación entre las vainas foliares de la población de planta verde (no pigmentada) y de una población pigmentada, en tres períodos distintos del ciclo del cultivo.....	45

	Pág.
<b>Figura 10.</b> Sentido de acumulación de las antocianinas en las vainas foliares	46
<b>Figura 11.</b> Sentido de acumulación de las antocianinas en las láminas foliares.....	48
<b>Figura 12.</b> Sentido de acumulación de las antocianinas en los entrenudos y nudos del tallo.....	48
<b>Figura 13.</b> Sentido de acumulación de las antocianinas en la espiga y en las espiguillas.....	49
<b>Figura 14.</b> Inicio de la pigmentación en las espiguillas de maíz.....	50
<b>Figura 15.</b> Sentido de acumulación de antocianinas en jilotes inferiores y brácteas de la mazorca.....	52
<b>Figura 16.</b> Sentido de acumulación de las antocianinas en el olote.....	53
<b>Figura 17.</b> Sentido de acumulación de las antocianinas en el pedúnculo.....	53
<b>Figura 18.</b> Sentido de acumulación de antocianinas en el grano.....	54
<b>Figura 19.</b> Obtención de muestras de vainas y láminas foliares de maíz para la cuantificación de antocianinas totales.....	72
<b>Figura 20.</b> Obtención de muestras del tallo y pedúnculo de maíz para la cuantificación de antocianinas totales.....	73
<b>Figura 21.</b> Obtención de muestras de la espiga, jilotes inferiores, brácteas de la mazorca y olote.....	73
<b>Figura 22.</b> Proceso de extracción y cuantificación de antocianinas totales.....	76

	Pág.
<b>Figura 23.</b> Porcentaje de la biomasa total que constituye cada órgano de la planta.....	87
<b>Figura 24.</b> Contenido de antocianinas totales en la planta durante la etapa reproductiva del maíz pigmentado.....	88
<b>Figura 25.</b> Aportación de cada órgano al contenido de antocianinas totales por planta.....	89

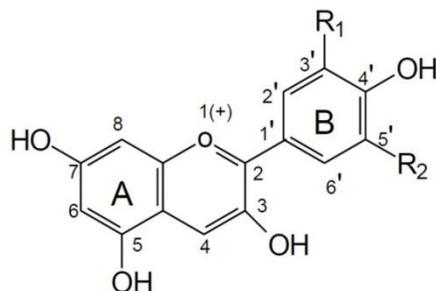
## CAPÍTULO I

### INTRODUCCIÓN GENERAL

Las antocianinas (del griego *Anthos*: flor y *kyanos*: azul) son compuestos derivados del metabolismo secundario de las plantas que pertenecen al grupo fitoquímico de los fenoles y dentro de ellos se incluyen a los flavonoides, los cuales son responsables de pigmentar de forma natural a los tejidos que los producen; en este grupo de metabolitos secundarios, que se diferencian entre sí por el grado de oxidación que presentan en el tercer anillo que los conforma, se encuentran las flavonas, los flavonoles, las flavononas, las isoflavonas y las antocianinas (Giusti y Jing, 2008; Ming *et al.*, 2003).

Después de la clorofila, probablemente las antocianinas son el grupo de pigmentos visibles al ojo humano más importante en las plantas, éstas pueden conferirle una coloración roja, violácea o azul a las hojas, las raíces, las flores, los frutos, las semillas, los tallos y en conjunto, prácticamente a toda la planta, ubicándose principalmente en las partes superficiales de sus órganos, aunque algunas veces también se les encuentra internamente (Tanaka *et al.*, 2008).

Como las antocianinas pertenecen al grupo de los flavonoides, su estructura química se conforma por un esqueleto que contiene quince carbonos (C<sub>6</sub>-C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>), ordenados en dos anillos aromáticos (anillo A benzoil y anillo B hidroxicinamoil) unidos por un tercer anillo que consta de tres carbonos y un oxígeno (C<sub>3</sub>O) (Ávalos y Pérez, 2009). Específicamente, la estructura de las antocianinas la constituye el 2-fenilbenzopirilo, también conocido como ion flavilio (consta de dos grupos aromáticos, un benzopirilo y un anillo fenólico), en términos generales, se ha observado que las antocianinas están constituidas por dos o tres partes: una antocianidina o aglucón, una o varias moléculas de carbohidratos (especialmente monosacáridos) unidas a esta unidad de aglucón (usualmente ocurre en las posiciones 3', algunas veces en las posiciones 3' y 5' y ocasionalmente en la 3' y 7') y posiblemente, un grupo acilado (como los grupos hidroxilo (OH), metoxilo (O-CH<sub>3</sub>) o varios ácidos orgánicos); es decir, que las antocianinas son glucósidos de las antocianidinas (Figura 1) (Castañeda *et al.*, 2009; Garzón, 2008; Mercadante y Bobbio, 2008; Quintero, 2004).



**Figura 1. Estructura química de las antocianinas**

Ming *et al.* (2003) indican que existen 17 tipos de agliconas en la naturaleza, mientras que Andersen y Jordheim (2006) identifican 23 grupos; sin embargo, sólo 6 son comunes en las plantas superiores, aunque son pocas las ocasiones en las que se les encuentra aisladas en el material vegetal fresco, ya que generalmente se presentan en forma glucosilada (Prior, 2004). Las variaciones estructurales que se presentan en el anillo B, como el número de grupos hidroxilo, la naturaleza y número de azúcares ligados a la molécula, la posición de éstos y la naturaleza y número de ácidos alifáticos o aromáticos enlazados a los azúcares en la molécula, son las que dan origen a las antocianidinas más abundantes en la naturaleza, las cuales son pelargonidina, peonidina, cianidina, malvidina, petunidina y delphinidina, que se encuentran en más de 90 % de las antocianinas aisladas (Clifford, 2000).

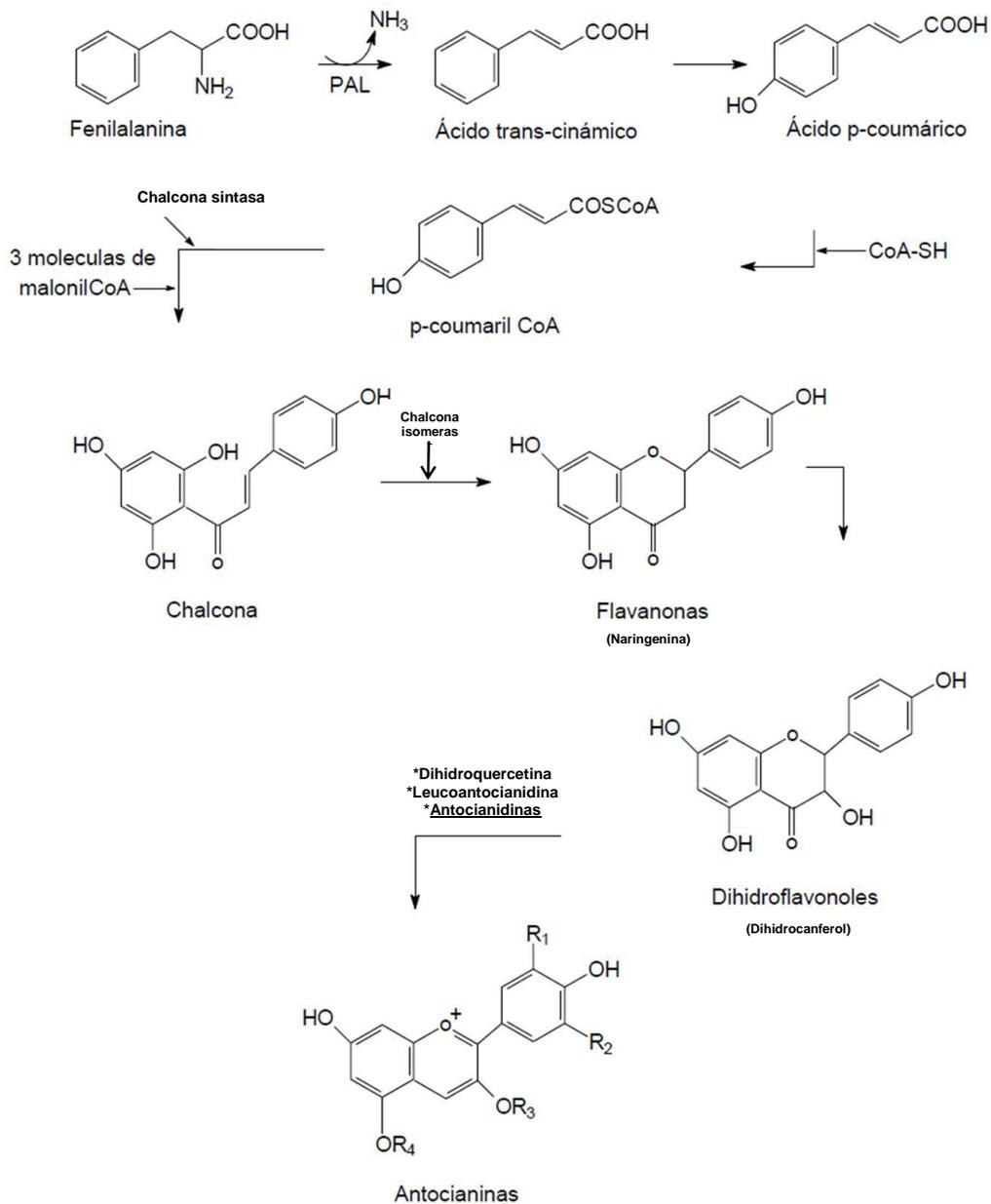
Ya que cada aglicona puede estar glucosilada y acilada por diferentes azúcares y ácidos cinámicos y alifáticos, se ha reportado en diversos estudios que la combinación de las moléculas origina entre 400 y 539 antocianinas diferentes, de las cuales, según de Pascual y Sánchez (2008) 50 % se basa en cianidina, 12 % en pelargonidina, 12 % en delphinidina, 7 % en petunidina y 7 % en malvidina; en cuanto a la asociación con el glucósido, los más comunes son: 3-monósidos, 3-biósidos, 3,5-diglucósidos y 3,7-diglucósidos. Los 3-glucósidos ocurren 2.5 veces más que los 3,5-diglucósidos, por lo tanto, la antocianina más distribuida en la naturaleza es la cianidina 3-glucósido (Ming *et al.*, 2003).

Así, se puede concluir que el tono y el matiz de los colores desplegados por las antocianinas dependerán del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo en

el ion flavilio. Quintero (2004) y Garzón (2008) indican que los incrementos en la hidroxilación producen desplazamientos hacia tonalidades azules mientras que los incrementos en las metoxilaciones producen coloraciones rojas. Además de que la estabilidad de las antocianinas depende de lo mencionado con anterioridad, existen otros factores que pueden afectarla como el pH, la temperatura, la luz, la presencia de iones metálicos y de oxígeno, la concentración de azúcares, la presencia de dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>), entre otros.

Davies (2009) indica que probablemente la biosíntesis de compuestos fenólicos ha sido la ruta metabólica más estudiada; en diversas fuentes (Raghvendra, 2011; Ávalos y Pérez, 2009; Garzón, 2008; Hernández, 2003) se ha señalado que estos compuestos se forman a partir de dos rutas de biosíntesis: la ruta del *ácido malónico* (ocurre principalmente en hongos, bacterias y en algunas plantas superiores) y la *ruta del ácido shikímico* (frecuente en las plantas superiores). En la ruta del ácido shikímico se convierten carbohidratos simples (por medio de diversas reacciones) que se derivaron de la glucólisis, en la ruta de las pentosas fosfato y del ciclo de Calvin, en ácido shikímico, el cual da origen a fenilalanina, triptófano, tirosina, etc. Posteriormente, como se muestra en la Figura 2, la fenilalanina sufre un proceso de desaminación (es decir, que pierde un NH<sub>3</sub>) inducido por la enzima fenilalanina amonoliasa (PAL); después de este proceso, se adhieren hidroxilos y otros grupos sustituyentes a lo que quedó de la molécula de fenilalanina, dando origen a diversos ácidos orgánicos como el cinámico, p-cumárico, caféico, ferúlico, entre otros, que son precursores de los compuestos fenólicos; en el caso específico de la ruta de biosíntesis de las antocianinas, se da origen al ácido p-cumárico, este ácido, se adiciona la CoA-SH formando así el p-cumaril-CoA, que inmediatamente y en conjunto con la enzima chalcona sintasa participa en una reacción de condensación con las tres moléculas de malonil-CoA para formar una chalcona de 15 C. Este compuesto intermedio de 15 C es transformado en una flavanona (naringenina) en una reacción catalizada por una chalcona isomerasa. Dicha flavonona puede dar origen a dihidroflavonoles, dihidroquercetinas, leucoantocianidinas y antocianidinas, que son el resultado de una reacción de hidroxilación en el carbono 3 seguida por una deshidratación. Finalmente, la molécula

de antocianidina se estabiliza por glucosilación del heterociclo: reacción en la que interviene una glicosil transferasa y posteriormente posibles reacciones de metilación de los hidroxilos.



**Figura 2. Ruta de biosíntesis de las antocianinas**

La comunidad científica internacional ha jugado un papel importante en el incremento y aceptación de las antocianinas y derivados de éstas al llevar a cabo estudios que

muestran su gran diversidad de funciones, las cuales van desde las más básicas como lo es su capacidad de actuar como atrayente de polinizadores, hasta funciones específicas en el metabolismo de las plantas; inclusive, en las últimas décadas se han desarrollado investigaciones enfocadas al estudio de sus propiedades bioactivas (Mateus y Freitas, 2009; Mercadante y Bobbio, 2008).

También, las circunstancias actuales; es decir, la alta incidencia en los humanos de enfermedades como las cardiovasculares, la diabetes y el cáncer, aunado a la necesidad de encontrar y fomentar el consumo de productos amigables con el ambiente, que puedan ayudar a mitigar los efectos del cambio climático y las nuevas preferencias de los consumidores que buscan productos naturales y menos procesados, son factores que han generado una importante ventana de oportunidad para el uso de estos flavonoides. En la industria alimentaria, farmacéutica, cosmetológica y textil, se ha encontrado que el uso de antocianinas tiene un alto potencial, ya que pueden emplearse como fuente de colorantes naturales, como alimentos funcionales y como productos nutracéuticos.

La tendencia en el incremento del uso de pigmentos naturales en la industria alimentaria se debe a que se busca eliminar el uso de colorantes artificiales, ya que éstos se han vuelto menos populares entre los consumidores, quienes al tener conocimiento de que pueden inducir alergias o problemas digestivos, han optado por demandar productos que tengan una coloración natural, la cual asocian con efectos promotores de la salud, mientras que en el caso de los aditivos sintéticos, se les relaciona con problemas de intoxicación (Mercadante y Bobbio, 2008).

Bridle y Timberlake (1997) indican que el color de los alimentos juega un papel muy importante para el comprador, ya que como lo expuso Diehl (2008), el atractivo visual es el factor más significativo en la selección de los alimentos y en la apreciación de su calidad.

Bajo otro enfoque, la importancia del color de los alimentos retoma auge en el creciente y competitivo mercado, que se ha visto forzado a buscar nuevos productos capaces de

atraer a más consumidores, especialmente a las generaciones más jóvenes, para quienes la apariencia novedosa de los productos es un factor crucial para el éxito comercial de los alimentos. Los productos tales como las “bebidas divertidas” y lácteos con colores inusuales y atractivos como el anaranjado y el azul parecen ser interesantes para este sector.

Utilizar colorantes naturales en los alimentos no implica un sacrificio puesto que trae consigo beneficios a esta industria, ya que en primera instancia estos colorantes son seguros y efectivos (Giusti y Jing, 2008), además, se tiene evidencia de que los pigmentos provenientes de fuentes naturales pueden desplegar un amplio intervalo de colores, tienen una mayor capacidad de pigmentar que los colorantes sintéticos y en muchas ocasiones, se utilizan para restaurar el color de los alimentos (Mateus y Freitas, 2009), como conservadores (Diehl, 2008) o para proteger el sabor y las vitaminas susceptibles a la luz<sup>1</sup>. Desde la perspectiva económica, algunas de las mejores fuentes comerciales de pigmentos son el subproducto de ciertos procesos industriales que involucran otros productos de valor agregado y conjuntamente a su consumo, se ha observado que actúan como alimentos funcionales, por lo que la evaluación de los colores de la comida es un tema esencial en la tecnología de alimentos.

Dentro de los pigmentos naturales, las antocianinas por sus características cromáticas (colores brillantes que varían desde el rojo-anaranjado hasta el color azul), su capacidad de disolverse en agua y su nula toxicidad, representan al sustituto ideal de los colorantes rojos sintéticos. Asimismo, se ha señalado que las antocianinas a partir de pequeñas cantidades tienen la capacidad de desplegar el color deseado, por ejemplo, se requiere de 30 a 40 ppm para pigmentar un refresco y de 20 a 60 ppm para las conservas de frutas (Castañeda *et al.*, 2009; Brat *et al.*, 2008); sin embargo, su uso ha sido obstaculizado por su baja estabilidad, la cual es afectada por factores físicos y químicos tales como la temperatura, el pH, la luz, el solvente y la estructura del pigmento, al igual que los factores prevalecientes durante el procesamiento de los

---

<sup>1</sup>[http://marketpublishers.com/report/industry/chemicals\\_petrochemicals/anthocyanin\\_528-58-5\\_market\\_research\\_report.html](http://marketpublishers.com/report/industry/chemicals_petrochemicals/anthocyanin_528-58-5_market_research_report.html)  
Consultada: 2 Julio 2012

alimentos y su almacenaje; aunque con los avances en el conocimiento de las propiedades de las antocianinas se sabe que, en especial, las antocianinas aciladas, como lo indican Teh y Francis (1998) son las más adecuadas para utilizarse como colorante de alimentos, pues conservan estable el color especialmente cuando hay presencia de factores como la luz y el calor, y también se ha observado que son menos susceptibles a los cambios en color a través de la actividad enzimática.

Los productos en los que se emplean comercialmente las antocianinas como colorantes se incluyen principalmente los refrescos, algunas bebidas alcohólicas, dulces, caramelos, gomas de mascar, productos de panadería, repostería y confitería, lácteos, mermeladas, jaleas, conservas de frutas, fruta enlatada o en almíbar, jarabe de frutas, conservas de pescado, grasas, aceites, sopas, en mezclas de polvo como saborizantes para aderezar o para bebidas en polvo y en menor frecuencia, en productos congelados como helados (Boo *et al.*, 2012; He y Giusti, 2010; Wu *et al.*, 2006; Bridle y Timberlake, 1997).

El extracto de antocianinas que se ha utilizado por más tiempo es la enocianina, obtenida de la pulpa de uva roja; otras fuentes de pigmento son las frutillas y las cerezas. También, diversos extractos vegetales han sido utilizados para restaurar el color, incluyendo a la col roja (Dyrby *et al.*, 2001), la papa morada (Terahara *et al.*, 1999), la pulpa de papa roja (Rodríguez *et al.*, 1999), rábano (Otsuki *et al.*, 2002) y zanahoria morada (Stintzing *et al.*, 2002). Estos extractos vegetales han mostrado que son ricos en antocianinas aciladas. Otros frutos menos comunes como el acaí (*Euterpe oleraceae* L.), han sido evaluados para emplearlos como pigmento en yoghurt (Coisson *et al.*, 2005), mientras otros subproductos potencialmente ricos en antocianinas como las brácteas de la inflorescencia de plátano u olores de maíz son estudiados (Jing y Giusti, 2005; Pazmiño *et al.*, 2001). Cabe mencionar que el color azul es muy raro de obtener de forma natural como resultado de un sólo pigmento. En la naturaleza, el color azul puede ser el resultado de un complejo de antocianinas con metales o de la copigmentación (Saito *et al.* 1995); sin embargo, dentro del grupo de antocianinas, se encuentran las portisinas que lo hacen de forma natural.

En la industria cosmetológica, el cambio de colorantes sintéticos hacia aquéllos de origen natural, nuevamente se debe a la demanda del consumidor por productos seguros para la piel (Wegener *et al.*, 1987), inclusive, existe una nueva tendencia en esta industria que está creciendo rápidamente, en la que el objetivo es aprovechar los componentes funcionales activos de los pigmentos, bajo un esquema denominado cosmeceútica (*cosmeceuticals*), la cual representa una alianza entre los cosméticos y la farmacéutica<sup>2</sup>. Así, los cosméticos avanzados o cosmecéuticos, tienen un efecto benéfico de algún medicamento o “fármaco”, y pertenecen a los productos que están ubicados entre los cosméticos y los medicamentos (Ota y Yokoyama, 2010) que son aplicados tópicamente y pueden mejorar la apariencia, ya que liberan nutrientes necesarios para la salud del cutis; como ejemplos existen los productos aclaradores de la piel, con efecto antiedad, antiacné, antioxidantes y promotores de crecimiento del cabello (Raghvendra *et al.*, 2011) cuyas fuentes naturales más utilizadas son: té, soya, granada, dátil, semillas de uva, pycnogenol, castaña de indias, manzanilla, cúrcuma y *aloe*.

En el estudio realizado por Boo *et al.* (2012) se determinó la actividad antioxidante, el contenido total de polifenoles y flavonoides y los efectos antimicrobianos de algunos pigmentos, con la finalidad de determinar si éstos podían ser usados en los cosméticos; los resultados indican que la papa dulce morada, la morera, las hojas de morera, la cáscara de uva y las gardenias azules mostraron actividades antimicrobianas altas; sugiriendo que estas fuentes son excelentes materiales para la industria de los cosméticos. En otra evaluación, Chan *et al.* (2010) agregaron antocianinas extraídas de papas dulces moradas a una crema cosmética para proveer protección adicional contra la radiación, extrajeron las antocianinas de la variedad TNG73 con etanol y agua acidificados, teniendo una mejor captación de radicales libres del extracto etanólico, contenido total de fenoles más alto y una reducción más fuerte que aquéllas extraídas por agua acidificada. La crema cosmética con 0.61 mg de antocianinas totales (en 100 g de crema) absorbió aproximadamente 46 % de la radiación UV incidente. Aunque las antocianinas absorbieron tanto a la radiación UV-A como a la radiación UV-B, fueron

---

<sup>2</sup><http://emedicine.medscape.com/article/1067778-overview> Consultada: 2 Julio 2012

particularmente efectivas contra los rayos UV-B; por lo tanto, se concluyó que el uso de antocianinas en cremas mejora la capacidad de absorber la radiación.

En la industria nutracéutica, que surgió de la intersección de los sectores alimentario, farmacéutico y agrícola, como una necesidad de ofrecer a los consumidores de fármacos una alternativa que no les generara efectos secundarios pero sí que les diera un tratamiento terapéutico o preventivo, las antocianinas y otros componentes activos han sido estudiados y utilizados para brindarles una adecuada nutrición, la cual es imprescindible para su salud física y mental e indispensable para su actividad diaria y su productividad (Birujete *et al.*, 2009).

Así, puede entenderse que los productos nutracéuticos son cualquier alimento, ingrediente de los alimentos o sustancia biológica extraída de fuentes naturales (sin que se le realice algún tipo de manipulación química) que, en virtud de sus propiedades biológicas y además de su valor nutricional y sin sustituir la dieta diaria, aportan a quien los consume beneficios para su salud, puesto que ejercen algún efecto fisiológico positivo, actúan como medicamentos potenciales y pueden prescribirse como coadyuvantes terapéuticos con fines preventivos o curativos; por lo tanto, se puede decir que funcionan como un producto natural no elaborado y una sustancia química xenofóbica para el organismo. La novedad de estos alimentos estriba en el conocimiento científico de las propiedades benéficas que poseen (Birujete *et al.*, 2009; Garzón, 2008).

Las antocianinas recientemente han atraído más interés debido a sus posibles atributos en la salud, tales como (Soto *et al.*, 2012; He y Giusti, 2010; Giusti y Jing, 2008; Prior y Wu, 2006; Ming *et al.*, 2003; Clifford, 2000; Miyazawa *et al.*, 1999): la reducción de enfermedades coronarias, reducción del riesgo de padecer un infarto, actividad anticarcinógena (previene el cáncer, tiene efectos antitumorales), efecto vasoprotector, efecto antiinflamatorio, prevención de déficits de memoria, mejora del comportamiento cognitivo (mejora de la memoria a corto plazo pero no la de largo plazo), función antioxidante, funciones neuroprotectoras, efectos citoprotectores e inhibición de daño isquémico cerebral, acción antimutagénica y quimicopreventiva que contribuye a la

reducción de la incidencia de enfermedades crónicas y la prevención de la obesidad y la diabetes, , mejoramiento de la agudeza visual e inclusive, puede estimular la producción de insulina y enfrentar problemas de leucemia y linfomas.

Raghvendra *et al.* (2011) indican que al consumir extractos concentrados de frambuesa negra se tienen 200 veces más los beneficios que brinda la aspirina como antiinflamatorio, pero sin los efectos secundarios. Tsuda *et al.* (2003) publicaron resultados de los efectos del maíz morado en la prevención de la obesidad y la mejora de la resistencia a la insulina en ratones, los cuales fueron alimentados durante 12 semanas por: una dieta alta en cianidina-3-glucósido de maíz morado (MM), una dieta alta en grasas (AG) o una mezcla de las dos (AG + MM); la dieta alta en antocianinas de MM suprimió significativamente a los efectos de la dieta AG, que indujo un incremento en la ganancia de peso y especialmente del peso del tejido adiposo, indujo hiperglucemia, hiperinsulinemia e hiperleptinemia, la cual se normalizó en los ratones alimentados con la dieta mixta AG + MM.

Miyazawa *et al.* (1999) indican que durante el paso del tracto digestivo al torrente sanguíneo en los mamíferos, las antocianinas permanecen intactas y ejercen efectos terapéuticos conocidos, que incluyen la reducción de las enfermedades coronarias, efectos anticarcinógenico, antitumorales, antiinflamatorios y antidiabéticos; además de la mejora de la agudeza visual y del comportamiento cognitivo, todos estos efectos se relacionan con la actividad antioxidante de las antocianinas. Estudios con fracciones de antocianinas provenientes del vino han demostrado que éstas son efectivas en captar especies reactivas del oxígeno. Estos resultados sugieren que las antocianinas dan la explicación a la conocida “Paradoja Francesa” que sugiere que el bajo riesgo de la enfermedad coronaria en Francia se asocia con el alto consumo de vino tinto. De igual manera, Wang y Jiao (2000) y Wang y Lin (2000) han demostrado que frutos ricos en antocianinas evidencian una alta actividad antioxidante contra el peróxido de hidrógeno, contra radicales peróxido, superóxido, hidroxilo y oxígeno singlete.

Hagiwara *et al.* (2002) demuestran que el suministro de papas moradas dulces y col morada a ratas de laboratorio causa supresión de tumores. De igual manera, Koide *et*

*al.* (1997) reportan efectos antitumorales al usar extractos de soya roja que contiene cianidina conjugada con glucosa y ramnosa. En cuanto a la actividad anticancerígena, Kamei *et al.* (1998) señalan la supresión de células cancerígenas HCT-15, provenientes del colon humano y de células cancerígenas gástricas AGS, al suministrar fracciones de antocianinas del vino tinto. Así también, Tristan *et al.* (2005) realizaron bioensayos que demuestran que los arándanos inhiben las etapas de iniciación, promoción y progresión de la carcinogénesis. De acuerdo con Tristan *et al.* (2008) las antocianinas provenientes de cuatro especies de arándanos silvestres muestran propiedades hipoglicémicas. Tales frutos, con alto contenido de sustancias fitoquímicas, han sido consumidos tradicionalmente por tribus norteamericanas para la protección de enfermedades crónicas como la diabetes.

En 1987, Perossini *et al.* muestran que en estudios clínicos realizados en Italia, 79 % de los pacientes diabéticos consumidores de extracto de bayas rojas (60 mg, dos veces al día durante un mes) tuvieron alivio en los síntomas de retinopatía diabética. Finalmente, el mejoramiento de la agudeza visual y del comportamiento cognitivo como resultado del consumo de antocianinas ha sido reportado por Ohgami *et al.* (2005) quienes suministraron a ratas con deficiencia ocular, extractos de frutas ricas en antocianinas, lo cual resultó en un efecto antiinflamatorio y en un aumento en su agudeza visual. Shukitt *et al.* (2005) demostraron que el comportamiento cognitivo y las funciones neuronales de ratas de laboratorio puede ser mejorado a través de la suplementación nutricional con extractos de arándano y fresas.

Prior y Wu (2006) indican que dada la baja biodisponibilidad de las antocianinas, la dosis a ingerir debe ser alta (en un intervalo de 2 a 400 mg kg<sup>-1</sup> de peso corporal, dependiendo de la especie, ellos evaluaron ratones, cerdos y humanos) para que se pueda tener una respuesta favorable por el uso de estos pigmentos; sin embargo, un incremento en la dosis, no necesariamente significa que habrá un mayor absorción de antocianinas. En un estudio reciente en humanos, la máxima absorción de antocianinas fue a una dosis de 350 μmol (o menos) de antocianinas, tanto aciladas como no-aciladas, sugiriendo que existe una saturación del mecanismo de absorción; por otro

lado, se señaló que la ingesta diaria de antocianinas ideal es equivalente a 100 mg (Prior, 2004).

Anualmente en la naturaleza se producen  $10^9$  toneladas de antocianinas; no obstante, aunque hay una gran disponibilidad de fuentes de extracción, la uva es una de las mejores, ya que sus extractos son ricos en complejos antociánicos con otros compuestos y por lo tanto, son más estables a variaciones de pH y presencia de dióxido de azufre, en comparación con las antocianinas monoméricas (Raghvendra *et al.*, 2011). Sin embargo, existe una larga lista de especies de interés que actualmente son estudiadas por su contenido de antocianinas como: berenjena, arándano, arándano agrio, grosella roja y negra, frambuesa roja y negra, zarzamora, cebolla morada, cereza, col roja, durazno, granada, higo, jamaica, jitomate, maíz pigmentado, mango, manzana roja, pera, fresa, papa dulce morada, rábano, soya, ciruela, ruibarbo, endrino, zanahoria morada, entre muchos otros más.

En un estudio elaborado en 2006 por Wu *et al.*, más de 100 alimentos de consumo común fueron rastreados para la localización de antocianinas; se determinó que 34 contenían antocianinas, de los cuales tanto su concentración como el tipo de antocianinas presentes fueron diferentes; la cantidad de antocianinas varió desde 0.7 a 1480 mg  $100\text{ g}^{-1}$  de peso fresco. Prior (2004) indica que el contenido de antocianinas en los frutos oscila entre 0.25 a 700 mg  $100\text{ g}^{-1}$  de peso fresco, mientras que Clifford (2000) señala que los frutos que son más ricos en antocianinas ( $> 20\text{ mg } 100\text{ g}^{-1}$  de peso fresco) son los fuertemente coloreados (morado intenso o negro).

En el caso específico de México, se considera que el maíz (especie que se caracteriza por tener una gran importancia económica-sociocultural) tiene potencial para ser una excelente fuente de pigmentos antociánicos, inclusive, Cuevas *et al.* (2008) mencionan que las antocianinas originarias de este cereal son más estables que la antocianina. Además de que el maíz en este país es considerado el cultivo más importante (en parte porque del total de la superficie cultivada en el territorio mexicano, 38.6 % se destina a su producción), también, representa a uno de los alimentos esenciales que constituyen la dieta de los mexicanos (69 % de su producción se destina al consumo humano).

De la producción nacional de maíz, 50 % se obtiene de cinco estados: Jalisco, estado de México, Sinaloa, Chiapas y Michoacán y aunque en general se ha enfocado su producción hacia la obtención de maíz blanco, debido a que por mucho tiempo los maíces pigmentados han sido menospreciados por las políticas de mejoramiento genético y por la comercialización de granos (Muñoz, 2003) hoy en día existen regiones muy definidas (como el centro del país) en donde el maíz pigmentado es altamente demandado, inclusive, se ha observado que en los Valles Altos Centrales de México frecuentemente se pueden observar parcelas con aproximadamente un tercio de su superficie sembradas con maíz azul o de otro color (Salinas *et al.*, 2010).

Existen reportes que indican que desde épocas remotas el agricultor ha seleccionado los tipos de maíz de acuerdo con sus preferencias, necesidades alimentarias, económicas, y con las características ambientales de su área de cultivo; de este modo, al maíz azul ha sido relacionado con la precocidad y se ha utilizado para la elaboración de atole, tortillas, tlacoyos, gorditas, pinole y una gran variedad de alimentos mexicanos (Cortés *et al.*, 2005; Antonio *et al.*, 2004); inclusive, los maíces de color han estado presentes en la mitología, rituales religiosos y en la alimentación de las culturas indígenas de México, por ejemplo, María *et al.* (2003) señalan que en el pensamiento cosmológico maya, los maíces de color blanco, amarillo, rojo y negro se relacionan con los rumbos cósmicos: el maíz blanco se asocia con el norte, el amarillo con el sur, el rojo con el este y el negro con el oeste, mientras que los indígenas huicholes consideran a los maíces de color amarillo, rojo y negro como los guardianes de la milpa.

El maíz, es la especie más domesticada y evolucionada del reino vegetal, es única dada la diversidad genética que presenta la planta, la mazorca y el grano (Espinosa, 2008), la cual es consecuencia principalmente de sus usos y de la gran variación ecológica. Según Goodman y Brown (1988), en América se originó 90 % de todas las razas de maíz, inclusive en este continente se ubican 260 razas y dentro y entre ellas existe gran variación en el color del grano, lo que se ha comprobado en las razas

mexicanas (Wellhausen *et al.*, 1951), las peruanas (Grobman *et al.*, 1961) y en otras cultivadas en varios países (Goodman y Bird, 1977).

En un estudio llevado a cabo en México durante la década de 1940, los maíces se clasificaron en 32 razas agrupadas en 5 complejos raciales (Sánchez, 2004). Tiempo después, este trabajo fue refinado encontrándose al menos 41 razas agrupadas en 3 grandes complejos raciales (Ortega *et al.*, 1991). En 2002 y 2004, Sánchez *et al.* y Santacruz *et al.*, respectivamente, indican que al menos 59 razas han sido clasificadas con base en caracteres morfológicos y polimorfismos de isoenzimas, más el uso de algunos marcadores moleculares como los microsatélites.

Como variantes dentro de razas, es habitual observar e identificar colores de grano como blanco, amarillo, anaranjado, rojo, morado, café, azul, guinda, negro, púrpura, pinto, variegado y moteado (Aragón, 2006; Ron *et al.*, 2006; Salinas, 2000). En 2006, Espinosa *et al.*, con la finalidad de explorar la variación de la diversidad fenotípica del color del grano de maíz, evaluaron 114 poblaciones nativas de varios estados de la Meseta Central de México, caracterizándolas en seis grupos: 28 blanco, 44 amarillo, 4 anaranjado, 15 rojo, 18 azul y 5 púrpura, de las cuales las poblaciones de granos pigmentados fueron precoces, de granos más grandes, con olotes angostos y con mayor diámetro de mazorca que los no pigmentados. Salinas *et al.* (2010) indican que las razas de las que provienen los maíces pigmentados, en especial los azules, son las razas Chalqueño y Cónico, aunque también se pueden encontrar maíces azules de Cacahuacintle y Palomero Toluqueño.

Hoy en día, los maíces con diversos colores de grano continúan sembrándose en México como poblaciones nativas, las cuales provienen 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 (Espinosa, 2008).

Así, está claro que hace más de 10 000 años comenzó la historia del mejoramiento del maíz, con el inicio de su domesticación (Miranda, 2000) y desde entonces esta planta

ha sido modelada por el hombre. Este proceso ha implicado la selección y la conservación de aquellas plantas portadoras de caracteres de interés, las cuales se fueron manteniendo y en consecuencia, las frecuencias génicas de las poblaciones originales fueron cambiando y brindando mayores beneficios al hombre (Yamasaki *et al.*, 2007; Cuevas *et al.*, 1998).

En México, alrededor de 70 % de la superficie maicera es sembrada con variedades nativas y el desarrollo de maíces mejorados se ha enfocado principalmente a la formación de híbridos (Márquez *et al.*, 2000); no obstante, los cambios drásticos o mínimos que ha sufrido el maíz, han estado en función de la época, la región y en lo que en estas se ha considerado como el arquetipo de planta ideal. Por ejemplo, la predominancia del color de grano blanco en la producción nacional radica en que la industria de la harina de maíz demanda este color de grano, además de que éste sea grande, uniforme, denso y que su pericarpio se desprenda fácilmente, también se busca que provenga de 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 (Rooney *et al.*, 2004). La tortilla que se elabora con granos cremosos que tienen alto contenido de ácidos fenólicos y donde el color resultante no es completamente blanco, se dice que no es aceptada por el consumidor y tampoco el grano de esos maíces es fácil de comercializar (Salinas *et al.*, 2007).

Aunque el maíz pigmentado no ha tenido el mismo auge que el de color blanco, existe un antecedente histórico de su consumo y producción en diversas culturas de México, en donde predominantemente la producción era reservada para el autoconsumo (Brush y Perales 2007). Hoy en día, se reconoce al grano pigmentado como un tipo “especial” de maíz (Mendoza, 2004) que acorde con Rooney *et al.* (2004) se destina a la producción de harina orgánica y a la elaboración de frituras y otros alimentos, inclusive, es evidente que está retomando importancia por el incremento de su demanda, fundamentalmente como consecuencia de la difusión del conocimiento científico que explica las propiedades bioactivas que posee.

El mejoramiento genético hacía la obtención de materiales que expresen la pigmentación, se ha basado esencialmente en la selección, en el caso de los maíces pigmentados del Perú y Bolivia, denominados maíces morados que son una variedad que posee el olote y los granos de color morado han sido desarrollados por las culturas étnicas de esa región (Cuevas *et al.*, 2008). En México ha ocurrido de forma similar, inclusive, la fundación PRODUCE, ha desarrollado proyectos orientados al estudio de los maíces nativos con este tipo de grano, en donde se ha conjuntado información sobre las zonas de producción, la diversidad en cuanto a características físicas del grano y su desempeño en el proceso de nixtamalización.

Aunque Salinas *et al.* (2010) indican que en los Valles Altos de México no se dispone de algún híbrido de grano azul para dichas condiciones agroecológicas, desde 2007 el Dr. Moisés Mendoza Rodríguez ha comercializado un híbrido de grano azul denominado H-San Miguelito y algunas variedades sintéticas (comunicación personal, 2010). También, se ha identificado el uso de un criollo mejorado por el Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria, Acuícola y Forestal del Estado de México (ICAMEX), cuya semilla se comercializa con el nombre de “Negro Carioca”. En los estados de Querétaro y Chihuahua se están cultivando los híbridos azules 505Az y 512Az que se comercializan bajo la marca Águila; sin embargo, como se mencionó con anterioridad, son los maíces nativos los más frecuentemente sembrados.

En Perú se cultivan las variedades PM-212, PM213, PM702, PMV-581, PMC584, PMD638 y otras como el morado forrajero y el experimental 05, probado en la costa<sup>3</sup>, mientras que en Hungría se ha desarrollado un programa de mejoramiento de maíz morado, azul, rojo, blanco, amarillo y cebada pigmentada, basándose en la endogamia y la hibridación<sup>4</sup>.

Dentro del programa de investigación del Posgrado de Recursos Genéticos y Productividad del Colegio de Postgraduados, se está llevando a cabo un programa de mejoramiento genético de maíces pigmentados a cargo de la Dra. Ma. del Carmen

---

<sup>3</sup><http://exportacionesdelperu.blogspot.mx/search/label/Maiz%20Morado> Consultada: 2 Julio 2012

<sup>4</sup> <http://5mp.eu/web.php?a=bluecorn&o=uLqDcWeHFf> Consultada 25 Julio 2012

Mendoza Castillo, en el cual mediante metodologías de mejoramiento genético clásico se ha logrado desarrollar poblaciones de grano pigmentado (Espinosa *et al.*, 2009); también se han generado poblaciones que sintetizan antocianinas en todos los órganos de la planta de maíz y se tiene en proceso la formación de algunos híbridos (Mendoza, C. M. del C., comunicación personal, 2011). También, en el mismo posgrado, se encuentra el Dr. Fernando Castillo González, quien ha realizado una labor de gran relevancia al explorar y coleccionar la diversidad genética de este tipo de maíces.

El mercado de los maíces pigmentados, promueve el desarrollo de versiones mejoradas de los maíces nativos, nuevas variedades, poblaciones o híbridos en donde se “perfeccionen” sus atributos, ya que como lo han señalado diversos mejoradores de maíz, en esta planta se encuentra toda la variabilidad genética necesaria para mejorar cualquier característica que se desee (Sánchez, 2004).

### **1.1. OBJETIVO GENERAL**

Hacer un análisis de la información científica disponible sobre la importancia de las antocianinas y determinar el potencial de los maíces pigmentados para actuar como una fuente de pigmentos y compuestos nutraceuticos.

### **1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Identificar cuál es la dinámica de acumulación de antocianinas en cada genotipo de maíz evaluado y determinar si en este cultivo existe un patrón característico de acumulación en los órganos constituyentes a través del desarrollo de la planta.

Cuantificar el contenido de antocianinas totales por planta y por órgano en cada genotipo de maíz evaluado e identificar cuáles son los órganos con mayor producción de antocianinas.

Establecer cuál es el periodo óptimo para la cosecha del cultivo de maíz para obtener el máximo rendimiento de antocianinas por unidad de superficie.

### **1.3. HIPÓTESIS GENERAL**

Debido a su potencial para acumular antocianinas en todos los órganos de la planta se considera que el maíz pigmentado es una fuente rica en este compuesto; sin embargo, el potencial para acumular antocianinas será mayor en algunos órganos y habrá un momento en la fenología del cultivo en el que la concentración del pigmento será máxima para considerarlo como el período óptimo para la cosecha de las plantas.

## CAPÍTULO II

### DINÁMICA DE ACUMULACIÓN DE ANTOCIANINAS EN LA PLANTA DE MAÍZ DE POBLACIONES PIGMENTADAS

#### 2.1. RESUMEN

La búsqueda de nuevos cultivos con potencial productivo de antocianinas para su extracción y utilización en diversas industrias que aprovechen sus propiedades nutracéuticas, ha permitido definir que el maíz es una fuente rica en compuestos antociánicos, el cual además de acumularlos en el grano, también es capaz de producirlos en todos los órganos de la planta; sin embargo, aun cuando existen investigaciones sobre el contenido de antocianinas totales en el grano y en algunos órganos de la planta, hasta la fecha no se ha reportado cómo ocurre el proceso de pigmentación, por lo que en este estudio, con la finalidad de conocer la dinámica de acumulación de antocianinas en maíz, fueron establecidas siete poblaciones pigmentadas durante dos ciclos de producción, primavera-verano 2009 y 2010, en el Campo Agrícola Experimental Montecillo, del Colegio de Postgraduados en Texcoco, estado de México. Las poblaciones fueron muestreadas en once ocasiones durante el periodo comprendido entre 30 y 138 días después de la siembra; en cada muestreo se colectaron 3 plantas que fueron disecadas en fresco, para tomar fotografías de la planta completa y por órgano. Mediante el análisis de las fotografías se describió la dinámica de acumulación de antocianinas y se determinó que en el maíz pigmentado existe un patrón definido de acumulación de antocianinas en la planta y en cada uno de sus órganos; asimismo, se concluyó que en la planta de maíz la pigmentación por antocianinas se presenta en los órganos con la siguiente secuencia: vainas foliares, láminas foliares, tallo, espiga, jilotes inferiores, brácteas del jilote superior o mazorca, pedúnculo, olote y finalmente grano; también, se registró que en los órganos de la planta de maíz el sentido en el que se acumulan las antocianinas puede ser basípeto o acrópeto.

**Palabras clave:** *Zea mays* L., maíz pigmentado, antocianinas, dinámica de acumulación.

## 2.2. INTRODUCCIÓN

En el cultivo de maíz se han realizado investigaciones de toda índole, desde el estudio de su origen hasta la determinación de su genoma; sin embargo, aún hay sucesos por descubrir y describir; por ejemplo, la dinámica de acumulación de antocianinas en la planta completa. Hasta la fecha no existe un trabajo que reporte este proceso de pigmentación, aunque sí existen investigaciones sobre el contenido de antocianinas totales en el grano (Espinosa *et al.*, 2009) y en algunos órganos de la planta (Yang *et al.*, 2009), los tipos de antocianinas y los genes que controlan su síntesis. En otras especies angiospermas, existen reportes sobre los patrones de distribución; Kawamura *et al.* (2000) determinaron el patrón de la distribución de las antocianinas en células epidérmicas de venas y láminas foliares de 30 especies vegetales. Arena *et al.* (2012) estudiaron los patrones de acumulación de los compuestos fenólicos (incluyendo a las antocianinas) durante el crecimiento del fruto y maduración de *Berberis buxifolia* y su correlación para determinar el período óptimo y condiciones necesarias para la obtención del máximo contenido de compuestos fenólicos. Cooper (2001) señala que el estudio de los patrones de acumulación de antocianinas es útil para la clasificación sistemática a nivel de familia y género, como el trabajo realizado por Andersen y Øvstedal (1988), quienes reportaron el contenido de antocianinas en especies de *Saxifraga* y determinaron que el patrón de antocianinas sustentaba la clasificación establecida dentro del género. Yoshitama *et al.* (1987) examinaron el tipo y cantidad de antocianidinas de 46 plantas poligonáceas, a las cuales clasificaron en tres grupos: uno que sólo contenía cianidina, otro delfinidina y cianidina y el tercero que tenía una antocianidina llamada PA-X y cianidina.

En esta investigación se determinó el patrón de acumulación de antocianinas en la planta de maíz, en cada uno de los órganos que la conforman y el sentido en el que se fueron acumulando.

### **2.2.1. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la dinámica de acumulación de antocianinas en la planta de maíz de poblaciones pigmentadas mediante el registro y análisis de imágenes fotográficas captadas a través de las diferentes etapas fenológicas del ciclo de cultivo.

### **2.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Determinar si existe un patrón definido de acumulación de antocianinas en la planta de maíz pigmentado.

Identificar los órganos de la planta que inician la acumulación de antocianinas, el sentido en el que se presenta la pigmentación en dichos órganos y si ésta persiste durante el ciclo fenológico del cultivo.

### **2.2.3. HIPÓTESIS**

Aunque la producción de antocianinas en los tejidos vegetales tiene una amplia variación en cuanto a su localización en los órganos de la planta, también a través de las etapas fenológicas del cultivo y se encuentra fuertemente determinada por diversos factores ambientales y genéticos, se considera que en maíz (*Zea mays* L.) sí existe un patrón definido de la dinámica de acumulación en todos los órganos de la planta, independientemente de que los genotipos manifiesten diferentes niveles de pigmentación total.

### 2.3. REVISIÓN DE LITERATURA

Las antocianinas son metabolitos secundarios que en el Reino Vegetal se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas superiores (especialmente en las angiospermas), helechos, musgos, y con poca frecuencia son localizadas en plantas hepáticas (Oliver, 2002; Cooper, 2001). Para el hombre, el grupo de las plantas angiospermas es importante ya que constituye una fuente de cultivos alimenticios que satisfacen sus necesidades nutricionales, como las diversas especies pertenecientes fundamentalmente a las familias *Poaceae* y *Fabaceae*. Andersen y Øvstedal (1988) indican que las antocianinas se encuentran en al menos 27 familias, 73 géneros y en una multitud de especies; inclusive, todas las plantas superiores poseen el potencial para producir antocianinas y si en algunas no se aprecia su color característico, se debe a que la síntesis del pigmento no es favorecida por determinadas condiciones ambientales o porque no se ha realizado selección para tal fin (Bridle y Timberlake, 1997; Taylor y Briggs, 1990; Weldhale, 1925).

Al observar la distribución de las antocianinas en los órganos de las plantas comestibles, se ha reconocido que éstas se producen con mayor frecuencia en los frutos y las semillas (Blank, 1947) en donde funcionan como atrayentes de polinizadores y agentes dispersores de las semillas; aunque también se ha señalado que pueden producirse en las raíces, en hipocótilos, coleóptilos, tallos, tubérculos, rizomas, estolones, bulbos, cormos, yemas axilares, hojas, brácteas, espigas, etc. (Hatier y Gould, 2009; Bridle y Timberlake, 1997). Gould *et al.* (2000) señalan que la ubicación de este flavonoide en el esporofito dependerá en gran medida de la función biológica que en éste desempeñe, aunque Lee y Collins (2001) indican que las antocianinas constantemente se encuentran asociadas con células clorofílicas.

Comúnmente los flavonoides y las antocianinas se encuentran almacenadas dentro de las vacuolas de casi todos los tipos de células (Hatier y Gould, 2009), también se les ha ubicado adheridas a las paredes celulares (Markham *et al.*, 2000) y en el núcleo (Hutzler *et al.*, 1998); sin embargo, existe evidencia que muestra que más de 90 % de la actividad enzimática involucrada en la síntesis de antocianinas ocurre en el

citoplasma y cerca del retículo endoplásmico; en el citoplasma, las enzimas que forman a las antocianinas, como la fenilalanina amonioliasa, encuentran el pH óptimo (7 ó mayor) para funcionar adecuadamente; según Oliver (2002) las antocianinas sintetizadas en estas condiciones de pH se mantienen en equilibrio en la forma pseudobase, siendo incoloras (forma hemiacetal o base carbonil) o ligeramente azules (base quinoidal o base anhidro quinoidal).

Después de ser sintetizadas, las antocianinas son transportadas (secuestradas) hacia la vacuola, las cuales pueden ocupar más de 90 % del volumen total de la célula (Irani y Grotewold, 2005). Se dice que las antocianinas puede ser transportadas directamente en vesículas que migran del retículo endoplásmico hacia la vacuola sin pasar por el citoplasma (Poustka *et al.*, 2007), o de otra forma, por difusión; es decir, que las antocianinas son transportadas desde el retículo endoplásmico hacia la vacuola pasando transitoriamente a través del citoplasma por medio de algunas enzimas de transporte como la glutatión-S-transferasa y la MRP (multidrug resistance protein). Debido a que las condiciones de pH cambian en las vacuolas celulares (generalmente el pH varía entre 4.5 y 5.5 pero puede ser de 2.8 hasta 7.5), al llegar a este organelo, las antocianinas se tornan de color rojo (Neill y Gould, 2003; Cooper, 2001).

Jiang (2000) indica que adheridos a las membranas de la vacuola también pueden encontrarse orgánulos esféricos intensamente coloreados que carecen de membrana o de una estructura interna conocidos como antocianoplastos, mientras que Markham *et al.* (2000) señalan que existen otros complejos exclusivos de las antocianinas diglucósidas, que se encuentran adjuntos a matrices de proteínas específicas denominados inclusiones vacuolares antociánicas (AVI's).

No obstante que las antocianinas han sido ampliamente estudiadas, hasta la fecha los científicos no han podido explicar con exactitud cuál es su función en la planta, algunos investigadores señalan que al ser ubicadas dentro de las vacuolas se trata entonces de productos ergásticos de desecho, que deben ser eliminados de la célula porque, de lo contrario, podrían generar una intoxicación; otros argumentan que las antocianinas cumplen un papel funcional debido a que su biosíntesis es muy compleja y

energéticamente costosa para la planta, por lo que podría parecer un desperdicio de recursos extravagante si éstas no tuvieran función alguna (Oliver, 2002).

Entre las especies vegetales, así como en los distintos tipos de tejidos, se observa una inmensa diversidad en la expresión de las antocianinas, la cual está en función del control genético y de determinados estímulos ambientales; por ejemplo, en gran número de especies las antocianinas sólo se producen cuando la planta está enferma o cuando ha sido expuesta a estrés ambiental, mientras que otras especies desarrollan la pigmentación rojiza incluso estando bajo condiciones óptimas de crecimiento, por lo que es improbable que alguna hipótesis explique con exactitud la razón de la variación de los patrones espaciales y temporales de las antocianinas; sin embargo, está claro que su síntesis y almacenamiento se da como respuesta al estrés, a la presión de selección y a la expresión génica.

A continuación se mencionan algunas de las funciones más documentadas de estos pigmentos:

- a) Puesto que las antocianinas le imparten color a las plantas y a sus productos, actúan como un mecanismo de atracción de polinizadores y dispersores de las semillas, por lo tanto, tienen un valor considerable en la coevolución de esta interacción planta-animal (Ming *et al.*, 2003). Estudios con líneas isogénicas de *Mimulus* muestran que un cambio en color puede atraer a un colibrí como polinizador en lugar de un abejorro, pudiendo ocasionar un aislamiento genético y en última instancia, la especiación (Bradshaw y Schemske, 2003).
- b) Se manifiestan como síntomas del estrés o como mecanismos de respuesta al estrés (Chalker, 1999) ya que, sin tomar en cuenta su localización, la síntesis de antocianinas generalmente es regulada como respuesta a uno o más factores de estrés ambiental, éstos incluyen: radiación solar intensa, radiación UV-B, temperaturas extremas, sequía, ozono, deficiencias de nitrógeno y fósforo, infecciones originadas por bacterias y hongos, heridas, herbivoría, herbicidas y varios contaminantes (Hawrylak, 2008).

Por ejemplo, la presencia de antocianinas en las hojas puede ayudar a incrementar su temperatura, al absorber *quanta* de energía y así actuar como un termorregulador. En regiones árticas y alpinas se ha sugerido que las antocianinas juegan un importante papel al absorber la radiación y calentar el tejido de la hoja; mientras que en árboles tropicales, en el caso de las hojas antociánicas jóvenes que se encuentran en desarrollo, la temperatura es significativamente más elevada que en las hojas adultas verdes y pueden desarrollarse más rápidamente. Ante la presencia de hongos, se ha observado que en hojas jóvenes, la acumulación de antocianinas puede conferirle a la planta una defensa contra estos patógenos; también, en el caso de ataques por hormigas, se ha descrito que a mayores concentraciones de antocianinas el ataque es menor. Otra condición de estrés es producida por las heladas, que pueden ocasionar la deshidratación citoplásmica y la formación de cristales de hielo; la presencia de antocianinas provee a los tejidos de protección osmótica, ya que al estar ligadas con glucósidos, éstos pueden modificar el potencial osmótico de las células y así, minimizar la pérdida de agua durante el congelamiento (Chalker, 2002). Se postula que tal protección es suficiente para proteger a los tejidos jóvenes del daño por helada o de las hojas de especies deciduas durante la movilización de sustancias para el almacenamiento de invierno (Xin y Browse, 2000).

- c) Representan un sistema de fotoprotección, ya que pueden proteger a las células fotosintéticas de los efectos adversos de la radiación solar intensa (Quina *et al.*, 2009). Dentro del grupo de los flavonoides, las antocianinas son los únicos compuestos que absorben una radiación apreciable en el espectro visible y se ha sugerido que en este caso, ellas sirven para impulsar o disminuir la captura de radiación, dependiendo de su localización. Aquéllas ubicadas en la superficie abaxial de las hojas se considera que incrementan la captura de radiación al reflejar la luz roja transmisible de regreso hacia el tejido que contiene a los cloroplastos (parénquima esponjoso), siendo un mecanismo de utilidad para las plantas que crecen y se desarrollan en ambientes de sombra. En sentido inverso, la presencia de antocianinas en la superficie adaxial de la hoja y en el parénquima de empalizada puede reducir la captura de radiación, ayudando a la protección de los

cloroplastos y reduciendo, en la medida de lo posible, la fotoinhibición y la fotooxidación.

- d) Actúan como un sistema de protección contra la radiación ultravioleta (R-UV), la cual se clasifica en UV-A (390-320 nm), UV-B (320-280 nm) y UV-C (< a 280 nm). Se sabe que con una absorbancia máxima de 260 nm el ADN es altamente vulnerable a los efectos de los rayos UV-C, por lo tanto, las plantas han desarrollado múltiples mecanismos para disminuir la penetración de la R-UV en el tejido vegetal, incluyendo entre éstos a la síntesis de compuestos fenólicos que la absorben (Ryan y Hunt, 2005). En muchas especies la biosíntesis de antocianinas es activada por la exposición a la R-UV; en especial, las antocianinas aciladas pueden absorber la R-UV biológicamente activa y se ha sugerido que su función en los tejidos vegetativos puede ser para amortiguar el daño que ocasiona la R-UV, al atenuar el exceso de energía (Li *et al.*, 1993; Takahashi *et al.*, 1991).

Las antocianinas foliares tienden a no ser aciladas, por lo tanto, son amortiguadores de la R-UV aunque menos efectivos que otros flavonoides (Woodall y Stewart, 1998); además para que la protección sea eficiente, las antocianinas deben interceptar la R-UV incidente antes de que llegue a los cloroplastos; en el caso de las hojas significa que los pigmentos deben estar en las vacuolas o en las paredes celulares de los tejidos epidérmicos e hipodérmicos.

- e) También actúan como un sistema de captación de radicales libres, ya que la radiación intensa, aunada a la radiación UV, pueden incrementar la producción de radicales libres en las células de la planta. Se ha sugerido que mediante la absorción de una proporción de los *quanta* de energía incidentes y por la captación de los radicales libres así formados (especialmente de aquellas especies reactivas con oxígeno, denominadas ROS), las antocianinas foliares podrían servir para disminuir la oxidación. En cuanto a la captación de ROS, se ha reportado que las antocianinas son cuatro veces más efectivas que la vitamina C y K; esta característica se debe a su alta reactividad como donador de protones y electrones, a su habilidad para estabilizar y deslocalizar electrones desapareados y a su capacidad de quelatar los iones de metales de transición (Hatier y Gould, 2009).

Aunque las plantas son capaces de sintetizar antocianinas, existen diversos factores que afectan su producción y su estabilidad (Brat *et al.*, 2008). En un estudio en hojas albinas de maíz realizado por Kim *et al.* (2006) se analizaron los efectos de las señales ambientales y químicas en la síntesis de antocianinas, se observó que la aplicación de carbohidratos estimuló su biosíntesis, siendo las mejores fuentes de carbohidratos la fructosa, glucosa y sacarosa, esta última mejoró la expresión de los genes involucrados en la síntesis a nivel transcripcional.

En la investigación realizada por Irani y Grotewold (2005) en donde se indujo la formación de antocianinas en vacuolas de maíz, se observó que las células que se desarrollaron en condiciones de oscuridad presentaron múltiples vacuolas, mientras que en condiciones de luz abundante se disminuyó el número de vacuolas pero se incrementó su tamaño.

Bustos *et al.* (2012) estudiaron la dinámica de acumulación de antocianinas en el grano de trigo y observaron que ésta es afectada por la posición que ocupa el grano en la espiga, por las relaciones fuente-demanda, y por las prácticas agrícolas aplicadas como la dosis de fertilización y el período de cosecha; observaron que la posición del grano en la espiga afectó su peso y contenido de antocianinas, decreciendo en la posición distal; la reducción de la fuente disminuyó el contenido de antocianinas en 26 y 51 % y la fertilización con magnesio y la cosecha temprana aumentaron el contenido y la concentración de antocianinas en 65 y 39 %, respectivamente.

En el estudio realizado por Hawrylak (2008) se indica que la presencia de selenio en el suelo puede ocasionar un incremento en el contenido de antocianinas y un decremento simultáneo de la concentración total de clorofila, dependiendo de la forma química del elemento y de la dosis. La evidencia experimental muestra que los cambios en el contenido de antocianinas pueden ser utilizados como un parámetro de prueba, reflejando el grado de toxicidad del selenio en las plantas de maíz; a su vez, puede ser potencialmente útil para la bioindicación de la fitotoxicidad de selenio en otras plantas superiores.

También, Mol *et al.* (1998) describen que la forma de las células epidérmicas es un importante factor para apreciar la pigmentación, ya que en casos donde las células tienen forma cónica o plana, las propiedades ópticas de las antocianinas son influenciadas y por lo tanto, también el color que se percibe. Otro parámetro que afecta la pigmentación es la temperatura, la cual cuando es baja se ha observado que se promueve la síntesis y acumulación de antocianinas, mientras que cuando se incrementa, se inhibe la síntesis. En condiciones de clima cálido se ha detectado que la tasa de acumulación de antocianinas se reduce, probablemente debido a que se requiere una mayor cantidad de energía para la síntesis del pigmento (Brat *et al.*, 2008; Wheldale, 1925).

En numerosas especies se considera que la herencia de las antocianinas es de carácter mendeliano (Wheldale, 1925), aunque también se ha descubierto que la variación en los estados epigenéticos pueden generar patrones de herencia no mendelianos como la paramutación y los transposones (Woodhouse *et al.*, 2006). Durante la última década, la clonación de los genes estructurales que codifican a las enzimas en la ruta biosintética de las antocianinas y la identificación de genes que codifican a los factores de transcripción que regulan la expresión de los genes estructurales, han contribuido al entendimiento de las bases moleculares de la biosíntesis de antocianinas en plantas superiores (Honda *et al.*, 2002).

En el caso exclusivo del maíz, se sabe que aproximadamente 15 genes distintos tienen influencia en la biosíntesis de antocianinas, y que varios genes reguladores y estructurales se encuentran por duplicado, como los genes *PL*, *B*, *R* y *C* (Halbwirth *et al.*, 2003). Cone (2007) indica que siete genes estructurales codifican enzimas catalíticas, seis genes reguladores codifican factores de transcripción, y dos genes corresponden a transportadores del pigmento hacia las vacuolas, algunos de ellos tienen más de dos alelos por locus (el gen *A<sub>1</sub>* y *P* tienen un número combinado de por lo menos 13 alelos), son epistáticos y se ubican en diferentes cromosomas, lo cual indica que no hay ligamiento (Ford, 2000). Hanson *et al.* (1996) señalan que son ocho genes enzimáticos los que actúan en la síntesis y el transporte de las antocianinas y

cinco genes reguladores son los encargados de la expresión de la pigmentación en tejidos específicos; Taylor y Briggs (1990) mencionan que además de los genes involucrados en la síntesis de este flavonoide, en el proceso también participan más de 20 *loci*.

Los genes clasificados como reguladores por Cone (2007) y Hanson *et al.* (1996) son: *B* (ubicado en el cromosoma 2), *C<sub>1</sub>*, *PL* (confinado en el cromosoma 6), *Vp<sub>1</sub>*, *R* (localizado en el cromosoma 10), *Lc* y *Sn* (encontrados dentro de los *loci R*), los cuales además de formar a los factores de transcripción que activan a los genes enzimáticos (encargados de la síntesis y transporte de antocianinas), también definen en qué tejido se expresará la pigmentación. Los genes estructurales o enzimáticos son: *A<sub>1</sub>* (ubicado en el cromosoma 3), *A<sub>2</sub>*, *Bz<sub>1</sub>*, *Bz<sub>2</sub>*, *C<sub>2</sub>*, *Chi*, *Pr* y *whp*.

En 1964, Reddy ubicó a los genes en secuencia, para determinar en el tejido de aleurona la ruta metabólica de las antocianinas, de la siguiente manera:

$$C^I \rightarrow C_1 \rightarrow C_2 \rightarrow R \text{ o } B \rightarrow In \rightarrow A_1 \rightarrow A_2 \rightarrow Bz_1 \rightarrow Bz_2 \rightarrow \text{Antocianinas}$$

En dicha ruta se observa la interacción entre los genes reguladores y enzimáticos, los cuales parten de los genes del grupo *C*, específicamente del gen *C<sub>1</sub>* que codifica a un factor de transcripción que induce la formación de la enzima chalcona sintasa, producida por el gen *C<sub>2</sub>*; después, nuevamente un gen regulador (ya sea *B* o *R*) genera un factor de transcripción que puede activar al gen *In*, el cual determina la concentración del pigmento; posteriormente el gen *A<sub>1</sub>* induce la formación de la enzima dihidroflavonol reductasa, seguida por el gen *A<sub>2</sub>* que forma a la enzima 3-glucosil transferasa; se activa el gen *Bz<sub>1</sub>* (5-glucosil transferasa), el gen *Bz<sub>2</sub>* (glutathion-S-transferasa) y se forman las antocianinas.

Dado que existen genes que determinan la ubicación del pigmento en el tejido vegetal, se ha descrito que para que se produzca la pigmentación en la aleurona de la semilla de maíz, se requiere que en el genoma se encuentren presentes los genes *A<sub>1</sub>*, *A<sub>2</sub>*, *C<sub>1</sub>*, *C<sub>2</sub>* y *R*; en caso de faltar alguno, la producción de antocianinas no se llevará a cabo (Kim *et al.*, 2006; Styles y Ceska 1975; Harbone y Gavazzi, 1969). En este mismo

tejido, los genes que definen el tipo de pigmento son *Pr*, *Bz<sub>1</sub>* y *Bz<sub>2</sub>* (cuando alguno de los dos es recesivo, la pigmentación es bronceada), los cuales deben estar en la forma homocigótica recesiva, para causar un cambio cualitativo en el pigmento. Sharma *et al.* (2011) señalan que los genes *C<sub>1</sub>* y *R<sub>1</sub>* deben actuar en conjunto (genes complementarios) para acumular antocianinas en la aleurona. Otros genes involucrados en la pigmentación del grano son *Bh*, que controla el patrón de pigmentación, el gen *In* que se encarga de la concentración de antocianinas (el color es más intenso cuando es recesivo) y el gen *P<sub>1</sub>* que se encarga de la pigmentación del pericarpio (Taylor y Briggs, 1990). El gen *P* (ubicado en el cromosoma 1) controla la biosíntesis de las 3-deoxiantocianinas y se encuentra restringida al pericarpio y a los estigmas del maíz (Halbwirth *et al.*, 2003).

Para que la síntesis y acumulación de antocianinas ocurra en otros órganos de la planta actúan los genes de la serie *R* y *A<sub>1</sub>* (Harborne y Gavazzi, 1969), aunque también se conocen otros genes que ejercen control en dicha pigmentación; Styles y Ceska (1975) indican que los genes *A<sub>1</sub>* y *A<sub>2</sub>* deben estar presentes y actuar en conjunto con un gen de la serie *B* o *R*, mientras que Sharma *et al.* (2011) señalan que la síntesis de antocianinas en la parte vegetativa se debe a la acción conjunta del gen *B<sub>1</sub>* y *PL<sub>1</sub>*. En 1972, Styles y Ceska establecen que los genes *C* son necesarios para la formación de antocianinas en la semilla, pero no para el tejido vegetativo de la planta.

Se ha reportado que cuando el gen *PL* es dominante puede pigmentar a las brácteas y vainas que durante su desarrollo y crecimiento no son expuestas a la luz, mientras que en su forma recesiva sólo las zonas iluminadas logran pigmentarse; es decir, que para su expresión, los alelos dependen de la luz (Taylor y Briggs, 1990).

El grupo de genes *R* determina el momento en que se presentan, la distribución y la cantidad de antocianinas en maíz; cuando el alelo es dominante en el locus *R*, se producen pigmentos en las vainas de las plántulas, y en su forma recesiva se sintetiza chalcona sintasa, pero no se acumulan las antocianinas, también se ha comprobado que regulan la síntesis de antocianinas inducidas por la luz. El gen *R<sub>1</sub>* codifica al factor de transcripción bHLH (Consonni *et al.*, 1993.) y también puede formar a las 3-

hidroxiantocianinas, las cuales pueden ser sintetizadas en casi todos los tejidos de la planta de maíz (Halbwirth *et al.*, 2003).

Los genes de la serie *B* juegan un rol directo en la regulación de la acumulación de antocianinas en plantas adultas, cuando se encuentra en su forma dominante se incrementa la actividad de la glucosil transferasa y también aumenta la pigmentación. El gen *B<sub>1</sub>* forma al factor de transcripción bHLH (Taylor y Briggs, 1990).

El gen *Pr* controla el patrón de hidroxilación en el anillo B de las moléculas de antocianinas, cuando es recesivo hay ausencia de un grupo hidroxilo y entonces la antocianina más abundante es la pelargonidina, mientras que cuando es dominante, hay un grupo hidroxilo y la antocianina más abundante es la cianidina (Styles y Ceska, 1975).

En el cultivo de maíz, el orden exacto de la biosíntesis depende de la forma en la cual los productos metabólicos son canalizados a través de los complejos enzimáticos, pero generalmente parte de la desaminación de la fenilalanina hacia la función de la glucosil transferasa del gen *Bz<sub>1</sub>*, siguiendo con la síntesis, las antocianinas son trasladadas a la vacuola con la ayuda de el producto del gen *Bz<sub>2</sub>*, el cual es una glutathion-S-transferasa, y es transportada a la vacuola, probablemente por una MRP (Champney, 2002), como la *ZmBz2*, la *ZmMrp-3* (ubicada en el tonoplasto) o la *ZmMrp-4* (encontrada en la aleurona) (Koes *et al.*, 2005; Goodman *et al.*, 2004). De esta gramínea se ha extraído cianidina, pelargonidina, peonidina, luteolina, y otros cinco pigmentos morados o púrpuras no identificados; sin embargo, las antocianinas comúnmente encontradas en este cultivo son derivadas de la cianidina y la pelargonidina, como cianidina-3-glucósido y pelargonidina 3-glucósido (Bridle y Timberlake, 1997; Hanson *et al.*, 1996; Styles y Ceska, 1972; Clifford y Harborne, 1967).

## 2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

La evaluación de la dinámica de acumulación de antocianinas se realizó durante dos ciclos de cultivo, en Primavera-Verano de 2009 y Primavera-Verano de 2010. Las plantas se establecieron en el Campo Agrícola Experimental Montecillo, del Colegio de Postgraduados en Texcoco, estado de México. En el ciclo de 2009 se establecieron 8 genotipos de maíz (6 maíces con pigmentación: 2650, 2651, 2653, 2655, 2656 y 2657; y 2 con plantas completamente verdes: 2652 y 2654, todos obtenidos a partir de maíces nativos de México en el programa de mejoramiento genético de maíz de Fisiotecnia Vegetal-Genética, del Colegio de Postgraduados) mientras que en el ciclo Primavera-Verano 2010 se evaluaron solo 4 genotipos contrastantes en pigmentación: planta completamente verde (población 2217), con pigmentación en todos los órganos de la planta, excepto en el grano (población 2218), planta completamente pigmentada (población 2222) y planta verde con grano pigmentado (población 2223). Las poblaciones 2217 y 2218, fueron las mismas que se sembraron en el ciclo 2009 bajo la denominación 2652 y 2653, por lo que en los siguientes apartados se hará mención de éstas como la población 2217 y 2218, respectivamente.

La dinámica de acumulación de antocianinas se estudió colectando en cada muestreo 3 plantas representativas de cada material genético; en 2009 se realizaron cinco muestreos exploratorios a los 50, 57, 70, 77 y 84 días después de la siembra (dds). Durante el año 2010 se realizaron once muestreos correspondientes a los 30, 45, 57, 70, 77, 84, 91, 98, 108, 118 y 138 dds; en este ciclo el primer muestreo se hizo a los 30 dds para detectar el inicio de la pigmentación en los distintos órganos de la planta y se realizaron cinco muestreos más después de los 84 dds, con la finalidad de explorar con más detalle, la dinámica de acumulación de antocianinas durante la formación y desarrollo de la mazorca.

En cada uno de los muestreos las plantas colectadas fueron disecadas en fresco para tomar fotografías de la planta completa y fotografías individuales de cada órgano que conformaba a la planta. Posteriormente, mediante el análisis de las fotografías se describió en qué órganos se observó la presencia de antocianinas y cuál fue la

dirección de la pigmentación en cada órgano, para así poder definir el patrón de acumulación en toda la planta.

La información descriptiva del patrón de pigmentación que mostraron las plantas de todas las poblaciones estudiadas fue concentrada para determinar si hubo o no un patrón de pigmentación en los materiales pigmentados y si la incidencia de algún factor ambiental pudo inducir la síntesis de antocianinas en las poblaciones de la planta verde, considerando que todas las plantas tienen el potencial de sintetizar a este flavonoide.

## **2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **2.5.1. Patrón de acumulación de antocianinas en el cultivo de maíz**

El patrón de acumulación de antocianinas que se describe a continuación es el resultado del análisis fotográfico del comportamiento de las poblaciones pigmentadas (2218, 2222, 2223, 2650, 2651, 2655, 2656 y 2657) evaluadas en los ciclos Primavera-Verano 2009 y 2010, dicho comportamiento fue similar entre las poblaciones y se usó la moda como parámetro estadístico de evaluación, por lo que la información recopilada de las poblaciones fue integrada en modelos que describen el patrón de acumulación de las antocianinas en la planta de maíz, que abarca al período del ciclo fenológico del cultivo comprendido entre 30 y 138 días después de la siembra (dds) (Figuras 3, 4, 5, 6 y Figura 1 A):

- a) A 30 dds (Figura 3a) los órganos aéreos que constituían a la planta de maíz fueron el tallo, las vainas y las láminas foliares; estos dos últimos fueron los únicos órganos en los que en ese momento se detectó presencia de antocianinas.
- b) Conforme transcurrió el ciclo del cultivo, la planta continuó creciendo y desarrollándose; así, en el período comprendido entre 30 y 50 dds (Figuras 3a y 3b) se observó que la síntesis de antocianinas inició en la parte basal de la planta para continuar en sentido acrópeto (de la base hacia el ápice) pigmentando en las vainas y láminas foliares de más edad (Figuras 5a y 5b)

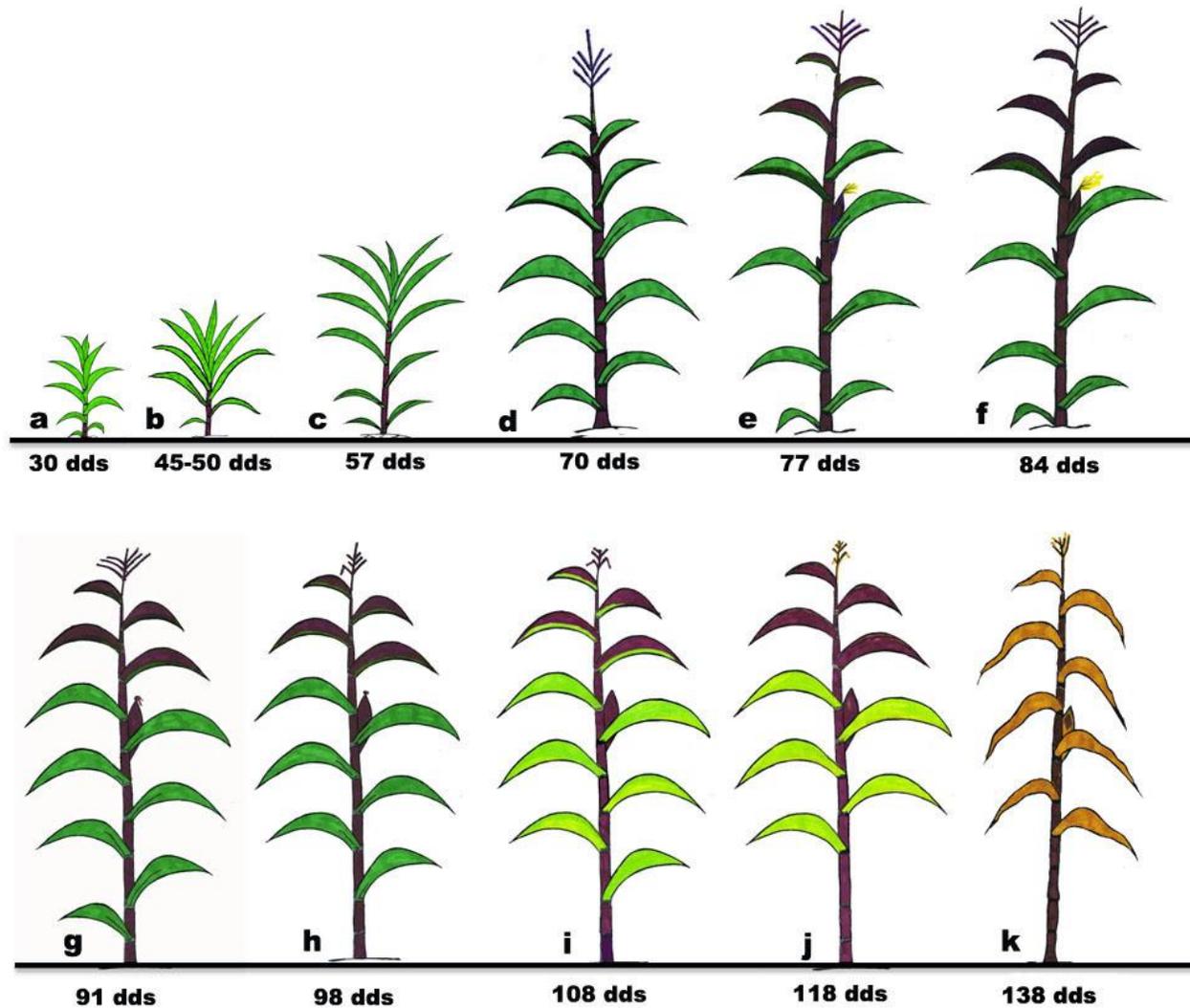
Aunque a 45 dds la espiga ya estaba completamente diferenciada en la mayoría de los genotipos (datos no mostrados), éstos aún no expresaban pigmentación.

- c) A 57 dds (Figura 4c) la pigmentación se apreciaba notablemente en los entrenudos maduros del tallo, siendo aún más avanzada; es decir, con una mayor superficie de distribución, en los entrenudos cercanos a la superficie del suelo; también en esta fecha se observaban las brácteas externas de los jilotes inferiores pero aún no estaban pigmentados, mientras que el resto de los órganos de la planta continuaban su crecimiento y acumulación de antocianinas. En el caso de la espiga (datos no mostrados), el sentido de pigmentación fue basípeto; es decir, del ápice hacia su parte basal (aunque con algunas variaciones).
- d) A 70 dds (Figura 3d), además de los órganos mencionados anteriormente, ya era posible separar las brácteas, el olote y el pedúnculo del jilote superior (que al fecundarse se convertiría en la mazorca principal). En esta etapa fenológica, el único órgano que no se encontró pigmentado fue el olote (Figura 2 A).
- e) Durante el período comprendido entre 77 y 138 dds se observó que en todos los órganos (incluido el grano a partir de 98 dds) se hallaban con acumulación de antocianinas, aunque es probable que en los últimos días de evaluación (118 a 138 dds) la síntesis de antocianinas pudo haber disminuido, o cesado en algunos de ellos e inclusive, los pigmentos pudieron haberse degradado pues la intensidad del color cambió drásticamente; sin embargo, aún a 138 dds se observó pigmentación en estos órganos (Figuras 3k y 4k).

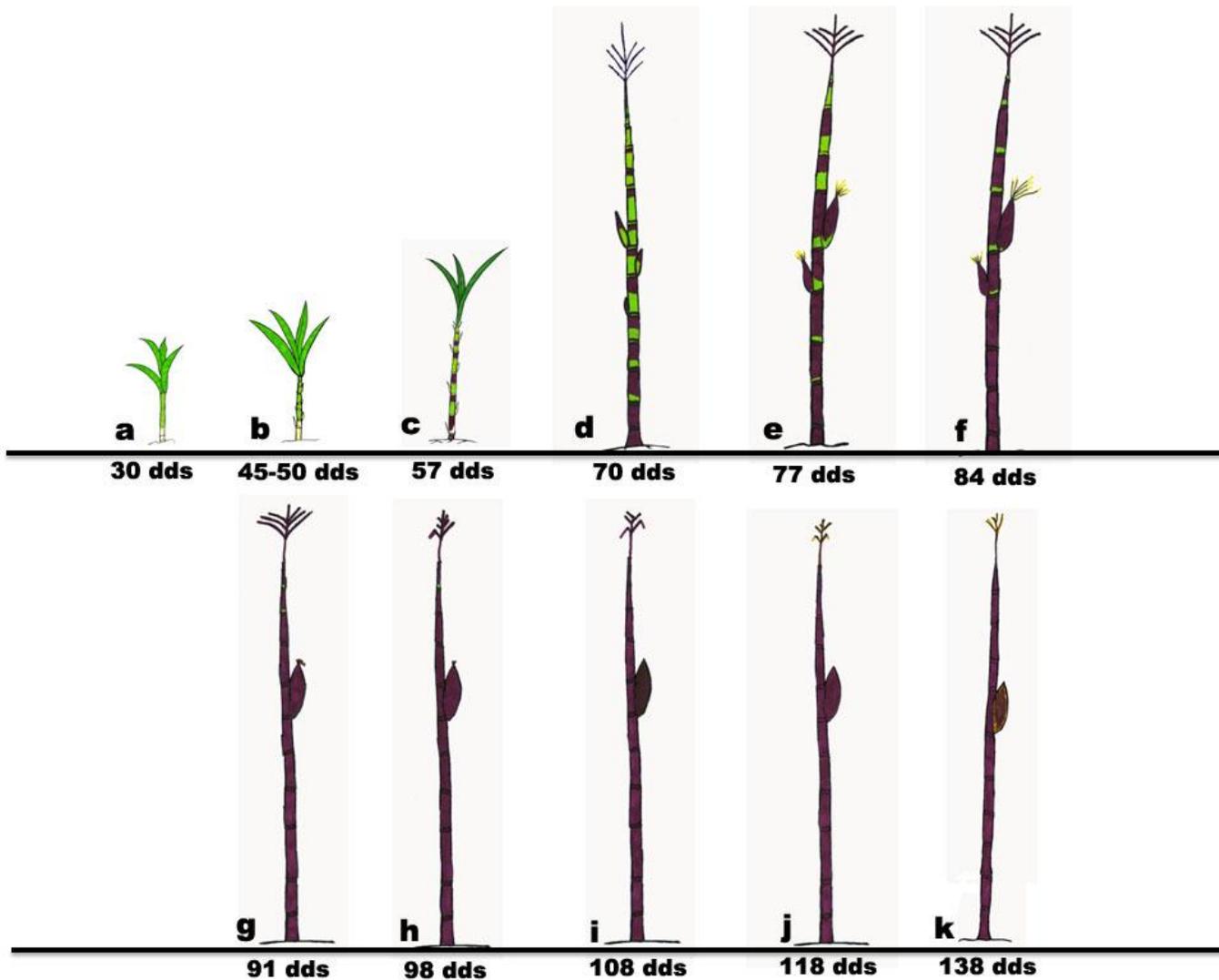
Si bien las vainas y las láminas foliares fueron los primeros órganos que comenzaron a sintetizar y acumular antocianinas a partir de 30 dds, en todas las poblaciones de maíz pigmentado estudiadas se observó que la pigmentación fue más abundante y se encontró distribuida en todos los órganos de la planta presentes hasta 77 dds; la pigmentación continuó aumentando su superficie de distribución en la planta después de esta fecha y en algunos órganos hasta el final del ciclo; es decir, hasta 138 dds aunque, como se muestra en las Figuras 3h y 3i, a 98 y 108 dds fue el momento en que

inició el deterioro de órganos como las láminas foliares y la espiga, respectivamente, y continuó hasta 118 dds para terminar con la senescencia de sus tejidos (las láminas foliares y la espiga fueron las más afectadas). En contraste, se sugiere que la acumulación de antocianinas pudo haber aumentado en el grano durante este período (revisar apartado de grano). En las Figuras 5 y 6 se observa que desde 98 dds en las espigas, 108 dds en las láminas foliares y 138 dds en las vainas foliares, brácteas y tallo, ya no fue posible revelar visualmente el sentido de la acumulación de antocianinas porque los órganos o se encontraban senescentes y deteriorados o, ya no se distinguía el avance en la pigmentación, por lo que se considera que para poder concluir si la síntesis y acumulación de antocianinas es continua, se detiene o simplemente, que el cambio ocurrido en la intensidad del pigmento se debe a procesos de degradación de las antocianinas, ocasionado por la etapa fenológica final del cultivo, es necesario llevar a cabo estudios detallados como la cuantificación bioquímica de las antocianinas totales.

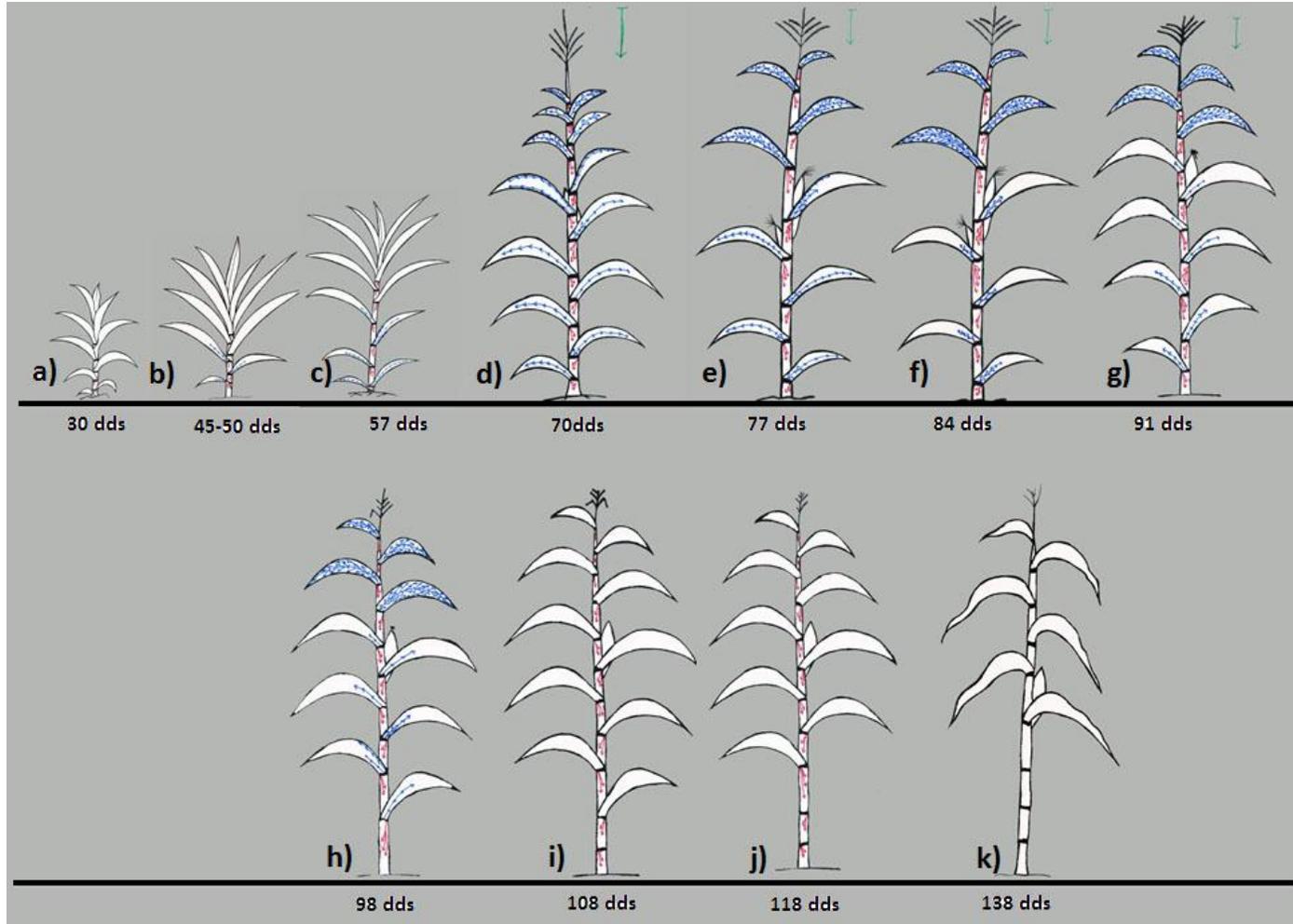
No obstante que las poblaciones evaluadas fueron seleccionadas para que expresen el pigmento en toda la planta, se observó que aunque tienen el potencial de producir antocianinas en todos los órganos, tal como lo indica Hatier y Gould (2009), el grado de pigmentación que presentaron fue variable entre sí (Figura 3 A) e inclusive, entre los órganos de la planta (Cuadro 1 A). Por ejemplo, la población 2218 (en ambos ciclos de evaluación) produjo plantas completamente pigmentadas (con excepción del grano), mientras que la población 2223, la cual fue descrita como una población de planta verde y grano pigmentado, además de que este último sí se pigmentó, también acumuló cierta cantidad de antocianinas en las vainas foliares y en el tallo, pero no lo hizo en el olote ni en las láminas foliares; por lo tanto, se puede inferir que una población que sintetiza antocianinas no necesariamente lo hace en todos los órganos de la planta, pero cuando se pigmentan todos los órganos, la superficie del órgano que se pigmenta puede ser total o puede encontrarse restringida a una área específica, debido a que estos niveles están controlados por diversos genes (específicamente por la combinación alélica en el *loci* regulatorio) que determinan el patrón de pigmentación en cualquier planta (Taylor y Briggs, 1990).



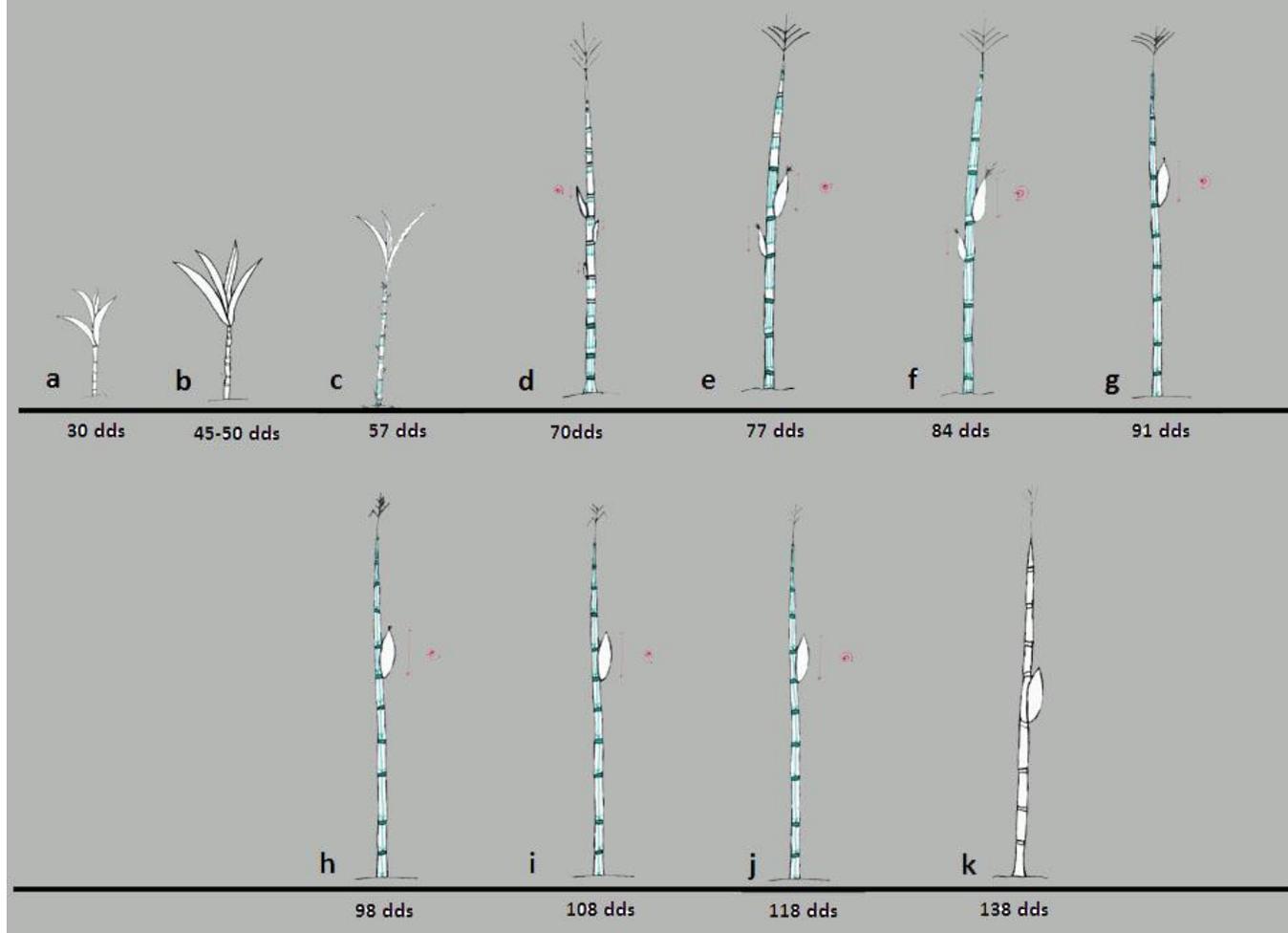
**Figura 3. Patrón de acumulación de antocianinas en los órganos de la planta de maíz a través del ciclo de cultivo, con énfasis en vainas y láminas foliares y en la espiga. La pigmentación morada muestra que hay acumulación de antocianinas. El cambio en la intensidad del color de las láminas foliares indica en a) y b) que éstas comienzan su desarrollo; en c) que se encuentran en proceso de maduración; entre d) y h) que se está expresando la mayor acumulación de antocianinas; y de i) a k) que se presenta un proceso de senescencia y pérdida de láminas. El cambio en la intensidad del color de la espiga señala en d) que hay acumulación de antocianinas; en e) hasta g) que se está expresando la mayor acumulación de antocianinas; en h) e i) sigue conservando la coloración de e) hasta h) pero la espiga comienza a deteriorarse; y de j) a k) se evidencia que ha sufrido un proceso de senescencia y deterioro.**



**Figura 4. Patrón de acumulación de antocianinas en los órganos de la planta de maíz a través del ciclo de cultivo, con énfasis en el tallo, jilotes inferiores y brácteas de la mazorca.** La pigmentación morada demuestra que hay síntesis y acumulación de antocianinas. El cambio en la intensidad del color de las brácteas indica en k) que probablemente el pigmento sufre un proceso de degradación. En g) a h) la ausencia del jilote inferior señala que ha disminuido su desarrollo o su biomasa en la planta.



**Figura 5. Sentido en el que se presenta la acumulación de antocianinas en los órganos de la planta de maíz a través del ciclo de cultivo, con énfasis en la espiga, las vainas y láminas foliares.** Las flechas rojas señalan en a) hasta j) el sentido de la acumulación de antocianinas en las vainas foliares; las flechas azules muestran en a) hasta h) el sentido de la acumulación de antocianinas en las láminas foliares; y las flechas verdes de d) hasta g) el sentido de acumulación de antocianinas en la espiga. En los incisos donde ya no aparecen las flechas, se indica que visualmente ya no fue posible determinar si hubo o no un sentido de acumulación de antocianinas en estos órganos.



**Figura 6. Sentido en el que se presenta la acumulación de antocianinas en los órganos de la planta de maíz a través del ciclo del cultivo, con énfasis en el tallo, los jilotes inferiores y las brácteas de la mazorca.** Las flechas rojas indican en d) hasta j) el sentido de la acumulación de antocianinas en los jilotes inferiores y las brácteas de la mazorca, mientras que las flechas verdes señalan de b) hasta j) el sentido de la acumulación de antocianinas en el tallo. Con una flecha circular se muestra a partir de d) hasta j) que la pigmentación de las brácteas ocurre desde las brácteas externas hacia las brácteas internas. La ausencia de flechas en a) revela que en ese momento los maíces pigmentados estudiados no sintetizaron antocianinas en estos órganos; y en h) que visualmente ya no fue posible determinar si hubo o no un sentido de acumulación de antocianinas.

Tomando como base los resultados de algunos investigadores, enfocados al estudio de los genes involucrados en la pigmentación del maíz, así como la información obtenida en este análisis de dinámica de acumulación de antocianinas en poblaciones pigmentadas de maíz, se considera que cuando un genotipo sintetiza antocianinas en un tejido vegetal, como es el caso de las ocho poblaciones pigmentadas que fueron evaluadas, contienen en su genotipo a todos o a algunos de los genes reguladores *B*, *C<sub>1</sub>*, *PL*, *R*, *VP<sub>1</sub>*, *Lc*, *Sn* (Sharma *et al.*, 2011; Cone, 2007; Hanson *et al.*, 1996; Tonelli *et al.*, 1994; Patterson *et al.*, 1991; Styles y Ceska, 1975; Styles y Ceska, 1972; Harborne y Gavazzi, 1969), y en especial a los genes pertenecientes a la familia R y B que determinan el momento (tiempo), la distribución y la cantidad de antocianinas que se sintetizan (Consonni *et al.*, 1993; Taylor y Briggs, 1990), y a la vez, también se encuentran presentes algunos genes enzimáticos o estructurales como el gen *A<sub>1</sub>* que ha sido identificado en este cultivo como formador de la enzima dihidroflavonol 4-reductasa (Halbwirth *et al.*, 2003) que es una de las enzimas que participa en la síntesis de antocianinas.

También, considerando lo señalado por Kim *et al.* (2006), quienes indican que un genotipo que pigmenta a la aleurona del grano de maíz debe contener a los genes *A<sub>1</sub>*, *A<sub>2</sub>*, *C<sub>1</sub>*, *C<sub>2</sub>* y *R*, ya que la ausencia de alguno de ellos ocasiona que la síntesis de antocianinas no pueda llevarse a cabo; se sugiere que las poblaciones pigmentadas 2656, 2657, 2222 y 2223 contienen estos genes en su genotipo, mientras que las poblaciones 2650, 2651, 2654, 2655 y 2218 carecen de uno o más de ellos o bien, que el gen *Bz<sub>2</sub>* que está involucrado en el transporte de las antocianinas hacia la vacuola (sintetiza a la enzima glutathion-S-transferasa) sufra una mutación que dé como resultado granos que no contienen antocianinas (Mol *et al.*, 1998). Sin embargo, aunque desde la década de los 20's del siglo pasado se han descrito patrones de pigmentación que son frecuentes en la planta de maíz y han sido relacionados con la información existente sobre los genes que controlan a este proceso (Wheldale, 1925; Emerson, 1921), esta descripción (que si bien aporta información relevante), resulta insuficiente para obtener un verdadero conocimiento y determinación del genotipo pigmentado en todos sus órganos, por lo que se sugiere que además de conocer el

comportamiento hereditario de los pigmentos a través de los trabajos de investigación realizados con maíces endogámicos, también se deben examinar sus propiedades y su composición química, para entender cómo es que se lleva a cabo el proceso de síntesis de antocianinas en este cultivo.

Se determinó que las vainas foliares fueron los órganos en los cuales primero se expresa la pigmentación, ya que en todas las poblaciones evaluadas (100 %) se presentó la coloración morada durante todo el período de evaluación (30-138 dds). Las láminas foliares fueron los órganos que, después de las vainas, a 30 dds iniciaron la pigmentación en 25 % de las poblaciones; a 70 dds se encontró que las cinco poblaciones con potencial de pigmentar a la hoja estaban acumulando antocianinas (Cuadro A-1). El tallo y la espiga se pigmentaron a partir de 57 dds; posteriormente, los jilotes inferiores, las brácteas del jilote superior y el pedúnculo fueron los órganos que adquirieron la pigmentación (70 dds). Se observó que en los mismos órganos y por el resto del ciclo del cultivo, la pigmentación pudo incrementar su intensidad, probablemente por la acción del gen *In*, el cual en forma recesiva produce un color más intenso (Taylor y Briggs, 1990), además, que podrían modificar su nivel de expresividad y penetrancia; asimismo se considera que pueden aumentar o disminuir la concentración de antocianinas totales, como resultado de la síntesis o la degradación de las antocianinas, respectivamente.

Finalmente, el olote y el grano fueron coloreados (77 dds y 98 dds, respectivamente), en estos órganos de la planta es en los que más se ha enfocado el mejoramiento genético y/o la presión de selección para pigmentación en maíz, debido a la necesidad de ofertar grano blanco a la industria de la masa y la tortilla que provenga de mazorcas con olote blanco, puesto que los granos obtenidos de mazorcas con olotes rosados y rojos contienen compuestos fenólicos que le confieren un color “indeseable” a los productos derivados (Pajic, 2007; Rooney *et al.*, 2004).

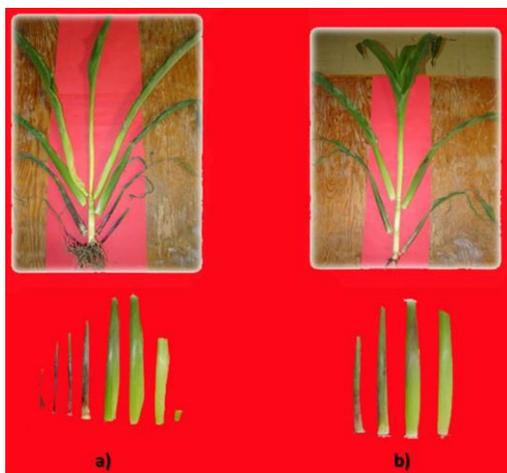
En el caso de las poblaciones de planta verde (2217 en ambos ciclos de evaluación y la población 2654) se observó que al inicio del ciclo del cultivo y durante la floración, fueron las dos únicas etapas fenológicas en las que solamente dos órganos

sintetizaron antocianinas y en muy baja cantidad; éstos fueron las vainas foliares (45 y 50 dds) y la espiga (en el intervalo de 77 y 138 dds, aunque a partir de 98 dds la espiga inició la senescencia y la pigmentación se tornó bronceada).

En ambos órganos, como se muestra en las Figuras 7 y 8, la intensidad de la pigmentación fue muy ligera o tenue, en comparación con lo que se observó en las poblaciones pigmentadas (revisar apartado de la pigmentación en la inflorescencia masculina y vainas foliares).



**Figura 7. Espigas de las poblaciones de planta verde que a 77 dds presentaron trazas de pigmentación por antocianinas. a) Población 2654 que sintetiza antocianinas en glumas, b) Población 2217 (Ciclo 2009) que sintetiza antocianinas en anteras y glumas, c) Población 2217 (Ciclo 2010) que sintetiza antocianinas en las anteras.**



**Figura 8. Vainas foliares de poblaciones de planta verde que en el período comprendido entre 45 y 50 dds presentaron trazas de pigmentación por antocianinas. a) Población 2217, b) Población 2654.**

Se considera que estas poblaciones no pigmentadas (de planta verde), lograron sintetizar antocianinas en los órganos mencionados debido a cierta exposición al estrés ambiental como exceso de sales y temperaturas bajas, o de gallina ciega que estuvo presente en estos suelos, ya que como lo mencionan Brat *et al.* (2008), la expresión de las antocianinas además de estar controlada por la información genética, también está en función de diversos estímulos ambientales.

Tomando en cuenta las referencias bibliográficas existentes sobre las funciones de las antocianinas en las plantas y considerando que su ubicación en el esporofito depende en gran medida de la función biológica que desempeñen en éste (Gould *et al.*, 2000), se sugiere que la producción de antocianinas en las vainas foliares de las poblaciones de planta verde durante el período comprendido entre 45 y 50 dds, pudo ser expresada para actuar como un mecanismo de defensa para evitar el ataque de patógenos, insectos o de herbivoría (Hawrylak, 2008) o bien, para operar como un sistema de fotoprotección al resguardar a las células fotosintéticas de los efectos adversos ocasionados por la radiación solar (Quina *et al.*, 2009), ya que tal como lo señalan Hughes *et al.* (2007) las antocianinas sirven para proteger a los tejidos hasta que otros mecanismos de fotoprotección se encuentren bien constituidos; estos investigadores monitorearon el momento de la producción de antocianinas y su degradación en tres especies no relacionadas entre sí (*Acer rubrum*, *Cercis canadiensis* y *Liquidambar styraciflua*); observaron que en las tres especies las antocianinas se produjeron durante el desarrollo de la hoja y persistieron hasta que el tejido se diferenció por completo. El posterior descenso en los niveles de antocianinas ocurrió después de que las hojas sinterizaron aproximadamente 50 % del total de clorofilas y carotenoides, que para ese entonces ya habían alcanzado cerca del máximo de las tasas de asimilación fotosintética.

En el caso de la presencia de antocianinas en la espiga se interpreta que la síntesis del pigmento en este órgano pudo deberse a que estos compuestos actúan como un sistema de protección contra la radiación ultravioleta (Ryan y Hunt, 2005), ya que el mecanismo de protección es activado por la exposición a la radiación, por la ubicación

de la espiga en la planta que conlleva a que desde su emergencia se encuentre constantemente expuesta a este factor ambiental, por lo que es posible que la síntesis de antocianinas en este órgano se lleve a cabo con la finalidad de proteger a las moléculas de ADN contenidas en los granos de polen, las cuales bajo radiaciones de 260 nm se deterioran, así, los daños podrían ser evitados y se podría llevar a cabo adecuadamente la polinización y la transferencia de la información genética.

Aunque de los nueve órganos estudiados sólo dos produjeron pigmento en las poblaciones de planta verde, se observó que el patrón y el sentido de acumulación de las antocianinas es similar al que ocurre en las poblaciones pigmentadas (en tiempo de aparición, sentido de acumulación y comportamiento del pigmento), por lo que podría pensarse que la dinámica de acumulación de antocianinas descrita anteriormente, no es exclusiva de las poblaciones pigmentadas, sino que podría explicar este proceso en el cultivo de maíz en general, en donde definitivamente se encontrarían diferencias pero éstas serían en las variables de penetrancia y expresividad del carácter de pigmentación.

Por otro lado, no se descarta el hecho de que las poblaciones de planta verde puedan contener antocianinas en sus tejidos vegetales, ya que aunque visualmente no fueron detectadas, según Oliver (2002) éstas podrían estar contenidas en el citoplasma celular en la forma química hemiacetal (incolora) o como base quinoidal (pigmentación ligeramente azul), ya que para que se presente un cambio en la coloración, el pH debe ser modificado, situación que ocurre en la vacuola celular, donde el pH varía entre 4.5 y 5.5 (Neill y Gould, 2003; Cooper, 2001). Styles y Ceska (1972) señalan que en hidrolizados de líneas de maíz portadoras de los genes *Pr*, *Bz* e *In* (las cuales fueron establecidas bajo condiciones ideales para la expresión visual de la pigmentación), se obtuvieron nueve pigmentos, en donde cianidina fue el predominante, seguido por pelargonidina, peonidina, luteolina y cinco compuestos morados desconocidos; en esta misma investigación se estudió una línea denominada "R2: Peru", la cual posee un fenotipo de planta verde a lo largo del ciclo biológico y tiene una ligera cantidad de pigmento en la espiga y en las brácteas de la mazorca madura; en dicha línea se

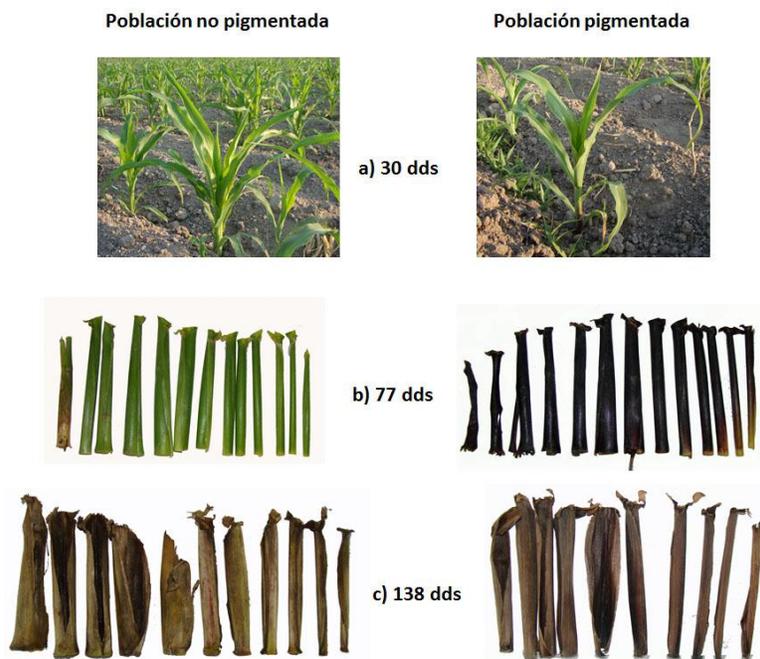
determinó que a pesar de la ausencia de pigmentación visible en la mayoría de su tejido, ésta tuvo el mismo rendimiento de luteolina que las líneas pigmentadas y además, fue el único tipo de antocianina aislada en este genotipo.

## 2.5.2. Dinámica de acumulación de antocianinas en cada órgano de la planta

### 2.5.2.1. En las vainas y láminas foliares

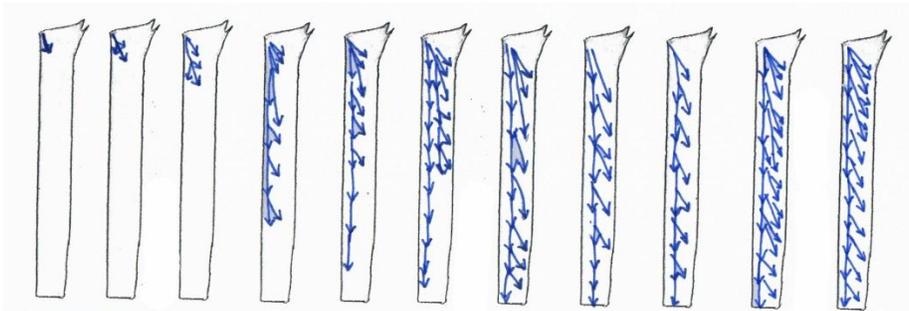
En los genotipos pigmentados estudiados, los primeros órganos que iniciaron la síntesis de antocianinas en la planta de maíz fueron las vainas y las láminas foliares, especialmente durante el inicio del ciclo del cultivo la pigmentación se observó en las vainas más desarrolladas y de más edad.

Las vainas foliares se mantuvieron pigmentadas durante todo el período de evaluación, iniciando claramente la acumulación de antocianinas a partir de 30 dds; posteriormente la pigmentación fue gradual de manera que entre 70 y 77 dds la pigmentación se había expresado plena y notoriamente en todas las vainas de la planta de las poblaciones pigmentadas (Figura 9) y fue perceptible en estas poblaciones hasta 138 dds (Figura 9c), momento en que las vainas se encontraban ya secas, porque había terminado el ciclo del cultivo.



**Figura 9. Contraste en pigmentación entre las vainas foliares de la población de planta verde (no pigmentada) y de una población pigmentada, en tres períodos distintos del ciclo del cultivo.**

La dinámica de acumulación de antocianinas en la planta ocurrió en sentido acrópeto; es decir, que primero se pigmentaron las vainas foliares ubicadas en la base de la planta y al final las vainas foliares del ápice; sin embargo, en cada vaina foliar se siguió otro patrón de síntesis de antocianinas, ya que cada una inició la pigmentación en sentido basípeto, comenzando desde la parte distal central hacia la parte basal; conforme la pigmentación fue avanzando hacia la base de la vaina también se fue distribuyendo hacia los bordes de ésta hasta cubrir completamente la superficie de la misma (Figura 10).



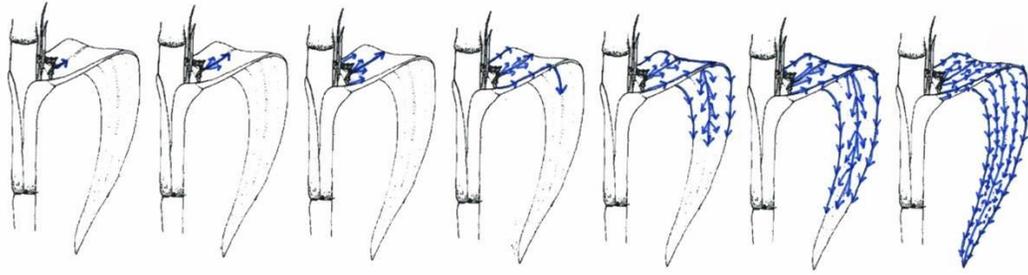
**Figura 10. Sentido de acumulación de las antocianinas en las vainas foliares.**

En las láminas foliares la pigmentación también se presentó en sentido acrópeto, de las hojas de mayor edad hacia las más jóvenes. En la Figura 11 se muestra el sentido de la pigmentación que tuvieron las láminas foliares, aunque una descripción más detallada se expone a continuación: a 30 dds se observó una ligera pigmentación en la nervadura central que inició en la parte proximal hacia la parte distal de la misma; a 45 dds la pigmentación avanzó hacia el extremo distal (el ápice) del limbo, concentrándose nuevamente en la nervadura central y en una área reducida localizada al lado de la nervadura central; a partir de 50 dds hasta 98 dds, además de incrementar la pigmentación en donde se mencionó anteriormente, también se observó la presencia de antocianinas en el borde del limbo (nuevamente, iniciando su aparición desde la base de la lámina). Entre 70 y 77 dds, se expuso y pigmentó la hoja bandera; en estos muestreos fueron claros los distintos grados de expresividad (superficie del órgano que está pigmentada) que existen en este órgano, encontrándose poblaciones con láminas foliares completamente pigmentadas (población 2218 en los dos ciclos de evaluación), incluso en ambas superficies foliares: adaxial y abaxial (hecho que pudo observarse a 84 dds), mientras que en otras poblaciones, las antocianinas sólo se concentraron en la

nervadura central (población 2656). En el período comprendido entre 77 y 98 dds se observó que la intensidad de la pigmentación fue mayor en las láminas foliares ubicadas arriba de la mazorca, períodos que coincidieron con la floración y el llenado de grano.

Tanaka y Yamaguchi (1977) explican que en la planta de maíz, durante el período de llenado de grano, las hojas que se ubican por encima de la mazorca juegan el papel más importante ya que traslocan los fotoasimilados de manera preferencial hacia los granos; por lo tanto, se considera que este hecho podría explicar el por qué las hojas superiores de la planta fueron las que más se pigmentaron, ya que al tratarse de los órganos que actúan como fuente de fotoasimilados, y considerando que debido a la incidencia de la radiación, la planta debe desarrollar un mecanismo de defensa para evitar el daño de los cloroplastos; según Eagles y Lothrop (1994) en algunas razas de maíz originarias de los Valles Altos de México, las antocianinas implementan una estrategia de protección para reducir la cantidad de radiación que llega a los cloroplastos. Pietrinni *et al.* (2002) consideran que aunque aún se desconoce a ciencia exacta el por qué se acumulan antocianinas en las hojas, en maíz puede tener como fin aumentar la protección del aparato fotosintético, ya que observaron que en líneas de maíz, las antocianinas se acumulan altamente en la superficie adaxial de la hoja; Gould *et al.* (2000) señalan que las antocianinas se encuentran localizadas en las vacuolas del tejido fotosintético, en el mesófilo de empalizada y esponjoso, aunque como lo sugieren Pietrinni *et al.* (2002) y Lee y Collins (2001), existe un mecanismo dependiente de la radiación que dirige la acumulación de antocianinas en la superficie de la hoja que se encuentra expuesta a ella, así que, cuando la superficie abaxial se expone directamente a la radiación también puede producir antocianinas.

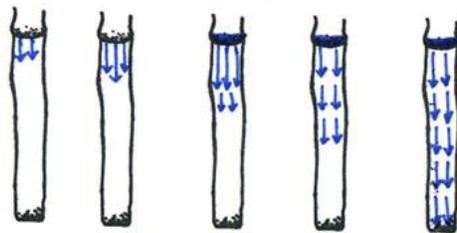
Además se observó que a 108 dds las hojas comenzaron a manifestar síntomas de senescencia; es decir, se encontraron limbos deshidratados y que tornaron de una coloración verdosa o en este caso pigmentada hacia una coloración café opaca. A 138 dds, las hojas estaban completamente muertas y secas.



**Figura 11. Sentido de acumulación de las antocianinas en las láminas foliares.**

### **2.5.2.2. En el tallo**

En el tallo, que es uno de los primeros órganos diferenciados en la planta de maíz, la presencia de antocianinas se observó por primera vez a 57 dds, la pigmentación inició en los entrenudos maduros y lignificados y avanzó hacia los más jóvenes de la planta (en sentido acrópeto). En cada entrenudo la dinámica de acumulación de antocianinas comenzó desde la parte superior del entrenudo hacia la parte proximal; es decir, en sentido basípeto (Figura 12). A partir de 70 dds los nudos comenzaron a pigmentarse, de los más cercanos a la superficie del suelo hacia la parte más alta de la planta (Figura 4d). Entre 57 y 77 dds fue evidente el avance de la pigmentación en el tallo, y a partir de 84 dds, todos los entrenudos del tallo se encontraron casi completamente pigmentados. En general, la pigmentación permaneció en las mismas condiciones (no se observó un cambio de color) hasta 138 dds, fecha en que se realizó el último muestreo, inclusive, en este muestreo el tallo aún se encontró sin daños ocasionados por las condiciones ambientales, se infiere que pudo deberse a la lignificación de la epidermis (pues el tallo del maíz es leñoso) y a su contenido de antocianinas que le sirvieron de protección contra microorganismos e insectos.

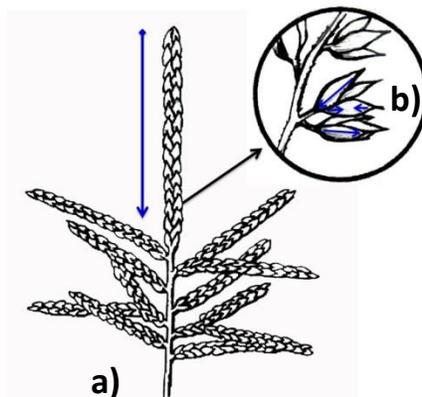


**Figura 12. Sentido de acumulación de las antocianinas en los entrenudos y nudos del tallo.**

Cabe mencionar que se observó que en el tallo las antocianinas sólo se acumularon en la epidermis lignificada, más no en su interior; sin embargo, en ocasiones al realizar un corte transversal de este órgano, pudo observarse la médula o los tejidos de conducción pigmentados, lo cual se considera que fue el resultado de la translocación del pigmento o un efecto del corte del órgano durante su manipulación.

### 2.5.2.3. En la inflorescencia masculina: espiga

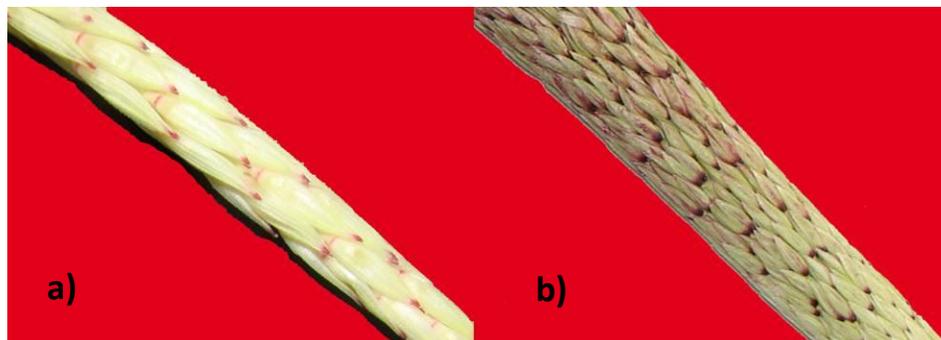
A 30 dds la espiga aún no se encontraba diferenciada en la planta de maíz; fue hasta 45 dds cuando en la mayoría de las poblaciones estudiadas pudo ser identificada; en el período comprendido entre 57 y 70 dds se observó que la espiga se fue pigmentando, siendo 70 dds el momento en el que éstas se encontraron pigmentadas en casi todas las poblaciones. Aunque hubo variaciones en la forma en la que se llevó a cabo la dinámica de acumulación de antocianinas en este órgano, se observó que principalmente la dirección en la que inició la pigmentación de la espiga fue en sentido basípeto, partiendo desde el ápice del eje principal o central (Figura 13a); por el contrario, las espiguillas que se fueron pigmentando en esta sección de la espiga, presentaron diversos patrones de pigmentación como se muestra en la Figura 13b.



**Figura 13. Sentido de acumulación de las antocianinas en a) la espiga y b) en las espiguillas. Las flechas azules indican el sentido de la acumulación.**

Por ejemplo, la población 2651 que inició la pigmentación en el eje principal o central de la espiga, pigmentó a las espiguillas simultáneamente, tanto en el ápice como en el punto de inserción de cada espiguilla (Figura 14a), mientras que la población 2218 (en

ambos ciclos de evaluación) inició la pigmentación de las espiguillas en el punto de inserción y las glumas se pigmentaron desde la base hacia la punta (sentido acrópeto) (Figura 14b).



**Figura 14. Inicio de la pigmentación en las espiguillas de maíz a) Pigmentación simultánea de el punto de inserción y el ápice de las glumas, b) Pigmentación en el punto de inserción de la espiguilla y posterior pigmentación de las glumas desde la base hacia el ápice.**

A 70 dds pudo observarse que aproximadamente 70 % de la superficie de la espiga se encontraba pigmentada, inclusive en las poblaciones de planta verde (2217 en ambos ciclos de evaluación y 2654) se observaron pequeños rastros de antocianinas en las espiguillas.

A partir de 77 dds, que es el período aproximado en el que se presentó la floración en los genotipos estudiados, la espiga se encontró completamente pigmentada, y hubo casos en los que hasta las anteras también lograron acumular antocianinas (Figura 7a); resulta interesante que hasta en esta diminuta estructura es posible que se lleve a cabo la síntesis de antocianinas, por lo que nuevamente se sugiere que éstas aparecen como un sistema de protección de los granos de polen. Siguiendo con el análisis del ciclo del cultivo, se observó que entre 77 y 91 dds, las espigas permanecieron completamente pigmentadas; sin embargo, en el siguiente muestreo (98 dds) éstas se encontraron deterioradas (espigas deshidratadas, quebradizas y con una intensidad del color disminuida). En el caso de las espigas pertenecientes a los genotipos de planta verde, se observó en el mismo muestreo que el deterioro del órgano fue más severo que en los materiales pigmentados, por lo que se considera que la presencia de antocianinas, pudo ayudar a que las espigas pigmentadas se conservaran en mejores

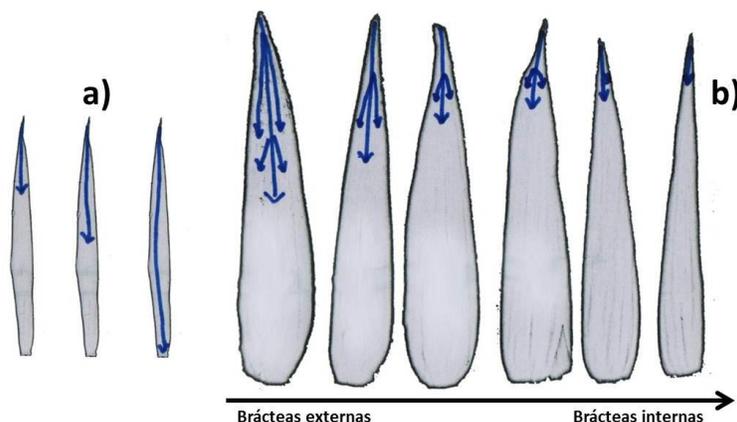
condiciones, por lo menos hasta 118 dds, ya que aunque a 108 dds comenzó a observarse la degradación del órgano, ésta fue evidente a partir de 118 dds donde la coloración morada se tornó café. Finalmente, fue difícil definir visualmente si a 138 dds aún había presencia de antocianinas o si éstas se degradaron, tanto por las condiciones ambientales como por la poca energía (fuente) enviada a este órgano, que para ese entonces ya había cumplido con su función.

#### **2.5.2.4. En la inflorescencia femenina: jilotes, brácteas, olote, pedúnculo y granos**

La inflorescencia femenina del maíz está representada en la planta por los jilotes, los cuales, en las poblaciones evaluadas comenzaron a diferenciarse en los nudos centrales del tallo a partir de 45 y 50 dds. Dichos órganos empezaron a pigmentarse a partir de 70 dds e iniciaron desde las brácteas externas de los jilotes más cercanos a la base de la planta hacia los más jóvenes (sentido acrópeto); sin embargo, al igual que en otros órganos, como se muestra en la Figura 15a, cada jilote se fue pigmentando del ápice hacia la base del mismo (sentido basípeto). Entre 77 y 84 dds, los jilotes sobresalieron de entre el tallo y la vaina foliar, siendo este período en el que los jilotes inferiores al que formaría a la mazorca se encontraron en las mejores condiciones, posteriormente, a 91-98 dds se observó una degradación gradual en la pigmentación de ellos y a partir de 108 dds fue evidente que estos órganos se fueron deteriorando, ya que desde este muestreo la pigmentación de los jilotes se tornó café, encontrándose en mal estado a los 138 dds.

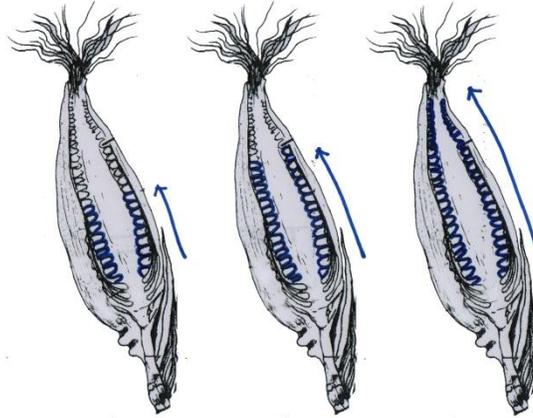
En el caso del jilote superior, a partir de 70 dds se pudo disecar y observar cuál fue la dinámica de acumulación de antocianinas en los distintos órganos que lo conformaron (brácteas, olote, pedúnculo y granos). En las brácteas la pigmentación comenzó 70 dds, la cual se concentró en el ápice de las mismas; la acumulación de antocianinas se dio en sentido basípeto y ocurrió primero en las brácteas externas hacia las internas del jilote (Figura 15b), este evento fue más claro a partir de 77 dds en la mayoría de las poblaciones, inclusive, se observó que la presencia de daños ocasionados por factores bióticos como el gusano elotero pueden desencadenar la acumulación de antocianinas alrededor del tejido afectado. A 84 dds, la pigmentación siguió avanzando en el mismo

sentido y fue siendo más evidente en las brácteas internas; inclusive, en la población 2223, caracterizada como de planta verde y grano pigmentado, en este muestreo y órgano expresó rastros del inicio de una ligera pigmentación. A partir de 91-118 dds la presencia de antocianinas en las brácteas de los genotipos pigmentados fue intensa y se conservó durante dicho período; sin embargo, a 118 dds en los genotipos de planta verde fue innegable el deterioro de estas hojas modificadas, las cuales se mostraron deshidratadas y con una coloración típica de los órganos senescentes (café paja). A 138 dds, la mayoría de las brácteas pertenecientes a los maíces pigmentados se encontraron en un estado regular, conservando la pigmentación.



**Figura 15. Sentido de acumulación de antocianinas en a) jilotes y b) brácteas de la mazorca. Las flechas azules indican el sentido de la acumulación, mientras que la flecha negra indica que inicia en las brácteas externas hasta llegar a la más interna.**

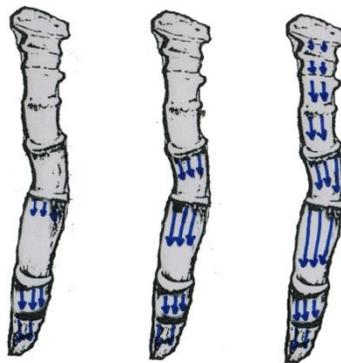
En el caso del olote la pigmentación inició entre 77 y 84 dds en la mayoría de las poblaciones evaluadas, en coincidencia con su alta tasa de crecimiento como consecuencia de la fecundación y desarrollo del grano; el sentido de la pigmentación fue desde la base del olote hacia el ápice (sentido acrópeto) y solamente se localizó en la periferia del eje de la espiga del olote (copillas y glumas), ya que la médula o el centro del mismo no acumuló el pigmento (Figura 16).



**Figura 16. Sentido de acumulación de las antocianinas en el olote.**

Desde 91 hasta 138 dds se observó que este órgano se mantuvo en buenas condiciones y conservó e incrementó la intensidad de la pigmentación.

En el pedúnculo, a partir de 77 dds se comenzó a observar pigmentación en cada porción que conformó a este órgano, inclusive, comenzó a pigmentarse desde la porción más madura ubicada en la base (en inserción con el tallo) hacia la más joven; sin embargo, cada porción se fue pigmentando desde la parte superior hacia la base (Figura 17). El pedúnculo se conservó en buen estado hasta 138 dds y se mantuvo la intensidad de la pigmentación. En cortes transversales y longitudinales, se observó que el pigmento sólo se acumuló en la epidermis del órgano.



**Figura 17. Sentido de acumulación de las antocianinas en el pedúnculo.**

Finalmente, en el grano, aunque se observó que inició su crecimiento a partir de 77 y 84 dds, con esta frecuencia de muestreo no fue posible detectar el período específico en el que inició la acumulación de antocianinas, así como tampoco pudo identificarse si

los granos ubicados en la base de la mazorca o en el ápice comenzaron a pigmentar primero; sin embargo, sí se pudo observar que cada grano comenzó a pigmentarse entre 98 y 138 dds desde su ápice ubicado en el área central del grano hacia su base; es decir, en sentido basípeto (Figura 18), principalmente en el lado opuesto al embrión, tal como lo señalan Espinosa *et al.* (2009).



**Figura 18. Sentido de acumulación de antocianinas en el grano.**

### **2.5.3. Patrones de acumulación de antocianinas en poblaciones contrastantes en pigmentación**

En este estudio se observó que los maíces pigmentados siguieron un patrón definido de acumulación de antocianinas y un determinado sentido de acumulación en cada uno de los órganos de la planta. Inclusive, se sugiere que aunque estas poblaciones han sido seleccionadas por métodos clásicos de mejoramiento genético (selección familiar y recombinación), para expresar la pigmentación, la síntesis de antocianinas en la planta de maíz no tiene como principal función el atraer polinizadores, como sugieren que ocurre generalmente en las plantas angiospermas (Ming *et al.*, 2003; Blank, 1947), pues se trata de una planta alógama que produce una gran cantidad de polen, sino que más bien, las antocianinas podrían estar desempeñando como función principal la acción de un mecanismo de protección, para evitar los daños ocasionados por la radiación ultravioleta y la fotoinhibición.

Además en las poblaciones de planta verde se observó que en determinado período del ciclo fenológico mostraron trazas de pigmentación en algunos órganos. Por ejemplo, en la población 2217, las vainas y la espiga fueron ligeramente pigmentadas (la intensidad del pigmento fue tenue y su distribución en la superficie de los órganos fue restringida a una área específica del órgano), mientras que la población 2223 logró

pigmentar además de las vainas y las espigas, también al tallo y las brácteas de los jilotes, por lo que se soporta la hipótesis de que la síntesis y la acumulación de antocianinas son fuertemente influenciadas por factores ambientales, los cuales conllevan a la activación de los genes responsables de la pigmentación (seguramente contenidos en el genoma de estas poblaciones) desencadenando la biosíntesis del pigmento; sin embargo, cabe resaltar que aunque las poblaciones lograron pigmentar ligeramente al tejido, el aspecto de la planta (solo con la resolución ocular) fue verde.

## **2.6. CONCLUSIONES**

Pese a que en diversas especies angiospermas ha sido difícil determinar cual es el patrón de síntesis y acumulación de antocianinas, en maíz pigmentado fue posible especificar que sí existe dicho patrón en la planta y en cada uno de sus órganos.

En las poblaciones de maíces pigmentados evaluadas, los órganos de la planta de maíz que iniciaron la pigmentación fueron las vainas foliares, seguidas por las láminas foliares, el tallo, la espiga, los jilotes inferiores, las brácteas del jilote superior o mazorca, el pedúnculo; los últimos órganos que sintetizaron antocianinas fueron el olote y el grano.

Los órganos de la planta de maíz pueden presentar dos sentidos de acumulación de antocianinas: basípeto en las vainas foliares, espiga, tallo, jilotes inferiores, brácteas del jilote superior o mazorca, pedúnculo y grano; y acrópeto en las láminas foliares y el olote.

Durante el ciclo del cultivo por la exposición a diversos factores ambientales la pigmentación en las láminas foliares, la espiga y los jilotes inferiores se ve afectada reduciendo su intensidad en dichos órganos, mientras que en las vainas foliares, el tallo, las brácteas del jilote superior o mazorca (especialmente las brácteas internas), el pedúnculo, olote y el grano, se observa que conservan sin drásticos cambios, la coloración que les confiere las antocianinas aún a 138 dds.

## 2.7. LITERATURA CITADA

**Andersen, M. Ø. and D. O. Øvstedal. 1988.** Anthocyanin patterns of european *Saxifraga* species. *Biochemical Systematics and Ecology* 16(6): 545-550.

**Arena, M. E., P. Postemsky, N. R. Curvetto. 2012.** Accumulation patterns of phenolic compounds during fruit growth and ripening of *Berberis buxifolia*, a native Patagonian species. *New Zeland Journal of Botany* 50(1): 15-28.

**Blank, F. 1947.** The anthocyanin pigments of plants. *Botanical Review* 13(5): 241-317.

**Bradshaw, H. D and D. W. Schemske. 2003.** Allele substitution at a flower color locus produces a pollinator shift in monkeyflowers. *Nature* 436: 176-178.

**Brat, P., F. Tourniaire, M. J. Amiot-Carlin. 2008.** Stability and Analysis of Phenolic Pigments *In: Food Colorants: Chemical and Functional Properties.* Socaciu C. (ed.). CRC Press LLC. USA. 71-83 pp.

**Bridle, P. and C.F. Timberlake 1997.** Anthocyanins as natural food colours-selected aspects. *Food Chemistry* 58(1-2): 103-109.

**Bustos, V. D., R. Riegel, D. F. Calderini. 2012.** Anthocyanin content of grains in purple wheat is affected by grain position, assimilate availability and agronomic management. *Journal of Cereal Science* 55:257-264.

**Chalker, S. L. 1999.** Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochemistry and Photobiology* 70: 1-9.

**Chalker, S. L. 2002.** Do anthocyanins function as osmoregulators in leaf tissues?. *Advances in Botanical Research* 37: 103-127.

**Champney, C. Ch. 2002.** Three regulators of the maize anthocyanin pathway. Ph. D. Thesis. Department of Biology and the Graduate School of the University of Oregon. U.S.A. 219 p.

**Clifford, F. L. S. H. T. and J. B. Harborne. 1967.** Anthocyanin composition of and distribution in the Poaceae (Gramineae). *Proceedings of the Linnean Society of London* 178 (2): 125-127.

**Cone, K. C. 2007.** Anthocyanin synthesis in maize aleurone tissue. *Plant Cell Monographs* 8:121-139.

**Consonni, G., F. Geuna, G. Gavazzi, C. Tonelli. 1993.** Molecular homology among members of the R gene family in maize. *The Plant Journal* 3(2): 335-346.

**Cooper, D. G. A. 2001.** Contributions of Jeffrey Harborne and co-workers to the study of anthocyanins. *Phytochemistry* 56:229-236.

- Eagles, H.A. and J. E. Lothrop. 1994.** Highland maize from central Mexico: its origin, characteristics, and use in breeding programs. *Crop Science* 34(1): 11-19.
- Emerson, R. A. 1921.** The genetic relations of plant colors in maize. Cornell University. Agricultural Experimental Station. 156 p.
- Espinosa, T. E., M. C. Mendoza C., F. Castillo G., J. Ortiz C., A. Delgado A., A. Carrillo S. 2009.** Acumulación de antocianinas en pericarpio y aleurona del grano y sus efectos genéticos en poblaciones criollas de maíz pigmentado. *Revista Fitotecnia Mexicana* 32 (4): 303-309.
- Ford, R. H. 2000.** Inheritance of kernel color in corn: explanations and investigations. *The American Biology Teacher* 62(3):181-188.
- Goodman, C.D., P. Casati, V. Walbot. 2004.** A multidrug resistance-associated protein involved in anthocyanin transport in *Zea mays*. *Plant Cell* 16: 1812–1826.
- Gould, K.S., K. R. Markham, R. H. Smith, J. Goris. 2000.** Functional role of anthocyanins in the leaves of *Quintilia serrata* A. Cunn. *Journal of Experimental Botany* 51: 1107–1115.
- Halbwirth, H., S. Martens, U. Wienand, G. Forkmann, K. Stich. 2003.** Biochemical formation of anthocyanins in silk tissue of *Zea mays*. *Plant Science* 164: 489-495.
- Hanson, M. A. B. S. Gaut, A. O. Stec, S. I. Fuerstenberg, M. M. Goodman, E. H. Coe, J. Doebley. 1996.** Evolution of anthocyanin biosynthesis in maize kernels: the role of regulatory and enzymatic *loci*. *Genetics* 143:1395-1407.
- Harborne, J. B. and G. Gavazzi. 1969.** Effect of Pr and pr alleles on anthocyanin biosynthesis in *Zea mays* L. *Phytochemistry* 8: 999-1001.
- Hatier, B. J. H. and K. S. Gould. 2009.** Anthocyanin function in vegetative organs. *In: Anthocyanins: Biosynthesis, Functions, and Applications.* Gould K., K. Davies, C. Winefield (eds.). Ed. Springer. New York. EUA. 1-19 pp.
- Hawrylak, N. B. 2008.** Changes in anthocyanins content as indicator of maize sensitivity to selenium. *Journal of Plant Nutrition* 31: 1232-1242.
- Honda, C., N. Kotoda, M. Wada, S. Kondo, S. Kobayashi, J. Soekima, Z. Zhang, T. Tsuda, T. Moriguchi. 2002.** Anthocyanin biosynthetic genes are coordinately expressed during red coloration in apple skin. *Plant Physiology and Biochemistry* 40:955-962.
- Hughes, N.M., C. B. Morley, W. K. Smith. 2007.** Coordination of anthocyanin decline and photosynthetic maturation in juvenile leaves of three deciduous tree species. *The New Phytologist* 175(4): 675–685.

- Hutzler, P., R. Fischbach, W. Heller, T. P. Jungblut, S. Reuber, R. Schmitz, M. Veit, G. Weissenbock, J. P. Schnitzler. 1998.** Tissue location of phenolic compounds in plants by confocal laser microscopy. *Journal of Experimental Botany* 49: 953-956.
- Irani, G. N. and E. Grotewold. 2005.** Light-induced morphological alteration in anthocyanin-accumulating vacuoles of maize cells. *BioMed Central Plant Biology* 5(7):1471-2229.
- Jiang, Y. 2000.** Role of anthocyanins, polyphenol oxidase and phenols in lychee pericarp browning. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80(3): 305-310.
- Kawamura E., H. Kazama, F. Haruka, M. Fujita. 2000.** Previously unknown distribution patterns of anthocyanin-containing cells in leaves of various angiosperm species. *American Society of Plant Biologist*. <http://abstracts.aspb.org/pb2000/public/P29/0598.html>
- Kim, J. S., B. H. Lee, S. H. Kim, K. H. Oh, K. Y. Cho. 2006.** Response to environmental and chemical signals for anthocyanin biosynthesis in non-chlorophyllus corn (*Zea mays* L.) leaf. *Journal of Plant Biology* 49(1): 16-25.
- Koes, R., W. Verweij, F. Quattrocchio. 2005.** Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends in Plant Science* 10(5): 236-242.
- Lee, D.W. and T. M. Collins. 2001.** Phylogenetic and ontogenetic influences on the distribution of anthocyanins and betacyanins in leaves of tropical plants. *International Journal of Plant Sciences* 162: 1141–1153.
- Li, J., T. M. Ou L., R. Raba, R. G. Amundson, R. L. Last. 1993.** *Arabidopsis* flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *Plant Cell* 5: 171-179.
- Markham, K. R., K. S. Gould, C. S. Winefield, K. A. Mitchell, S. J. Bloor, M. R. Boase. 2000.** Anthocyanic vacuolar inclusions- their nature and significance in flower colouration. *Phytochemistry* 55: 327-336.
- Ming, J. M., L.S. Chia, N. K. Goh, T.F. Chia, R. Brouillard. 2003.** Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 64: 923-933.
- Mol, J., E. Grotewold, R. Koes. 1998.** How genes paint flowers and seed. *Trends in Plant Science Reviews* 3(6): 212-217.
- Neill, S.O. and K. S. Gould. 2003.** Anthocyanins in leaves: light attenuators or antioxidants?. *Functional Plant Biology* 30: 865-873.
- Oliver, N. S. 2002.** The functional role of anthocyanins in leaves. Ph. D. Thesis. School of Biological Sciences. University of Auckland. 179 p.
- Pajic, Z. 2007.** Breeding of maize types with specific traits at the Maize Research Institute, Zemun Polje. *Genetika* 39:169-180.

- Patterson, G. I., L. J. Harris, V. Walbot, V. L. Chandler. 1991.** Genetic analysis of B-Peru, a regulatory gene in maize. *Genetics* 127(1): 205-220.
- Pietrinni, F., M. A. Iannelli, A. Massacci. 2002.** Anthocyanin accumulation in the illuminated surface of maize leaves enhances protection from photo-inhibitory risk at low temperature, without further limitation to photosynthesis. *Plant Cell and Environment* 25: 1251-1259.
- Poustka, F., N. G. Irani, A. Feller, Y. Lu, L. Pourcel, K. Frame, 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.
- Quina, H. F., P. F. Moreira Jr., C. Vautier G., D. Rettori, R. F. Rodrigues, A. A. Freitas, P. F. Silva, A. L. Macanita. 2009.** Photochemistry of anthocyanins and their biological role in plant tissues. *Pure Applied Chemistry* 81(9): 1687-1694.
- Reddy, G. M. 1964.** Genetic control of leucoanthocyanidin formation in maize. *Genetics* 50(3): 385-489.
- Rooney, L. W., R. D. Waniska, C. M. McDonough, S. O. Serna S. 2004.** Tortillas. *In: Encyclopedia of Grain Science.* Wrigley C., H. Corke, C. Walker (eds.). Elsevier: Oxford, UK. Vol 3. 290-298 pp.
- Ryan, K.G. and J. E. Hunt. 2005.** The effects of UV-B radiation on temperate southern hemisphere forests. *Environmental Pollution* 137: 415-427.
- Sharma, M., M. Cortes C., K. R. Ahern, M. McMullen, T. P. Brutnell, S. Chropa. 2011.** Identification of the Pr1 gene product completes the anthocyanin biosynthesis pathway of maize. *Genetics* 188:69-79.
- Styles, D. E. and O. Ceska. 1972.** Flavonoid pigments in genetic strains of maize. *Phytochemistry* 11: 3019-3021.
- Styles, D. E. and O. Ceska. 1975.** Genetic control of 3-hydroxy- and 3-deoxy- flavonoids in *Zea mays*. *Phytochemistry* 14: 413-415.
- Takahashi, A., K. Takeda, T. Ohnishi. 1991.** Light-induced anthocyanin reduces the extent of damage to DNA in UV-irradiated *Centaurea cyanus* cells in culture. *Plant Cell Physiology* 32: 541-547.
- Tanaka, A. and J. Yamaguchi. 1977.** Producción de material seca, componentes del rendimiento del grano de maíz. Traducción al español por J. Kohashi S. 1977. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México. 48 p.

**Taylor, P. L. and W. R. Briggs. 1990.** Genetic regulation and photocontrol of anthocyanin accumulation in maize seedlings. *The Plant Cell* 2:115-127.

**Tonelli, C., S. Dolfini, A. Ronchi, G. Consonni, G. Gavazzi. 1994.** Light inductibility and tissue specificity of the R gene family in maize. *Genetica* 94(2-3): 225-234.

**Wheldale, O. M. 1925.** *The Anthocyanin Pigments of Plants*. Cambridge at the University Press. 305 p.

**Woodall, G.S. and G. R. Stewart. 1998.** Do anthocyanins play a role in UV protection of the red juvenile leaves of *Syzygium*? *Journal of Experimental Botany* 49: 1447–1450.

**Woodhouse, R. M., M. Freeling, D. Lisch. 2006.** Initiation, establishment, and maintenance of heritable MuDR transposon silencing in maize are mediated by distinct factors. *PLoS Biology* 4(10): 1678-1688.

**Xin, Z. and J. Browse. 2000.** Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. *Plant, Cell and Environment* 23: 893-902.

**Yang, Z., Z. Chen, S. Yuan, W. Zhai, X. Piao, X. Piao. 2009.** Extraction and identification of anthocyanin from purple corn (*Zea mays* L.). *International Journal of Food Science and Technology* 44:2485-2492.

**Yoshitama, K., H. Nishino, H. Ozawa, M. Sakatani, Y. Okabe, N. Ishikura. 1987.** Distribution pattern of anthocyanidins and anthocyanins in polygonaceous plants. *Journal of Plant Research* 100(2): 143-149.

## CAPÍTULO III

### CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS TOTALES EN LA PLANTA DE MAÍZ Y VALORACIÓN DE SU POTENCIAL DE PRODUCCIÓN

#### 3.1. RESUMEN

Es reconocido que el maíz pigmentado tiene potencial para acumular antocianinas en todos los órganos de la planta; sin embargo, para saber si su producción es sustantiva y equivalente o superior a la de otros cultivos empleados para la extracción comercial de este flavonoide, es necesario determinar la cantidad de antocianinas que produce por unidad de superficie y por cada uno de los órganos que conforman a la planta de maíz. Con la finalidad de valorar el potencial de producción de antocianinas de las poblaciones de maíz pigmentado desarrolladas en el Programa de mejoramiento genético de maíz de Fisiotecnia Vegetal-Genética del Colegio de Postgraduados, durante el ciclo agrícola primavera-verano 2010 se evaluaron cuatro poblaciones contrastantes en pigmentación, las cuales fueron muestreadas en cuatro ocasiones durante la etapa reproductiva del cultivo, para cuantificar las antocianinas totales acumuladas en cada uno de los órganos de la planta. Se encontró que las brácteas de la mazorca y las vainas foliares fueron los órganos con mayor potencial para la acumulación del pigmento; también, se observó que las antocianinas se degradaron conforme finalizó el ciclo biológico de la planta, por lo que el periodo de cosecha más indicado para la obtención de los rendimientos máximos de antocianinas por unidad de superficie fue a 118 días después de la siembra, momento en el que se obtuvieron 48.7 kg ha<sup>-1</sup> en la población completamente pigmentada, 40.5 kg ha<sup>-1</sup> en la de planta pigmentada-grano no pigmentado y 2.0 kg ha<sup>-1</sup> en la de planta verde y grano pigmentado

**Palabras clave:** *Zea mays* L., antocianinas totales, órganos, potencial de producción de antocianinas.

### 3.2. INTRODUCCIÓN

El descubrimiento y reconocimiento de las valiosas propiedades que poseen las antocianinas para la salud humana ha incentivado que en cultivos básicos como el arroz, trigo y maíz, que son la base de la dieta alimentaria del hombre, se busque incrementar su contenido (Bustos *et al.*, 2012).

Ya que el maíz es el pilar de la dieta alimentaria de las poblaciones de países en vías de desarrollo como México, Latinoamérica y África (Dowswell *et al.*, 1996) en donde el consumo anual *per cápita* oscila entre 50 (Macías, 2000) y 145 kg (SNIIM, 2007); y considerando que existe gran variabilidad genética en este cultivo (Sánchez *et al.*, 2000) que incluye a diversas coloraciones del grano: blanco, amarillo, rojo, morado, café, azul, etc. (Espinosa *et al.*, 2006); es evidente que existe demanda y potencial suficiente para la obtención de poblaciones, variedades sintéticas e híbridos que contengan una mayor cantidad de antocianinas, no sólo en el grano sino en todos los órganos de la planta (Li *et al.*, 2008). Al respecto, Yang *et al.* (2009) señalan que el maíz morado o pigmentado es una variedad de maíz originalmente cultivada en Latinoamérica, inclusive Yang y Zhai (2010b) mencionan que los extractos de esta especie contienen una gran cantidad de antocianinas, que por su naturaleza química y comparadas con las antocianinas obtenidas de otros cultivos como la zarzamora, son más estables bajo condiciones de extracción de alta temperatura (mayores a 120 °C por tres horas) (Yang *et al.*, 2008b), por lo que es posible incluirlas en la elaboración de diferentes productos alimenticios, reduciéndose con ello las pérdidas de la concentración por efecto del procesamiento. También, diversos científicos han descrito que las antocianinas del maíz pueden ser utilizadas como colorantes o bien ser aprovechadas en la industria nutracéutica por sus propiedades como antioxidante (Cuevas *et al.*, 2008), actividad antimicrobiana y capacidad antiproliferativa de células cancerígenas (Zhao *et al.*, 2009), para el efecto antiobesidad y por conferir una reducción y control de la hiperglucemia (Yang *et al.*, 2008a).

Con la finalidad de valorar el potencial de la planta de maíz para producir antocianinas, en esta investigación se cuantificó el contenido de antocianinas totales en cada órgano

de la planta en cuatro periodos correspondientes a las fases fenológicas de la etapa reproductiva de la planta, que es cuando se presenta con mayor intensidad la acumulación del pigmento en toda la planta.

### **3.2.1. OBJETIVO GENERAL**

Valorar el potencial productivo de las poblaciones de maíz pigmentado mediante la cuantificación de las antocianinas totales acumuladas en los órganos de la planta y en diferentes fases de la etapa reproductiva.

### **3.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Determinar la cantidad de antocianinas acumuladas en los diferentes órganos de la planta de maíz por medio de la cuantificación de las de antocianinas totales.

Identificar a los órganos de la planta que tienen mayor potencial para acumular antocianinas en sus tejidos.

Establecer el periodo óptimo de cosecha de las plantas para obtener el rendimiento máximo de antocianinas.

Definir si las antocianinas se conservan hasta el final del ciclo biológico del cultivo.

### **3.2.3. HIPÓTESIS**

El maíz tiene potencial para acumular antocianinas en todos los órganos de la planta; los extractos del maíz pigmentado son ricos en este compuesto por lo que de su cultivo se alcanzan rendimientos superiores a los de otras especies importantes para la producción comercial del pigmento.

Aunque todos los órganos de la planta de maíz pueden sintetizar antocianinas, la cantidad acumulada es distinta entre ellos, y son las brácteas y las vainas foliares los órganos que producen los rendimientos superiores.

### 3.3. REVISIÓN DE LITERATURA

Después de que se identifican nuevas especies vegetales con potencial para la producción comercial de antocianinas, el siguiente paso es corroborar su potencial, para lo cual se plantea la realización de un análisis metabolómico de la fuente de pigmentos, el cual según Hye y Verpoorte (2010) contempla la preparación de la muestra, la obtención de los datos mediante métodos químicos-analíticos y su cuantificación utilizando métodos químico-métricos apropiados.

Se considera que la preparación de la muestra es un paso crítico de la metodología, pues tiene efectos importantes sobre el metabolito aislado y la exactitud de los resultados; es necesario que todas las prácticas que se involucran en el proceso se realicen con mucha precaución. Así, la preparación de la muestra implica que la colecta del material se haga rápidamente y que de inmediato se someta a congelamiento, para evitar la degradación u oxidación del metabolito de interés, o bien, que la muestra se deshidrate, ya que el agua que contienen los tejidos provee el medio perfecto para que se desarrollen reacciones enzimáticas que degradan a los metabolitos. También, en esta fase es importante considerar la etapa fenológica del cultivo, el tipo de órgano y la hora del día en que se colecta la muestra, ya que en estas situaciones la concentración del metabolito puede ser variable.

En diversos estudios en los que las sustancias de interés han sido las antocianinas, se sugiere preparar la muestra de la siguiente forma: cuando el tejido vegetal tiene alto contenido de humedad (específicamente para el análisis en frutillas) se recomienda congelarlo a -18 °C (Pliszka *et al.*, 2008); pero si la muestra es sólida, ésta se pulveriza después de haberla deshidratado en una secadora a 50 °C. Yang *et al.* (2009) estudiaron el contenido de antocianinas en granos de maíz azul y Yang *et al.* (2008a) en el olote de la mazorca de maíz pigmentado, para lo cual las muestras fueron pulverizadas, cernidas y conservadas en frascos de vidrio color ámbar a 4 °C de temperatura con menos de 12 % de humedad. Xu *et al.* (2010) extrajeron antocianinas de col roja utilizando la metodología descrita anteriormente, aunque con una modificación en la molienda de las muestras, las cuales fueron pulverizadas durante un

minuto con intervalos de 10 segundos para evitar su sobrecalentamiento, ya que como lo indican Wang y Xu (2007), el exceso de calor puede ocasionar la degradación del flavonoide.

Una vez que la muestra ha sido debidamente preparada, el siguiente paso es la extracción de los metabolitos; en este proceso es importante considerar las características del solvente, la proporción sólido-volumen del solvente y de la muestra, la duración de la extracción y el nivel de temperatura; también es deseable que la extracción no sea un proceso complejo o peligroso, que requiera el menor tiempo y que no sea costoso (Giusti y Jing, 2008).

Dado que las antocianinas son compuestos orgánicos solubles en agua y pueden ser fácilmente extraídas utilizando solventes polares (Ming *et al.*, 2003), la técnica más utilizada en este proceso ha sido la extracción con solventes, en la cual se han empleado varios compuestos orgánicos como etanol, metanol, acetona, acetonitrilo, ácido trifluoroacético, diclorometano, dicloroetano, hexano, alcohol y/o sus mezclas acuosas (Sowbhagya y Chitra, 2010; Cacace y Mazza 2003; Kähkönen *et al.*, 2001; García *et al.*, 1998). Asimismo, se ha observado que este tipo de solventes generan condiciones de pH bajos (ácidos) en los cuales las antocianinas tienden a mantenerse en un estado estable, y por lo tanto, los estudios de cuantificación y caracterización, entre otros, proveen resultados más exactos y confiables (Kong *et al.*, 2003; Macheix *et al.*, 1990).

Comúnmente la extracción de antocianinas se lleva a cabo con etanol con una pequeña cantidad de ácido clorhídrico (HCl) o ácido fórmico (CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) con el propósito de obtener el catión flavilio, mismo que en condiciones ácidas se estabiliza y previene la degradación de compuestos no acilados (Longo y Vasapollo, 2006). Kong *et al.* (2003) señalan que también es frecuente el uso de metanol, en combinación con HCl y CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, incluso Xu *et al.* (2010) indican que la extracción de este pigmento con metanol es 20 % más efectiva que con etanol y 73 % más efectiva que si se usa agua como solvente; García *et al.* (1998) apuntan que también es adecuado utilizar acetona como

solvente para la extracción de antocianinas, ya que ésta es más eficiente y reproducible que el metanol y el etanol, y evita la formación de pectinas (artefactos).

En los últimos años se han desarrollado nuevos y más sofisticados métodos de extracción (Mercadante y Bobbio, 2008); por ejemplo, la extracción enzimática que consiste en tratar al tejido previamente triturado y pulverizado con una enzima que sea capaz de romper las paredes de las células vegetales y así permitir la liberación de los pigmentos contenidos en ellas (Sowbhagya y Chitra, 2010). En uvas (*Vitis vinifera* L.), utilizando la enzima pectinasa se ha incrementado el rendimiento de antocianinas entre 10 y 30 % en comparación con los métodos de extracción tradicionales (Bakkar *et al.* 1999; Nicoloni y Mattivi, 1997); en fresas (*Fragaria* spp.), utilizando una mezcla de pectinasa y proteasa (1:1), el rendimiento se incrementó 28 % (Flores y Heatherbell, 1984). Otra enzima empleada para la extracción de antocianinas es la celulasa.

La extracción de antocianinas con dióxido de carbono a alta presión también ha dado resultados positivos en cuanto al rendimiento final del pigmento; sin embargo, aún no se reportan valores específicos de tales rendimientos ya que se siguen estudiando las condiciones en que esta técnica pueda funcionar óptimamente; no obstante Xu *et al.* (2010) señalan que el rendimiento de antocianinas se incrementa bajo condiciones de alta temperatura, alta presión y menor concentración de dióxido de carbono.

Utilizando microondas en la extracción, se ha registrado que el rendimiento de antocianinas más alto (185.1 mg 100 g<sup>-1</sup> de olote) obtenido con esta técnica ha sido alcanzado bajo las siguientes condiciones: el tiempo de extracción de 19 minutos, la proporción sólido-líquido de 1:20 e irradiación por microondas de 555 W (Yang y Zhai, 2010a).

En el caso del maíz pigmentado, Yang *et al.* (2009) realizaron la extracción de antocianinas contenidas en los granos de maíz azul utilizando 1 N de HCl al 95 % etanol (15:85, v/v) como solvente, evaluando al mismo tiempo distintas temperaturas de extracción (entre 30 y 70 °C), tiempos de extracción (desde 60 hasta 120 min) y diferentes proporciones sólido-líquido (entre 1:20 y 1:40). Los resultados indican que el

rendimiento más alto de antocianinas extraídas de los granos de maíz azul (6.02 mg g<sup>-1</sup>) fue obtenido a 70 °C, con el tiempo de extracción de 73 min, y con la proporción sólido-líquido de 1:25, en donde el factor que más afectó el rendimiento de antocianinas fue la temperatura, considerándose que la temperatura óptima de extracción fue de 50 °C. También determinaron que con dos extracciones consecutivas del pigmento es posible obtener 94.31 % del total de las antocianinas contenidas en la muestra del maíz azul. Para la extracción y determinación de antocianinas, tanto de los granos como del olote de maíz, la metodología de Yang *et al.* (2009) utiliza un tamaño de muestra equivalente a 1 g de harina. En el proceso de extracción del pigmento de los granos, la muestra se coloca en un matraz cónico de 50 ml al que se le agrega 1.5 N de HCl-95 % etanol (15:85 v/v), con diferentes proporciones de sólido-líquido (1:15-1:40). La mezcla se coloca en un baño termostático a una temperatura entre 20-70 °C por un tiempo entre 30-180 min, y es centrifugado a 4000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante es colectado y transferido a un matraz de 50 ml para la determinación del rendimiento de antocianinas.

Para la extracción y determinación de las antocianinas del olote pigmentado, la muestra también es colocada en un matraz cónico al que se le adicionan 50 ml de una mezcla de solvente/agua por 24 h a 4 °C. Los extractos de antocianinas se obtienen al filtrar el contenido del matraz cónico a través de papel Whatman No. 1 y ese extracto se almacena en condiciones de oscuridad a una temperatura de 4 °C.

Como parte final del análisis metabólico se lleva a cabo la cuantificación de antocianinas totales, la cual generalmente se calcula por el método de espectrofotometría propuesto por Francis (1989) que expresa el rendimiento en mg g<sup>-1</sup> y se calcula aplicando la siguiente ecuación:

$$AT = \frac{A_{530} \cdot FD}{98.2}$$

Donde *AT* es el contenido de antocianinas totales, *A*<sub>530</sub> es la absorbancia registrada en la muestra diluida, *FD* es el factor de dilución y el factor 98.2 es el valor de la absorción molar (coeficiente de extinción) de la cianidina-3 glucósido para el solvente ácido-etanol

y se refiere a la absorción de una mezcla de antocianinas de arándano en ácido-etanol, medidas en una celda de 1 cm a 530 nm, a una concentración equivalente a 1 % (w/v).

Otro método que frecuentemente se utiliza para determinar el contenido de antocianinas totales es el descrito por Giusti y Wrolstad (2001) basado en las diferencias de absorbancia de las antocianinas a pH = 1 y pH = 4.5. Con la siguiente ecuación se calcula la concentración de antocianinas monoméricas que se expresa en mg L<sup>-1</sup>:

$$Am = \frac{(A)(MW)(DF)(1000)}{(\epsilon)(1)}$$

Donde *Am* es el contenido de antocianinas monoméricas, *A* es la absorbancia de la muestra diluida, *MW* es el peso molecular de la antocianidina más abundante, *DF* es el factor de dilución y  $\epsilon$  es la absorción molar o coeficiente de extinción.

Abdel y Hucl (1999) proponen un método para la cuantificación de antocianinas totales en cereales, en el cual también se realizan lecturas de absorbancia con un espectrofotómetro y utilizan la siguiente fórmula de la cual el rendimiento de antocianinas se obtiene en mg kg<sup>-1</sup>.

$$AT = \left(\frac{Ab}{\epsilon}\right) \left(\frac{Ve}{1000}\right) (PM) \left(\frac{1}{Ph}\right) (10^6)$$

Donde *AT* es el contenido de antocianinas totales, *Ab* es la absorbancia del extracto,  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción de la cianidina 3-glucósido (25965 cm<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>), *Ve* es el volumen total del extracto (ml), *PM* es el peso molecular de la cianidina 3-glucósido y *Ph* es el peso total de la harina de cada muestra (g).

En el Cuadro 1 se presentan los rendimientos de antocianinas totales (AT) que se han reportado para distintas especies, en donde se observa que el contenido de AT más elevado se ha sido obtenido en *Glycine max* L. (2 g·100 g<sup>-1</sup>); en frutillas como el arándano y la zarzamora las AT varían entre 0.5 y 0.7 g·100 g<sup>-1</sup> y en los granos de

cereales desde 0.0007 hasta 0.32 g·100 g<sup>-1</sup>, asimismo puede apreciarse la gran diversidad de especies que están siendo estudiadas.

**Cuadro 1. Contenido de antocianinas totales en distintas especies vegetales.**

Fuente de extracción	Antocianinas totales (g 100 g <sup>-1</sup> )	Autor
Soya negra ( <i>Glycine max</i> L.)	2.00	Raghvendra <i>et al.</i> (2011)
Aronia spp. (Fruto)	1.48	Wu <i>et al.</i> (2006)
<i>Berberis buxifolia</i>	0.752	Arena <i>et al.</i> (2010)
Uva	0.75	Clifford (2000)
Zarzamora	0.70	Arozarena <i>et al.</i> (2002)
Col morada	0.322	Mercadante y Bobbio (2008)
Acaí	0.32	Raghvendra <i>et al.</i> (2011)
Arándano	0.23-0.5	Mercadante y Bobbio (2008)
<i>Sambucus nigra</i>	0.20-1.00	Bridle y Timberlake (1997)
Berenjena	0.086	Mercadante y Bobbio (2008)
Zarzamora	0.067-0.23	Wang y Xu (2007)
Zanahoria morada	0.005-0.174	Mercadante y Bobbio (2008)
Jaboticaba	0.0044-0.0163	Montes <i>et al.</i> (2005)
Trigo morado	0.0034-0.05	Bustos <i>et al.</i> (2012)
Papa morada	0.002-0.04	Mercadante y Bobbio (2008)
<i>Musa paradisiaca</i> (brácteas de la flor)	0.032	Pazmiño <i>et al.</i> (2001)
Uva	0.25	Bridle y Timberlake (1997)
Cereales	0.0007-0.3276	Abdel <i>et al.</i> (2006)
<i>Ribes uva crispa</i> (Fruto)	0.0007	Wu <i>et al.</i> ( 2006)

En el Cuadro 2 se concentran los resultados de investigaciones enfocadas a la cuantificación de antocianinas totales en diversos órganos de la planta de maíz, siendo el grano el más estudiado, cuyos contenidos de AT reportados son mayores en maíces criollos que en maíces mejorados (Salinas *et al.*, 2010) y pueden tener valores entre 0.0127 y 1.78 g 100 g<sup>-1</sup>.

Wang y Zeng (2009) desarrollaron un híbrido pigmentado denominado Zhuo-Zi No. 1, el cual presentan como un material con excelentes características agronómicas, que fue formado a partir de progenitores altamente endogámicos, con alta aptitud combinatoria general y específica, etc., y que hasta el momento pareciera ser el único material en el que se ha reportado la cuantificación de AT en todos los órganos que lo componen.

**Cuadro 2. Contenido de antocianinas totales en diferentes órganos de la planta de maíz.**

<b>Fuente de extracción</b>	<b>Antocianinas totales (g·100 g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Autor</b>
<b>Brácteas</b>	17.3-18.9	Li <i>et al.</i> (2008)
<b>Brácteas</b>	2.228	Wang y Zeng (2009)
<b>Espiga</b>	1.007	Wang y Zeng (2009)
<b>Vainas foliares</b>	0.869	Wang y Zeng (2009)
<b>Estigmas</b>	0.268	Wang y Zeng (2009)
<b>Grano maíces criollos</b>	0.04-0.09	Salinas <i>et al.</i> (2010)
<b>Grano maíces mejorados</b>	0.04-0.068	Salinas <i>et al.</i> (2010)
<b>Grano rosa</b>	0.0127	Zhao <i>et al.</i> (2008)
<b>Grano morado "Shaman"</b>	0.023	Abdel <i>et al.</i> (2006)
<b>Grano morado</b>	0.029	Jing y Giusti (2007)
<b>Grano morado (EUA)</b>	0.0307	Pozo <i>et al.</i> (2006)
<b>Grano morado (México)</b>	0.054	Salinas <i>et al.</i> (2005)
<b>Grano morado (Chino)</b>	0.0558	Yang y Zhai (2009)
<b>Grano morado (México)</b>	0.072	Pozo <i>et al.</i> (2006)
<b>Grano morado</b>	0.106	Wang y Zeng (2009)
<b>Grano morado (México)</b>	0.115	Salinas <i>et al.</i> (2005)
<b>Grano rojo</b>	0.0057-0.1269	Espinosa <i>et al.</i> (2009)
<b>Grano azul</b>	0.0154-0.03717	Espinosa <i>et al.</i> , (2009)
<b>Grano morado (Canadá)</b>	0.127	Pozo <i>et al.</i> (2006)
<b>Grano rojo carmesí</b>	0.1493	Zhao <i>et al.</i> (2008)
<b>Grano morado intenso</b>	0.256	Zhao <i>et al.</i> (2008)
<b>Grano negro</b>	0.34	Zhao <i>et al.</i> (2008)
<b>Grano morado</b>	0.584-1.33	Jing y Giusti (2007)
<b>Grano morado</b>	1.642	Cevallos y Cisneros (2003)
<b>Grano morado</b>	1.78	Li <i>et al.</i> (2008)
<b>Olote</b>	0.068	Yang <i>et al.</i> (2008a)
<b>Olote (Chino)</b>	0.0923	Yang y Zhai (2009)
<b>Olote</b>	0.185	Yang y Zhai (2010a)
<b>Olote</b>	0.59	Yang <i>et al.</i> (2009)
<b>Olote</b>	0.728	Wang y Zeng (2009)
<b>Tallo y hoja bandera</b>	0.023	Wang y Zeng (2009)

### **3.4. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.4.1. Material genético y sitio experimental**

Durante el ciclo agrícola Primavera-Verano de 2010, se evaluaron cuatro poblaciones de maíz contrastantes en pigmentación: planta completamente pigmentada (PP-GP), planta pigmentada en todos sus órganos, excepto en el grano (PP-GnP), planta verde con grano pigmentado (PV-GP) y planta completamente verde (PV-GnP), las cuales fueron obtenidas a partir de maíces nativos de México en el programa de mejoramiento genético de maíz de Fisiotecnia Vegetal-Genética, del Colegio de Postgraduados. La finalidad del ensayo consistió en valorar el potencial productivo de antocianinas de dichas poblaciones por medio de la cuantificación de antocianinas totales acumuladas en cada uno de los órganos de la planta en diferentes momentos de la etapa reproductiva del cultivo. La población PV-GnP únicamente fue utilizada como testigo de planta sin antocianinas.

El experimento se estableció en el Campo Agrícola Experimental Montecillo, del Colegio de Postgraduados en el municipio de Texcoco, Edo. de México, ubicado a 19° 29' latitud norte y 98° 53' longitud oeste, con una altitud de 2250 msnm, con temperatura y precipitación media anual de 15 °C y 645 mm, respectivamente (García, 1988).

El cultivo se desarrolló bajo condiciones de riego con una densidad de siembra de 65000 plantas ha<sup>-1</sup>; el manejo consistió en una dosis de fertilización de 80-60-00, administrando todo el fósforo y la mitad del nitrógeno a la siembra y el resto durante el segundo aporque y el control de maleza se realizó con base en las recomendaciones de la región.

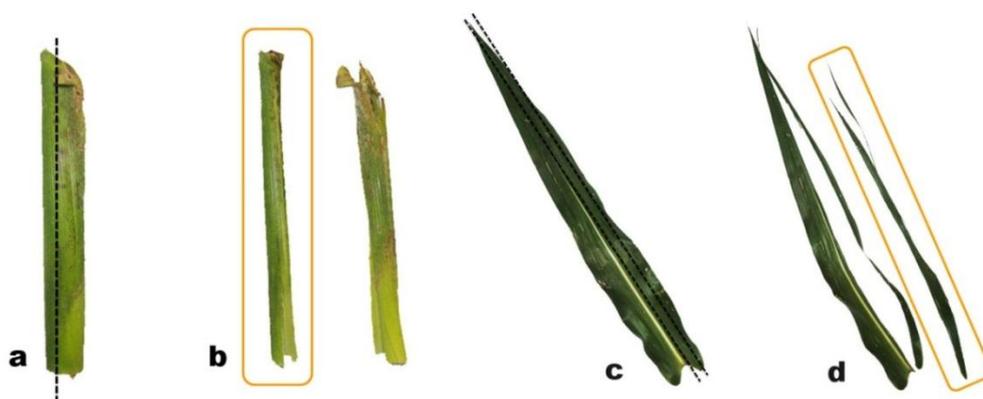
Durante la etapa reproductiva final de la planta; es decir, durante el llenado de grano, se realizaron cuatro muestreos a 98, 108, 118 y 138 días después de la siembra (dds), en los cuales se colectaron 3 plantas representativas de cada población y se disecaron en fresco en cada uno de sus órganos (tallo, láminas foliares, vainas foliares, brácteas

de la mazorca, pedúnculo, olote, jilotes inferiores, espiga y grano) con el fin de tomar una muestra representativa de cada órgano y realizar a partir de éstos la determinación del contenido de antocianinas totales.

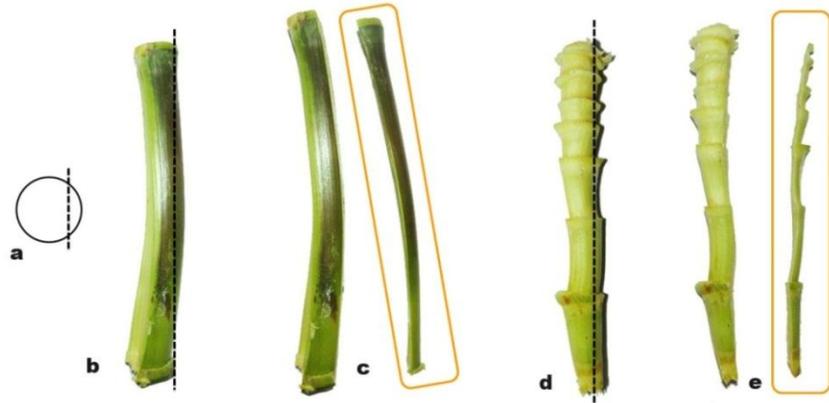
En el caso de las vainas foliares la muestra de tejido se obtuvo haciendo un corte longitudinal desde la parte distal central hacia la base (Figura 19a) conservando la porción central de tejido (Figura 19b), mientras que en las láminas foliares primero se hizo un corte longitudinal al lado de la nervadura central y posteriormente a esta porción de la lámina se le eliminó el tejido más próximo al borde de la hoja y a la nervadura central para obtener una tira longitudinal del tejido.

En el tallo y en el pedúnculo la muestra se obtuvo al hacer un corte tangencial como se señala en la Figura 20a, mientras que en la espiga, los jilotes inferiores, las brácteas de la mazorca y el olote, la muestra se consiguió al hacer un corte longitudinal en la parte central del órgano (Figura 21).

Finalmente, dado que la pigmentación en el grano no se presentó con un patrón uniforme; es decir, que hubo variación entre las plantas de una población debida a su constitución genética, entre muestreos e inclusive dentro de una sola mazorca, se decidió tomar en cada muestreo entre 10 y 15 granos que tuvieran la misma tonalidad para así realizar la determinación del contenido de antocianinas.



**Figura 19.** Obtención de muestras de vainas y láminas foliares de maíz para la cuantificación de antocianinas totales. Las líneas punteadas indican el sitio donde se realizó el corte y el recuadro anaranjado el tejido colectado para análisis bioquímico. a) y b) vaina foliar; c) y d) lámina foliar.



**Figura 20. Obtención de muestras del tallo y pedúnculo de maíz para la cuantificación de antocianinas totales. Las líneas punteadas indican el sitio donde se realizó el corte y el recuadro anaranjado el tejido colectado para análisis bioquímico. a) corte tangencial; b) y c) entrenudo del tallo; d) y e) pedúnculo.**



**Figura 21. Obtención de muestras de la espiga, jilotes inferiores, brácteas de la mazorca. Las líneas punteadas indican el sitio donde se realizó el corte y el recuadro anaranjado la muestra de tejido colectada para análisis bioquímico. a) y b) espiga; c) y d) jilote inferior; e) y f) brácteas; g) y h) olote.**

### 3.4.2. Preparación de la muestra

Las muestras de tejido (MT) de los nueve órganos y el resto de la biomasa de cada órgano de la planta (BP) fueron colocadas por separado en bolsas de papel previamente perforadas e identificadas, con la información referente al genotipo, muestreo, órgano y planta, con el fin de deshidratarlas en una estufa de secado Riossa<sup>®</sup> HCSD-82 a 50 °C durante 72 h. Posteriormente, tanto las MT como la BP fueron pesadas en una báscula Tecnicor<sup>®</sup> PEN-300-PC (centésimas de aproximación) para que al sumar ambos valores de peso seco se pudiera obtener la biomasa total de cada órgano y de la planta completa en g.

Las MT de cada órgano (tallo, láminas foliares, vainas foliares, brácteas de la mazorca, pedúnculo, olote, jilotes inferiores, espiga y grano) se redujeron en tamaño al triturarlas en un mortero, al cual se le agregó nitrógeno líquido en cantidad variable (dependiendo de la dureza del órgano; por ejemplo, en los granos se utilizaron 5 ml mientras que para reducir el tamaño del olote se utilizaron 20 ml, aproximadamente) con el fin de congelarlas y facilitar su fragmentación o bien, los órganos se cortaron en trozos pequeños con tijeras, como en las láminas y vainas foliares. Después de obtener un tamaño de partícula que pudiera introducirse fácilmente en la entrada del molino, cada MT se pulverizó utilizando un molino eléctrico UDY<sup>®</sup> Cycle Sample Mill Modelo 3010-014 (10 000 rpm) para obtener un tamaño de partícula de 5 mm. Debido a que el molino genera un flujo de aire durante el proceso de pulverización, no fue necesario realizar la molienda considerando intervalos de tiempo, como lo sugieren Xu *et al.* (2010), pues con este mecanismo se evitó el sobrecalentamiento de las aspas y la posible degradación de las antocianinas por el incremento de la temperatura; sin embargo, fue necesario que después de la molienda de cada muestra se limpiara cuidadosamente el molino, los contenedores de muestras y el filtro de aire utilizando pinceles, un cepillo giratorio Pigeon<sup>®</sup> y una corriente de aire generada por una secadora Conair<sup>®</sup> 1400.

Cada muestra pulverizada fue trasvasada a un frasco de vidrio transparente, el cual fue sellado tanto con Parafilm<sup>®</sup> como con la tapa del contenedor; además, por el exterior se

le cubrió con papel aluminio para evitar la exposición a la luz y finalmente se almacenó a 4 °C.

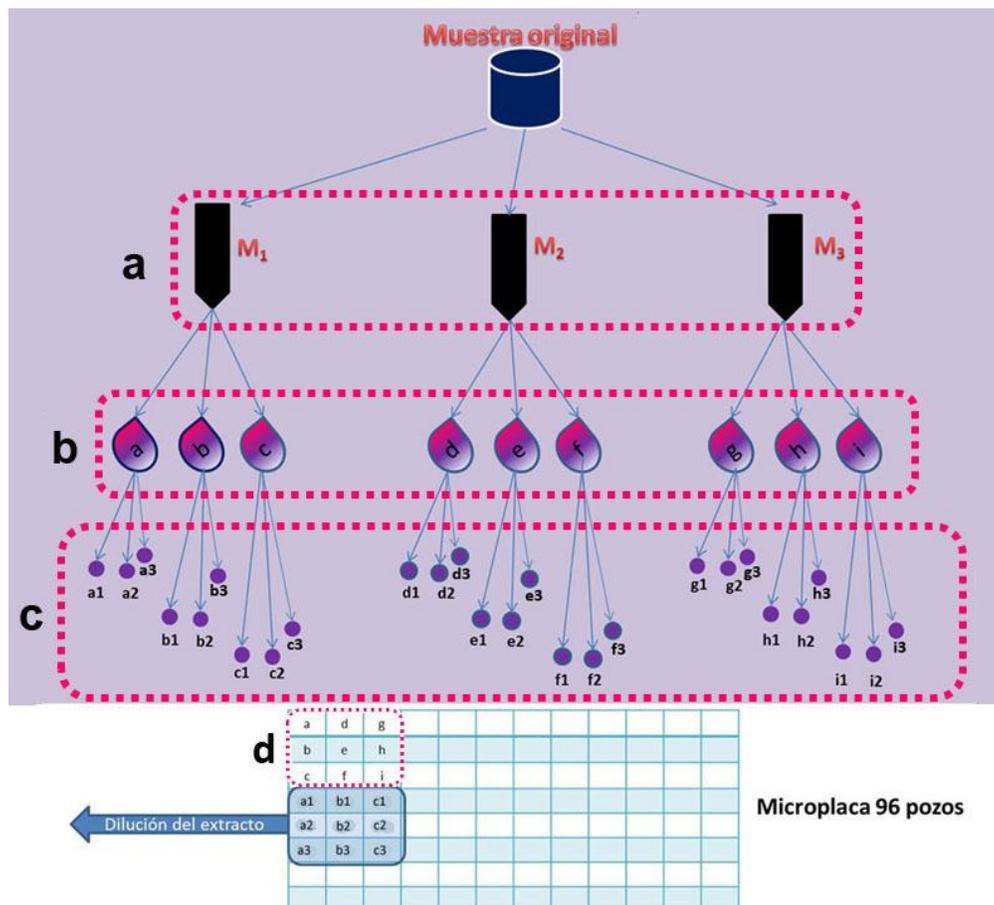
### **3.4.3. Extracción y cuantificación de antocianinas totales**

La extracción y cuantificación de antocianinas totales (AT) de los órganos de la planta de maíz se realizó en el Laboratorio de Fitoquímica del Programa de Botánica, en el Campus Montecillo, del Colegio de Postgraduados, ubicado en Montecillo, Texcoco, estado de México.

Las antocianinas fueron extraídas por ultrasonido de la siguiente manera: las muestras previamente pulverizadas y almacenadas en condiciones de oscuridad a 4° C, fueron mezcladas homogéneamente con una espátula para obtener 20 mg (de los granos) o 25 mg (en el resto de los órganos evaluados), los cuales fueron pesados en una báscula analítica Mettler® HK 160 y colocados en tubos Corning® de 15 ml; por cada muestra ( $\pm$  432 muestras) se obtuvieron tres repeticiones (Figura 22a). Posteriormente, a cada tubo se le agregó etanol a 96 % y 1.5 N de ácido clorhídrico (85:15 v/v) utilizando las proporciones sólido-líquido de 1:20 cuando la muestra fue equivalente a 20 mg (0.5 ml) y de 1:25 cuando fue de 25 mg (0.625 ml); inmediatamente los tubos fueron colocados en un baño de ultrasonido Ultrasonic cleaner Branson® B-220 durante 15 min, y a continuación, fueron colocados en una centrifuga 5804 Eppendorf® a 5000 rpm durante 15 min; después, el sobrenadante fue colectado en tubos de ensaye; enseguida se repitió el proceso para llevar a cabo una segunda extracción; es decir, se siguieron los mismos pasos desde que se agregó el solvente hasta la colecta del sobrenadante, el cual finalmente fue concentrado junto con el obtenido durante la primera extracción (el volumen de extracción final fue 1.25 y 1.0 ml en la proporción 1:25 y 1:20, respectivamente).

La determinación del contenido de antocianinas totales en los órganos de la planta de maíz se llevó a cabo utilizando un espectrofotómetro Thermo Scientific® Multiskan Spectrum en el cual se realizaron las lecturas de absorbancia de los extractos a 535 nm de longitud de onda. El procedimiento consistió en tomar con una micropipeta Research Eppendorf®, una alícuota de 0.1 ml (100  $\mu$ l) del extracto y depositarla en

microplacas Costar<sup>®</sup> de 96 pozos; de cada extracto se colocaron tres repeticiones en la microplaca; y para una muestra en la que no fue necesario diluir, se obtuvieron 9 lecturas de absorbancia (Figura 22d); sin embargo, hubo casos en donde la pigmentación del extracto fue tan intensa que los valores de absorbancia obtenidos fueron superiores a 1.2 (el cual es el valor máximo al que se considera que se pueden obtener resultados confiables), por lo que en consecuencia, se tuvo que diluir el extracto inicial; o sea, el concentrado de las dos extracciones (Figura 22b), del cual se tomó una alícuota de 0.1 ml y se llevó a un volumen final de 10 ml o 25 ml en un matraz aforado; así, de una muestra original se hicieron 9 diluciones y de cada una se colocaron tres repeticiones de 100 µl en la microplaca; para estos casos se tuvieron en total 27 repeticiones de una sola muestra (Figura 22c).



**Figura 22. Proceso de extracción y cuantificación de antocianinas totales. a) Obtención de las submuestras (repeticiones, 20 o 25 mg); b) Concentrado de la doble extracción; c) Dilución del extracto y d) Lectura de absorbancia.**

La cuantificación de antocianinas totales se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$AT = \frac{A \cdot V_{ext} \cdot PM \cdot FD}{\epsilon \cdot Pmu}$$

Donde  $AT$  es el contenido de antocianinas totales en  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ,  $A$  es la absorbancia del extracto leído a 535 nm de longitud de onda,  $V_{ext}$  es el volumen de extracción en ml,  $PM$  es el peso molecular de la cianidina 3-glucósido ( $449.2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ),  $FD$  es el factor de dilución,  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar de la cianidina 3-glucósido ( $26900 \text{ L}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) y  $Pmu$  es el peso de la muestra en g.

Una vez que se determinó la cantidad de  $AT$ , los resultados fueron transformados en g de antocianinas $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$  de biomasa.

#### **3.4.4. Valoración del potencial de producción de antocianinas de los distintos órganos de la planta de maíz**

El potencial de producción de antocianinas de cada órgano fue valorado mediante la variable  $AT\cdot\text{órgano}^{-1}$ , calculada con la ecuación:

$$AT \cdot \text{órgano}^{-1} = \frac{(AT)(B)}{100}$$

Donde  $AT\cdot\text{órgano}^{-1}$  es la cantidad de antocianinas totales que se acumula en cada órgano (en  $\text{g}\cdot\text{órgano}^{-1}$ ),  $AT$  es el contenido de antocianinas totales ( $\text{g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ) y  $B$  es la biomasa del órgano (g).

Ya que se obtuvo el valor de  $AT\cdot\text{órgano}^{-1}$ , los resultados se transformaron en  $\text{mg}\cdot\text{planta}^{-1}$ , y a partir de éstos se estimó el rendimiento por unidad de superficie en  $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  considerando además la densidad de plantas establecidas durante el ciclo de cultivo en 2010.

### **3.4.5. Análisis estadístico**

El análisis de los datos se hizo con el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System) para Windows versión 9.0, realizando el análisis de varianza con el diseño Completamente al Azar con tres factores (poblaciones, órganos de la planta y muestreos), así como la comparación de medias entre las interacciones de los factores con la prueba de Tukey  $\alpha=0.05$ .

## **3.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

La determinación del contenido de antocianinas totales en las poblaciones de maíz contrastantes en pigmentación se hizo para valorar el potencial del maíz pigmentado como fuente de colorantes naturales o de compuestos nutraceuticos, también para conocer la dinámica de acumulación de antocianinas durante distintos periodos del ciclo reproductivo del cultivo, identificar la cantidad de pigmento que acumulan los órganos de la planta, saber cuáles de esos órganos son los que generan los rendimientos superiores de antocianinas totales (a nivel de planta) y estimar los rendimientos de antocianinas por unidad de superficie alcanzados por las poblaciones evaluadas.

### **3.5.1. Análisis de varianza del contenido de antocianinas totales**

En el Cuadro 3 se presentan los cuadrados medios del análisis de varianza (ANAVA) en el que se muestra que hubo diferencias estadísticas altamente significativas ( $\alpha=0.01$ ) entre las poblaciones (P), entre los órganos de la planta de maíz (O) y entre los muestreos (M), también en las interacciones (PxO), (PxM), (OxM) y (PxOxM), se encontraron diferencias altamente significativas para las variables antocianinas totales (AT) y antocianinas totales por órgano ( $AT * \text{órgano}^{-1}$ ).

Los coeficientes de variación tuvieron valores altos (45 y 78 %) en ambas variables, lo que se debió a que las poblaciones evaluadas presentaron comportamientos contrastantes en la pigmentación, ya que se probaron poblaciones de planta morada y

planta verde, las cuales dieron origen a la amplia variación de resultados del contenido de antocianinas totales en las poblaciones y los órganos.

**Cuadro 3. Valores de cuadrados medios del análisis de varianza para el contenido de antocianinas totales en poblaciones de maíz contrastantes en pigmentación durante la etapa reproductiva del cultivo. Montecillo, México. 2010.**

F. V.	GL	AT	AT * órgano <sup>-1</sup>
Poblaciones	3	111.349**	2.5966**
Órganos	8	33.973**	2.1514**
Muestreos	3	13.182**	0.3647**
Poblaciones x Órganos	24	0.762**	0.2202**
Poblaciones x Muestreos	9	1.981**	0.0715**
Órganos x Muestreos	24	1.307**	0.1170**
Poblaciones x Órganos x Muestreos	70	0.784**	0.0497**
Error	5459	0.0263	0.0017
C. V. (%)		45.0	78.0

**F.V.** = Factor de variación; **GL** = Grados de libertad; **AT** = Antocianinas totales; **AT\*órgano<sup>-1</sup>** = Antocianinas totales por órgano de la planta; **C. V.** = Coeficiente de variación; \*\*= Altamente significativo ( $\alpha= 0.01$ ).

Dado que las interacciones entre los factores evaluados fueron significativas (poblaciones, órganos de la planta y muestreos), se presenta el análisis de dichas interacciones (PxO), (PxM), (OxM) y (PxOxM); no obstante, cabe mencionar que el factor poblaciones reveló que aquéllas de planta pigmentada, con y sin grano pigmentado, tuvieron los valores promedio de antocianinas totales más altos (AT=0.53 y 0.52 g·100 g<sup>-1</sup>, AT\*órgano<sup>-1</sup>= 0.092 y 0.064 g), mientras que el factor órganos de la planta, mostró que los más sobresalientes fueron las brácteas de la mazorca y las vainas foliares, y en el factor muestreos, los importantes para la obtención de antocianinas fueron 108 y 118 dds.

### 3.5.2. Concentración de antocianinas totales

#### 3.5.2.1. En los órganos de la planta en poblaciones de maíz contrastantes en pigmentación (Poblaciones x Órganos de la planta)

Durante el ciclo agrícola en el que fueron establecidas las poblaciones de maíz contrastantes en pigmentación, se observó que tal como lo señalan Bridle y Timberlake (1997) todos los órganos de las plantas pigmentadas fueron capaces de acumular antocianinas. Asimismo fue evidente que en todos estos órganos la presencia de antocianinas causó la coloración morada; sin embargo, solamente a través del análisis metabolómico de sus tejidos y específicamente por medio de la cuantificación de las antocianinas totales (AT) se determinó el potencial que cada órgano posee para almacenar a este pigmento.

Con un nivel de significancia de 5 %, la interacción Poblaciones x Órganos de la planta, indicó que la concentración de antocianinas fue variable en los órganos de las poblaciones evaluadas. Como se muestra en el Cuadro 4, las poblaciones con planta pigmentada-grano pigmentado (PP-GP) y planta pigmentada-grano no pigmentado (PP-GnP) fueron las que sobresalieron por los valores promedio de antocianinas totales, los cuales oscilaron entre 0.014 y 0.925 g·100 g<sup>-1</sup> en el grano (PP-GP) y en las brácteas de la mazorca (PP-GnP), respectivamente, mientras que las poblaciones de planta verde-grano pigmentado (PV-GP) y planta verde-grano no pigmentado (PV-GnP) fueron estadísticamente iguales (0.005 y 0.026 g·100 g<sup>-1</sup>), aun cuando se esperaba que por las antocianinas contenidas en el grano la población PV-GP fuera superior a la población Pv-GnP.

En concomitancia con Li *et al.* (2008) quienes reportaron que los niveles de antocianinas varían entre las partes de la planta, en el presente estudio se evidencia que la concentración de AT entre los órganos de la planta de maíz pigmentado fue estadísticamente diferente; las brácteas de la mazorca (0.821 a 0.925 g·100g<sup>-1</sup>) y las vainas foliares (0.760 a 0.878 g·100g<sup>-1</sup>) fueron los órganos que acumularon más antocianinas, mientras que los rendimientos obtenidos en los jilotes inferiores, olote y

espiga variaron entre 0.461-0.594 g·100g<sup>-1</sup>; los valores inferiores de AT se obtuvieron en el pedúnculo y las láminas foliares que estadísticamente fueron diferentes pero superiores a los del tallo y del grano (Cuadro 4).

**Cuadro 4. Valores promedio del contenido de antocianinas totales en la interacción Poblaciones x Órganos de la planta. Montecillo, México. 2010.**

AT (g·100 <sup>-1</sup> )									
Población	T	LF	VF	E	J	B	O	P	G
PP-GP	0.022 <sup>j</sup>	0.203 <sup>i</sup>	0.760 <sup>d</sup>	0.494 <sup>gh</sup>	0.594 <sup>e</sup>	0.821 <sup>c</sup>	0.496 <sup>gh</sup>	0.202 <sup>i</sup>	0.014 <sup>j</sup>
PP-GnP	0.028 <sup>j</sup>	0.174 <sup>i</sup>	0.878 <sup>b</sup>	0.461 <sup>h</sup>	0.531 <sup>fg</sup>	0.925 <sup>a</sup>	0.567 <sup>ef</sup>	0.191 <sup>i</sup>	0.005 <sup>j</sup>
PV-GP	0.006 <sup>j</sup>	0.026 <sup>j</sup>	0.010 <sup>j</sup>	0.008 <sup>j</sup>	0.010 <sup>j</sup>	0.010 <sup>j</sup>	0.006 <sup>j</sup>	0.006 <sup>j</sup>	0.011 <sup>j</sup>
PV-GnP	0.007 <sup>j</sup>	0.019 <sup>j</sup>	0.010 <sup>j</sup>	0.010 <sup>j</sup>	0.009 <sup>j</sup>	0.006 <sup>j</sup>	0.006 <sup>j</sup>	0.007 <sup>j</sup>	0.005 <sup>j</sup>
DMS	0.04041								

Los valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Prueba de Tukey  $\alpha$ : 0.05); **PP-GP** = Planta pigmentada-grano pigmentado; **PP-GnP** = Planta pigmentada-grano no pigmentado; **PV-GP** = Planta verde-grano pigmentado; **PV-GnP** = Planta verde-grano no pigmentado; **AT** = Concentración de antocianinas totales en g·100 g<sup>-1</sup>; **T** = Tallo; **LF** = Láminas foliares; **VF** = Vainas foliares; **E** = Espiga; **J** = Jilotes inferiores; **B** = Brácteas de la mazorca; **O** = Olote; **P** = Pedúnculo; **G** = Grano. **DMS** = Diferencia mínima significativa.

Las AT que presentaron las poblaciones PP-GP y PP-GnP tuvieron concentraciones similares a las reportadas por Wang y Zeng (2009) para el híbrido pigmentado Zhuo-Zi No. 1 en vainas foliares, láminas foliares y tallo (0.869, 0.023, 0.023, respectivamente), inclusive, en vainas foliares y tallo las poblaciones en estudio tuvieron concentraciones superiores por 0.009 y 0.005 g·100g<sup>-1</sup> a las del híbrido de Wang y Zeng; en el olote se obtuvieron valores entre 22 y 32 % menores al máximo (0.728 g·100g<sup>-1</sup>) reportado por los mismos autores y entre 86 y 88 % más que el valor más bajo (0.068 g·100g<sup>-1</sup>) descrito por Yang *et al.* (2008a); las brácteas de la mazorca tuvieron de 37 a 41.5 %, y la espiga cerca de 50 % del total acumulado en los órganos del híbrido Zhuo-Zi No. 1 (2.228 y 1.007 g·100g<sup>-1</sup>); en el grano, las AT en la PP-GP (0.014 %) y PV-GP (0.011 %) fueron similares a las reportadas por Zhao *et al.* (2008) para granos de color rosado y por Espinosa *et al.* (2009) para los granos azules, correspondientemente.

En comparación con otras especies de interés para la obtención de antocianinas totales se observó que las brácteas de la mazorca, vainas foliares, jilotes inferiores y olote de los maíces pigmentados tuvieron rendimientos superiores a los obtenidos en trigo morado (0.05 %, Bustos *et al.*, 2012) y en diversos granos de cereales (0.32 %, Abdel *et al.*, 2006), así, las antocianinas producidas en los órganos de la planta en su conjunto, es decir, como planta completa, le dan al maíz pigmentado una gran ventaja en la producción de este pigmento, comparado con otros cultivos.

Aunque el contenido de AT en los órganos de la planta de las poblaciones pigmentadas evaluadas permitió identificar cuáles fueron los órganos con mayor potencial para producirlas, se sugiere que además de tomar en cuenta a esta variable, también se debe considerar al o a los órganos con mayor potencial para producirlas, ya que es importante considerar la proporción de biomasa contenida en cada órgano en función de la biomasa total de la planta; por ejemplo, aunque se encontró que los jilotes inferiores tuvieron aproximadamente 0.5 g de AT en 100 g de biomasa, las plantas de las poblaciones PP-GP y PP-GnP sólo produjeron en promedio 1.5-1.7 g de jilotes inferiores (< de 1 % de la biomasa total), mientras que el tallo fue el órgano con mayor biomasa (28 a 35 % de la biomasa total) pero su capacidad para acumular AT fue muy baja; en contraste, las vainas y las brácteas de la mazorca pueden considerarse excelentes órganos productores de antocianinas, ya que su biomasa osciló entre 16.4 y 27.3 g y acumularon desde 0.76 hasta 0.92 g de AT·100 g<sup>-1</sup> de biomasa (Cuadro A-2).

### **3.5.2.2. En las poblaciones durante la etapa reproductiva de la planta de maíz (Poblaciones x Muestreos)**

Hye y Verpoorte (2010) indican que en el análisis metabólico la concentración de los metabolitos puede ser variable dependiendo de la etapa fenológica en la que se colecta la muestra, por lo tanto, es necesario realizar el análisis de la concentración de AT durante el ciclo del cultivo para conocer el periodo en que se debe hacer la cosecha de las plantas para obtener el mayor rendimiento posible de antocianinas. Como se muestra en el Cuadro 5, en la interacción Poblaciones x Muestreos el mayor contenido de AT se obtuvo entre 98 dds (PP-GP, 0.668 g·100 g<sup>-1</sup>) y 108 dds (PP-GnP, 0.656

g·100 g<sup>-1</sup>); en los muestreos subsecuentes se observó una disminución de las AT, siendo drástica en el periodo comprendido entre 118 y 138 dds (la reducción fue de 43 hasta 51 %). En contraste, se observó que las dos poblaciones de PV no incrementaron ni redujeron el contenido de AT en este periodo, cuyos valores promedio oscilaron entre 0.008 y 0.011 g·100 g<sup>-1</sup>.

Con base en lo anterior, se infiere que conforme las poblaciones pigmentadas están llegando al final de su ciclo biológico o como consecuencia de la prolongada exposición de los tejidos a los factores ambientales adversos, las antocianinas tienden a degradarse; no obstante, el grado de desnaturalización (el cual se ve reflejado en la concentración de AT) puede variar entre poblaciones, como ocurrió en las poblaciones PP-GP y PP-GnP, en donde esta última conservó una mayor cantidad de AT (fueron estadísticamente diferentes). La disminución de AT ocasionó que cambiara la intensidad de la pigmentación de los tejidos, los cuales se tornaron opacos a 138 dds, aunque en la población PP-GP la coloración morada prácticamente desapareció en algunos órganos (Figura 4 A).

**Cuadro 5. Valores promedio del contenido de antocianinas totales en la interacción Poblaciones x Muestreos. Montecillo, México. 2010.**

	AT (g·100 g <sup>-1</sup> )			
	98 dds	108 dds	118 dds	138 dds
PP-GP	0.668 <sup>a</sup>	0.529 <sup>c</sup>	0.531 <sup>c</sup>	0.260 <sup>f</sup>
PP-GnP	0.461 <sup>d</sup>	0.656 <sup>a</sup>	0.621 <sup>b</sup>	0.353 <sup>e</sup>
PV-GP	0.011 <sup>g</sup>	0.009 <sup>g</sup>	0.010 <sup>g</sup>	0.009 <sup>g</sup>
PV-GnP	0.009 <sup>g</sup>	0.009 <sup>g</sup>	0.008 <sup>g</sup>	0.008 <sup>g</sup>
DMS	0.03431			

Los valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Prueba de Tukey  $\alpha$ : 0.05); **PP-GP** = Planta pigmentada-grano pigmentado; **PP-GnP** = Planta pigmentada-grano no pigmentado; **PV-GP** = Planta verde-grano pigmentado; **PV-GnP** = Planta verde-grano no pigmentado; **AT** = Concentración de antocianinas totales en g·100 g<sup>-1</sup>; **dds** = Días después de la siembra; **DMS** = Diferencia mínima significativa.

Para definir el momento más conveniente para cosechar las plantas de maíz y obtener los rendimientos de antocianinas más altos, además de su concentración en la planta

es importante que también se considere la biomasa total de ésta, ya que conforme transcurre el ciclo de cultivo puede variar, pues durante los 98 y 118 dds se incrementó gradualmente por el crecimiento y desarrollo del grano y a 138 dds disminuyó por la pérdida de algunos órganos afectados por el proceso de senescencia (láminas foliares, algunas vainas foliares y brácteas exteriores de la mazorca, espiga, jilotes inferiores, Cuadro A-4); la conservación de la biomasa dependió de las características genéticas de las poblaciones, sobre todo de su fenología, su precocidad y vigor.

### 3.5.2.3. En los órganos durante la etapa reproductiva de la planta de maíz (Órganos de la planta x Muestréos)

La concentración de AT varió en los órganos de la planta a través del tiempo; en algunos se incrementó, en otros se mantuvo constante y en su mayoría hubo un abatimiento en la concentración de las antocianinas a 138 dds. Las vainas foliares y las brácteas de la mazorca, estadísticamente tuvieron la misma cantidad de AT (Cuadro 6) a 108 dds y fueron los órganos que más acumularon antocianinas durante el periodo comprendido entre 98 y 118 dds (0.622 a 760 g·100g<sup>-1</sup>), seguidos por los jilotes inferiores (0.481 g·100g<sup>-1</sup>).

**Cuadro 6. Valores promedio del contenido de antocianinas totales en la interacción Órganos de la planta x Muestréos. Montecillo, México. 2010.**

Muestreo	AT (g·100 g <sup>-1</sup> )								
	T	LF	VF	E	J	B	O	P	G
98 dds	0.013 <sup>i</sup>	0.028 <sup>i</sup>	0.715 <sup>a</sup>	0.407 <sup>e</sup>	0.481 <sup>c</sup>	0.634 <sup>b</sup>	0.346 <sup>f</sup>	0.020 <sup>i</sup>	0.009 <sup>i</sup>
108 dds	0.016 <sup>i</sup>	0.118 <sup>h</sup>	0.760 <sup>a</sup>	0.421 <sup>de</sup>	0.481 <sup>c</sup>	0.750 <sup>a</sup>	0.382 <sup>ef</sup>	0.252 <sup>g</sup>	0.006 <sup>i</sup>
118 dds	0.018 <sup>i</sup>	0.237 <sup>g</sup>	0.622 <sup>b</sup>	0.391 <sup>ef</sup>	0.477 <sup>cd</sup>	0.706 <sup>a</sup>	0.483 <sup>c</sup>	0.099 <sup>h</sup>	0.008 <sup>i</sup>
138 dds	0.017 <sup>i</sup>	0.025 <sup>i</sup>	0.269 <sup>g</sup>	0.016 <sup>i</sup>	0.139 <sup>h</sup>	0.481 <sup>c</sup>	0.338 <sup>f</sup>	0.024 <sup>i</sup>	0.007 <sup>i</sup>
DMS	0.056685								

Los valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Prueba de Tukey  $\alpha$ : 0.05); **AT** = Concentración de antocianinas totales en g·100 g<sup>-1</sup>; **T** = Tallo; **LF** = Láminas foliares; **VF** = Vainas foliares; **E** = Espiga; **J** = Jilotes inferiores; **B** = Brácteas de la mazorca; **O** = Olote; **P** = Pedúnculo; **G** = Grano; **dds** = Días después de la siembra; **DMS** = Diferencia mínima significativa.

Aunque es irrefutable la disminución de las AT en los órganos de la planta al final del ciclo biológico del cultivo (138 dds), la concentración de AT fue variable en los órganos

durante los muestreos evaluados; por ejemplo, en las láminas foliares, las brácteas de la mazorca, el olote y el pedúnculo se observó un incremento de las AT (con diferencias estadísticas significativas) en el periodo comprendido entre 98 y 108 dds, mientras que en los jilotes inferiores, la concentración se mantuvo constante entre 98 y 118 dds pero disminuyó significativamente a 138 dds (reducción de 71 % de AT); en cambio, en el tallo la concentración de AT aumentó ligeramente durante el periodo de 98 y 138 dds, pero no hubo diferencias estadísticas significativas.

También se encontró que entre 118 y 138 dds; es decir, en solo 20 días, se presentó una alta tasa de degradación de las antocianinas, lo que ocasionó la reducción directa de la concentración de AT en los órganos; la pérdida fue mayor en las vainas y láminas foliares (57 y 89 %, respectivamente), espiga (96 %) y pedúnculo (97.5 %), mientras que las brácteas de la mazorca sólo disminuyeron 32 % (perdieron  $0.225 \text{ g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ), probablemente porque las internas se encuentran protegidas de la incidencia directa de la radiación y otros factores ambientales adversos.

En el grano no se encontraron diferencias significativas en el contenido de AT; no obstante, se sugiere que las dos poblaciones de grano pigmentado (PP-GP y PV-GP) tienen potencial para producir más antocianinas que las concentraciones encontradas en esta evaluación, las cuales fueron afectadas por la variación que los granos muestreados presentaron en el patrón de pigmentación a través del tiempo, ya que en algunas muestras de grano de una misma población hubo diversas tonalidades, así como marcadas diferencias en la intensidad del pigmento entre muestreos tempranos (98 dds) y tardíos (138 dds), en donde se esperaba que entre más tiempo transcurriera, el pigmento sería más intenso (Figura 5 A), este hecho probablemente fue ocasionado por los factores ambientales incidentes, como la reducción de la temperatura en la fase final del cultivo.

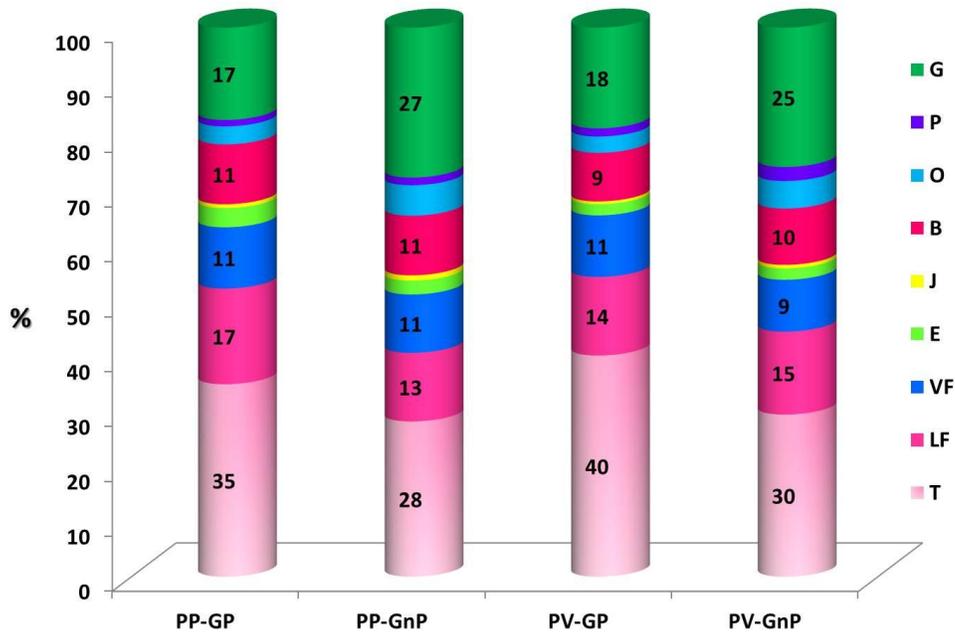
### 3.5.3. Valoración del potencial productivo de antocianinas en poblaciones de maíz pigmentado

En los últimos 40 días del cultivo; es decir, en el periodo comprendido entre 98 y 138 dds se observó que el contenido de AT varió entre las poblaciones evaluadas y entre los órganos de la planta. El comportamiento de la población PV-GnP que fungió como testigo por no tener capacidad para acumular antocianinas, fue estadísticamente igual a la población PV-GP, cuyos rendimientos de antocianinas fueron menores a  $0.032 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  (Cuadro A-3). Asimismo, se observó que en las poblaciones de planta pigmentada, el tallo y el grano se comportaron estadísticamente iguales a sus similares de las poblaciones de planta verde; por lo tanto, se infiere que la capacidad de éstos órganos para acumular antocianinas fue menor a la de otros como las vainas foliares y las brácteas de la mazorca; también se encontró que no en todos los tiempos de evaluación las láminas foliares, jilotes inferiores y espiga tuvieron una baja concentración de AT ( $0.008$  a  $0.043 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ); por ejemplo, en las láminas foliares de la población PP-GnP la concentración de AT se incrementó  $0.226 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  entre 98 dds y 118 dds, pero 20 días después se redujo en  $0.237 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ , obteniendo solo  $0.023 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  a 138 dds.

Aunque la concentración de AT, expresada en  $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  de biomasa, permitió conocer el potencial que tienen los órganos de las poblaciones pigmentadas para acumular antocianinas, un enfoque más preciso se obtuvo al determinar el contenido de AT en función de la biomasa producida por órgano y por planta. Así, se encontró que en promedio, la biomasa por planta fue superior en las poblaciones de PP-GP y PV-GP ( $240$  y  $262 \text{ g} \cdot \text{planta}^{-1}$ ) que en las poblaciones de PV-GnP y PP-GnP ( $149$  y  $153 \text{ g} \cdot \text{planta}^{-1}$ ); no obstante, como se señala en la Figura 23, en todas las poblaciones el órgano que acumuló más biomasa fue el tallo y constituyó entre 28 y 40 % de la biomasa total de la planta, seguido por el grano (17 a 27 %), las láminas foliares (13 a 17 %), las vainas foliares y las brácteas de la mazorca (9 a 11 %); mientras que el olote (3 y 6 %), el pedúnculo (1 y 3 %), los jilotes inferiores (< 1 %) y la espiga (2 y 4 %)

tuvieron los valores de biomasa inferiores y fueron estadísticamente iguales (Cuadro A-4).

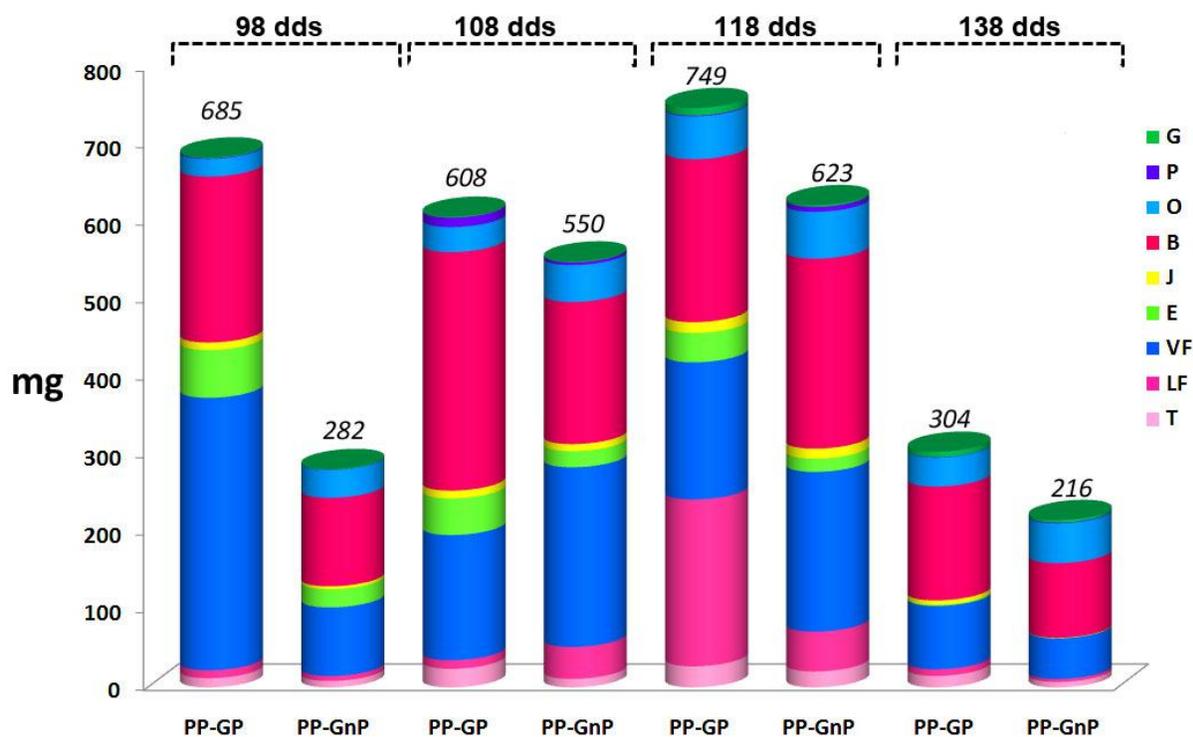
En el Cuadro A-5 se muestran los valores promedio del contenido de AT ( $\text{g}\cdot\text{órgano}^{-1}$ ) para la interacción (OxPxM); es decir, de las antocianinas producidas por órgano de la planta de las poblaciones PP-GP, PP-GnP, PV-GP y PV-GnP en los diferentes tiempos de evaluación, cuyo comportamiento fue estadísticamente diferente. Las poblaciones PV-GP y PV-GnP no fueron sobresalientes, comparadas con las poblaciones PP-GP y PP-GnP, en las cuales los órganos que acumularon más antocianinas fueron las vainas foliares y las brácteas de la mazorca; los órganos con menor potencial para acumular antocianinas (ya sea por su tamaño o por su capacidad de síntesis) fueron el pedúnculo, los jilotes inferiores, el tallo, las láminas foliares y el grano.



**Figura 23. Porcentaje de la biomasa total que constituye cada órgano de la planta. PP-GP = Planta pigmentada-grano pigmentado; PP-GnP = Planta pigmentada-grano no pigmentado; PV-GP = Planta verde-grano pigmentado; PV-GnP = Planta verde-grano no pigmentado; T = Tallo; LF = Láminas foliares; VF = Vainas foliares; E = Espiga; J = Jilotes inferiores; B = Brácteas de la mazorca; O = Olote; P = Pedúnculo; G = Grano.**

### 3.5.3.1. Concentración de antocianinas totales por planta

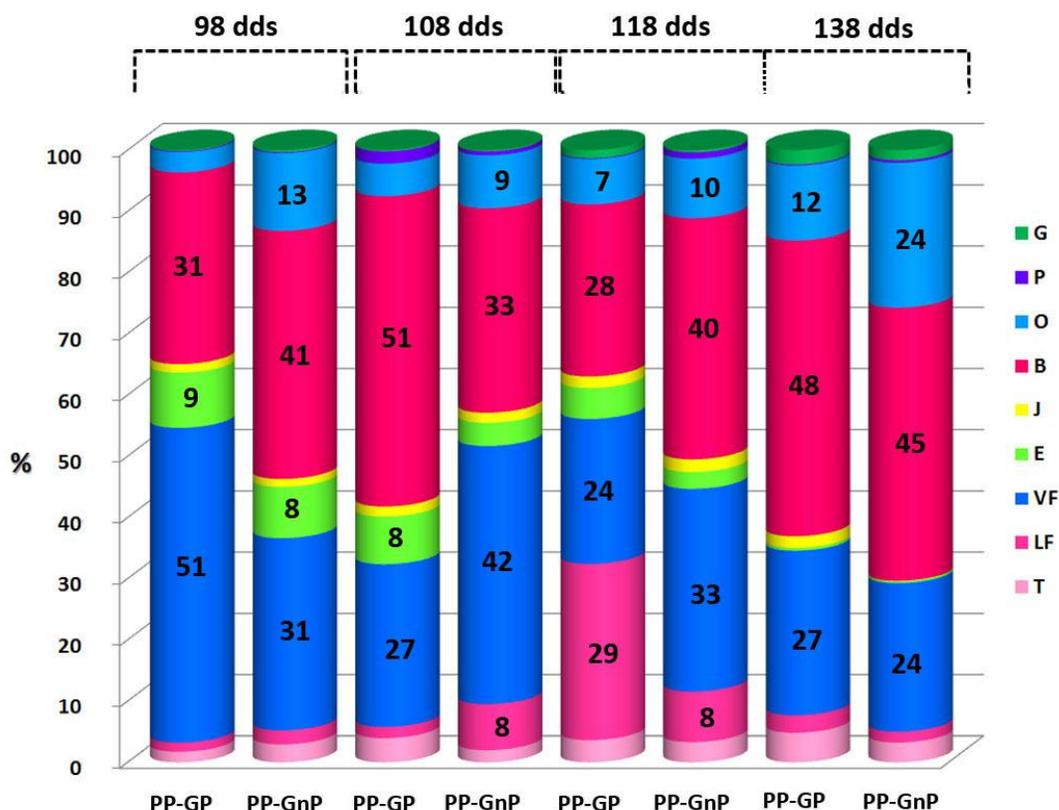
En la Figura 24 se ejemplifica el contenido de antocianinas totales por planta (en mg) que mostraron las poblaciones PP-GP y PP-GnP durante los 40 días de evaluación; se observa que la producción de AT en los muestreos varió entre 216 y 749 mg planta<sup>-1</sup>, asimismo, durante los cuatro tiempos de evaluación la población PP-GP tuvo rendimientos superiores a los de la población PP-GnP. Los valores máximos de AT por planta se alcanzaron a 118 dds en ambas poblaciones, por lo que se sugiere que en esta etapa fenológica (estado masoso-lechoso del grano, Figura 6 A) es que se recomienda realizar la cosecha del maíz pigmentado para lograr un buen rendimiento de antocianinas totales.



**Figura 24. Contenido de antocianinas totales en la planta durante la etapa reproductiva del maíz pigmentado. PP-GP= Planta pigmentada-grano pigmentado; PP-GnP = Planta pigmentada-grano no pigmentado; PV-GP = Planta verde-grano pigmentado; PV-GnP = Planta verde-grano no pigmentado; T = Tallo; LF = Láminas foliares; VF = Vainas foliares; E = Espiga, J = Jilote inferiores; B = Brácteas de la mazorca; O = Olote; P = Pedúnculo; G = Grano; dds = días después de la siembra.**

Al final del ciclo biológico del cultivo, por la pérdida natural de biomasa (incidencia de factores ambientales adversos y senescencia de los órganos) fue indudable un decaimiento de la concentración de AT (304 y 216 mg planta<sup>-1</sup> en PP-GP y PP-GnP a 138 dds, respectivamente).

Como se muestra en la Figura 25, en los 40 días de evaluación las vainas foliares y las brácteas de la mazorca fueron los órganos que aportaron más antocianinas a la concentración de AT por planta, constituyeron entre 71 y 82 % (98 dds), 75 y 77 % (108 dds), 51 y 72 % (118 dds), 68 y 74 % (138 dds) de las antocianinas acumuladas. Otros órganos que sobresalieron en algunos tiempos de la etapa reproductiva de la planta fueron la espiga, el olote y las láminas foliares.



**Figura 25. Aportación de cada órgano al contenido de antocianinas totales por planta. PP-GP= Planta pigmentada-grano pigmentado; PP-GnP = Planta pigmentada-grano no pigmentado; T = Tallo; LF = Láminas foliares; VF = Vainas foliares; E = Espiga, J = Jilote inferiores; B = Brácteas de la mazorca; O = Olote; P = Pedúnculo; G = Grano; dds = días después de la siembra.**

### 3.5.3.2. Estimación del rendimiento de antocianinas por unidad de superficie

En el Cuadro 7 se muestra el rendimiento estimado de antocianinas por unidad de superficie, considerando que la densidad de plantas establecidas para la obtención de las muestras analizadas fue de 65 000 plantas ha<sup>-1</sup>. Se observa que en los diferentes tiempos de evaluación, las poblaciones pigmentadas pudieron acumular en sus tejidos desde 1.4 hasta 2.0 kg de AT en la población PV-GP (que sólo acumuló en el grano), 14.1 a 40.5 kg de AT en PP-GnP y la de más alto rendimiento desde 19.8 hasta 48.7 kg de AT en PP-GP, lo cual indica que el potencial productivo de antocianinas de las poblaciones pigmentadas es alto, sobre todo cuando en conjunto todos los órganos de la planta las producen; además, es importante señalar que entre más biomasa produzcan las plantas, como fue el caso de la población totalmente pigmentada, el rendimiento se incrementará sustantivamente.

**Cuadro 7. Valores estimados de rendimiento de antocianinas totales por unidad de superficie en diferentes tiempos de valoración de las poblaciones pigmentadas de maíz. Montecillo, México. 2010.**

Muestreo	Población	kg de AT ha <sup>-1</sup>
98 dds	PP-GP	44.5
	PP-GnP	18.4
	PV-GP	1.7
108 dds	PP-GP	39.5
	PP-GnP	35.8
	PV-GP	1.7
118 dds	PP-GP	48.7
	PP-GnP	40.5
	PV-GP	2.0
138 dds	PP-GP	19.8
	PP-GnP	14.1
	PV-GP	1.4

**PP-GP**= Planta pigmentada-grano pigmentado; **PP-GnP** = Planta pigmentada-grano no pigmentado; **PV-GP** = Planta verde-grano pigmentado; **PV-GnP** = Planta verde-grano no pigmentado; **dds** = días después de la siembra.

### 3.6. CONCLUSIONES

La máxima concentración de antocianinas totales en cada uno de los órganos de la planta de poblaciones pigmentadas fue:  $0.92 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  en las brácteas de la mazorca,  $0.87 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  en las vainas foliares,  $0.59 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  en los jilotes inferiores,  $0.56 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  en el olote,  $0.49 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  en la espiga,  $0.20 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  en las láminas foliares y en el pedúnculo,  $0.028 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  en el tallo; y  $0.014 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  en el grano.

El contenido de antocianinas totales en la planta varió entre 216 hasta  $749 \text{ mg planta}^{-1}$  durante los últimos 40 días del ciclo biológico del maíz. Los órganos de la planta de maíz pigmentado que acumularon más antocianinas fueron las brácteas y las láminas foliares.

El momento en el que se obtuvieron los mayores rendimientos de antocianinas ( $40$  y  $48 \text{ kg}$  de antocianinas por  $\text{ha}^{-1}$ ) en las poblaciones de planta pigmentada con y sin grano pigmentado fue a 118 días después de la siembra; no obstante, también sería adecuado cosechar las plantas a 108 dds, tiempo en el que se obtienen  $39.5$  y  $35.8 \text{ kg}$  de antocianinas por  $\text{ha}^{-1}$ .

En el periodo comprendido entre 118 y 138 dds, el contenido de AT en la planta se redujo en 60 a 65 %, lo cual indicó que las antocianinas del maíz se degradan al final del ciclo biológico del cultivo.

### 3.7. LITERATURA CITADA

**Abdel, A. 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, A. 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(13): 4696-4704.

**Arena, M. E., P. Postemsky, N. R. Curvetto. 2012.** Accumulation patterns of phenolic compounds during fruit growth and ripening of *Berberis buxifolia*, a native Patagonian species. *New Zealand Journal of Botany* 50(1): 15-28.

- Arozarena, I., B. Ayestarán, M. Cantalejo, M. Navarro, M. Vera, I. Abril, A. Casp. 2002.** Anthocyanin composition of Tempranillo, Garnacha and Cabernet Sauvignon grapes from high- and low-quality vineyards over two years. *European Food Research and Technology* 214 (4): 303–309.
- Bakkar, J., S. J. Bell W., H.P. Reader, S. J. Watkins. 1999.** Effect of enzymes during vinification on colour and sensory properties of port wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 50(30): 271–276.
- Bridle, P., and C. F. Timberlake. 1997.** Anthocyanins as natural food colours-selected aspects. *Food Chemistry* 58(1-2): 103-109.
- Bustos, V. D., R. Riegel, D. F. Calderini. 2012.** Anthocyanin content of grains in purple wheat is affected by grain position, assimilate availability and agronomic management. *Journal of Cereal Science* 55:257-264.
- Cacace, J. E., and G. Mazza. 2003.** Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. *Journal of Food Science* 68(1): 240–248.
- Cevallos C, B. A., and L. Cisneros Z. 2003.** Stoichiometric and kinetic studies of phenolic antioxidants from andean purple corn and red-fleshed sweet potato. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 3313–3319.
- Clifford, M. N. 2000.** Anthocyanins nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80(7): 1063–1072.
- Cuevas, M. E., A. Antezana, P. Winterhalter. 2008.** Análisis y caracterización de antocianinas en diferentes variedades de maíz boliviano. *Memorias Red-Alpha-Lagrotech. Comunidad Europea. Cartagena.* pp. 79-95.
- Dowswell, C. R.; L. Paliwal; R. P. Cantrel. 1996.** Maize in the third World. CIMMYT. Ed. Westview. USA. 268 p.
- Espinosa, T. E., M. C. Mendoza C., F. Castillo G. 2006.** Diversidad fenotípica entre poblaciones de maíz con diferentes grados de pigmentación. *Revista Fitotecnia Mexicana* 29(2): 19-23.
- Espinosa, T. E., M. C. Mendoza C., F. Castillo G., J. Ortiz C., A. Delgado A., A. Carrillo S. 2009.** Acumulación de antocianinas en pericarpio y aleurona del grano y sus efectos genéticos en poblaciones criollas de maíz pigmentado. *Revista Fitotecnia Mexicana* 32(4): 303-309.
- Flores, J., and D. Heatherbell. 1984.** Optimizing enzyme and prepress mash treatment for colour and juice extraction from strawberries. *Fluessiges Obst.* 51(7):320–324.
- Francis, F. 1989.** Food colourants: anthocyanin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 28: 273–314.

**García V. C., P. Zafrilla, F. A. Tomás B. 1998.** The use of acetone as an extraction solvent for anthocyanins from strawberry fruit. *Phytochemical Analysis* 9: 274–277.

**García, E. 1988.** Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 246 p.

**Giusti, M. M. and P. Jing. 2008.** Analysis of anthocyanins. *In: Food Colorants: Chemical and Functional Properties.* Socaciu C. (ed.). CRC Press LLC. USA. 480-497 pp.

**Giusti, M. M., and R. E. Wrolstad. 2001.** Characterization and measurement of anthocyanins by UV–visible spectroscopy. *In: Current Protocols in Food Analytical Chemistry.* New York: Wiley.

**Hye, K. K. and R. Verpoorte. 2010.** Sample preparation for plant metabolomics. *Phytochemical Analysis* 21: 4-13.

**Jing, P. and M. M. Giusti. 2007.** Effects of extraction conditions on improving the yield and quality of an anthocyanin-rich purple corn (*Zea mays* L.) color extract. *Food Chemistry and Toxicology* 27(7): 363-368.

**Kähkönen, M.P., A. I. Hopia, M. Heinonen. 2001.** Berry phenolics and their antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(8): 4076–4082.

**Kong, J., L. Chia, N. Goh, T. Chia, R. Brouillard. 2003.** Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 64: 923–933.

**Li, C. Y., H. W. Kim, S. R. Won, H. K. Min, K. J. Park, J. Y. Park, M. S. Ahn , H. I. Rhee. 2008.** Corn husk as a potential source of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(23): 114-136.

**Longo L., and G. Vasapollo. 2006.** Extraction and identification of anthocyanin from *Smilax aspera* L. berries. *Food Chemistry* 94: 226–231.

**Macheix, J.J., A. Fleuriet, J. Billot. 1990.** Fruit Phenolics. CRC Press: Boca Raton, FL.

**Macías, G. A. 2000.** Calidad comercial y nutricional de tortilla y fruta de maíces pigmentados. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Ingeniería Agroindustrial. pp. 3-11.

**Mercadante A. Z., and F. O. Bobbio. 2008.** Anthocyanins in foods: occurrence and physicochemical Properties. *In: Food Colorants: Chemical and Functional Properties.* Socaciu C. (ed.). CRC Press LLC. USA. 241-268 pp.

**Ming. J. M., L. S. Chia, N. K. Goh, T. F. Chia, R. Brouillard. 2003.** Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 64: 923-933.

- Montes, C., I. M. Vicario, M. Raymundo, R. Fett, F. J. Heredia. 2005.** Application of tristimulus colorimetry to optimize the extraction of anthocyanins from Jaboticaba (*Myrcia jaboticaba* Berg.). *Food Research International* 38: 983–988.
- Nicolini, G., and F. Mattivi. 1997.** Red grapes vinification with exogenous pectolytic enzymes: trials. *Enotechnico* 33(3):65–71.
- Pazmiño, D. E. A., M. M. Giusti, R. E. Wrolstad, M. B. A. Glória. 2001.** Anthocyanins from banana bracts (*Musa X paradisiaca*) as potential food colorants. *Food Chemistry* 73:327-332.
- Pliszka B., G. Huszcza C., E. Wierzbicka. 2008.** Effects of extraction conditions on the content of anthocyanins and bioelements in berry fruit extracts. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 39: 753–762.
- Pozo, I. D., C. H. Brenes, S. O. Serna S., S. T. Talcott. 2006.** Polyphenolic and antioxidant content of white and blue corn (*Zea mays* L.). *Food Research International* 39: 696–703.
- Raghvendra, V. Sharma, A. Shakya, M. D. Hedayatullah, G. Shankar A., A. Mishra, A. Deo. G., A. P. Pachpute, D. Patel. 2011.** Chemical and potential aspects of anthocyanins- a water-soluble vacuolar flavonoid pigments: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 6(1): 28-33.
- Salinas, M. Y., G. S. Sánchez, D. R. Hernández, N. R. Lobato. 2005.** Characterization of anthocyanin extracts from maize kernels. *Journal of Chromatographic Science* 43: 483–487.
- Salinas, M. Y., J. Soria R., E. Espinosa T. 2010.** Aprovechamiento y Distribución de Maíz Azul en el Estado de México. Folleto Técnico No. 42. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Valle de México México. 50 p.
- Sánchez, G. J. J., M. M. Goodman, C. W. Stuber. 2000.** Isoenzymatic and morphological diversity in the races of maize of Mexico. *Botany* 54: 43-59.
- SNIIM. Sistema Nacional de Información e Integración de Mercados. 2007.** Información de la Dirección General de Aduanas. SAGARPA-INEGI-CONAPO.
- Sowbhagya H. B., V. N. Chitra. 2010.** Enzyme-assisted extraction of flavorings and colorants from plant materials. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 50:146-161.
- Wang, W. D. and S. Y. Xu. 2007.** Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentration. *Journal of Food Engineering* 82: 271–275.
- Wang, Y and M. Zeng. 2009.** Studies on Zhuo-Zi No. 1, a purple hybrid in maize (*Zea mays* L.). *Maize Genetics Cooperation Newsletter* 83: 2-3.

- Wu, X., G. R. Beecher, J. M. Holden, D. B. Haytowitz, S. E. Gebhardt, R. L. Prior. 2006.** Concentration of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(11): 4069-4075.
- Xu Z., J. Wu, Y. Zhang, X. Hu, X. Liao , Z. Wang. 2010.** Extraction of anthocyanins from red cabbage using high pressure CO<sub>2</sub>. *Bioresource Technology* 101: 7151–7157.
- Yang Z. and W. Zhai. 2010a.** Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins from purple corn (*Zea mays* L.) cob and identification with HPLC–MS. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11: 470–476.
- Yang, Z. and W. Zhai. 2010b.** Identification and antioxidant activity of anthocyanins extracted from the seed and cob of purple corn (*Zea mays* L.). *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11:169-176.
- Yang, Z., G. Fan, Z. Gu, Y. Han, Z. Chen. 2008a.** Optimization extraction of anthocyanins from purple corn (*Zea mays* L.) cob using tristimulus colorimetry. *European Food Research Technology* 227:409–415.
- Yang, Z., Y. Han, Z. Gu, G. Fan, Z. Chen. 2008b.** Thermal degradation kinetics of aqueous anthocyanins and visual color of purple corn (*Zea mays* L.) cob. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9:341-347.
- Yang, Z., Z. Chen, S. Yuan, W. Zhai, X. Piao, X. Piao. 2009.** Extraction and identification of anthocyanin from purple corn (*Zea mays* L.) *International Journal of Food and Science and Technology* 44: 2485-2492.
- Zhao, X., C. Zhang, C. Guigas, Y. Ma, M. Corrales, B. Tauscher, X. Hu. 2009.** Composition, antimicrobial activity, and antiproliferative capacity of anthocyanin extracts of purple corn (*Zea mays* L.) from China. *European Food Research and Technology* 228: 759-765.
- Zhao, X., M. Corrales, C. Zhang, X. Hu, Y. Ma, B. Tauscher. 2008.** Composition and thermal stability of anthocyanins from chinese purple corn (*Zea mays* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:10761-10766.

## CAPÍTULO IV

### DISCUSIÓN GENERAL

El análisis de la información científica relacionada con los compuestos antociánicos permitió conocer que debido al descubrimiento de sus propiedades bioactivas se han desarrollado nuevas y más específicas investigaciones enfocadas al estudio de los efectos que tiene su ingesta en la salud humana y a la comprensión de cómo es que actúan en el organismo; asimismo, se encontró que como consecuencia de la difusión del conocimiento científico entre la población acerca de los beneficios que provee el consumo de antocianinas, la demanda de productos ricos en estos compuesto ha aumentado (Birute *et al.*, 2009; Rooney *et al.*, 2004) y en consecuencia también se ha incrementado el número de especies vegetales (ya sea cultivadas o de recolección) utilizadas para su extracción.

En cultivos básicos como el maíz se ha buscado incrementar el contenido de antocianinas principalmente en los granos (Bustos *et al.*, 2012; Espinosa *et al.*, 2009), éstos constituyen la base de la dieta alimenticia de la población de países en vías de desarrollo y por lo tanto, se ha considerado que podrían actuar como un alimento funcional. En esta investigación, se observó que en las poblaciones de maíz pigmentado, además de producir antocianinas en el grano, la acumulación del pigmento ocurrió en todos los órganos de la planta (fueron formados *ex profeso*) corroborando lo señalado por Li *et al.* (2008) quienes indican que la planta de maíz tiene potencial para sintetizar antocianinas en todos sus órganos inclusive, Yang y Zhai (2010) mencionan que los extractos de esta especie contienen una gran cantidad de antocianinas que por su naturaleza química son más estables que las obtenidas a partir de otros cultivos, por lo que una forma inmediata de aprovechamiento podría ser a través de su inclusión en productos nutracéuticos o su utilización como colorante natural en los alimentos y cosméticos (Ota y Yokoyama, 2010; Yang *et al.*, 2008b).

Los estudios realizados con extractos de maíz pigmentado muestran que las principales propiedades bioactivas de éstos son como antioxidante (Cuevas *et al.*,

2008), actividad antimicrobiana y capacidad antiproliferativa de células cancerígenas (Zhao *et al.*, 2009), efecto antiobesidad y para reducción y control de la hiperglucemia (Yang *et al.*, 2008a); sin embargo, aunque existen investigaciones sobre el contenido de antocianinas totales en el grano (Espinosa *et al.*, 2009) y en algunos órganos de la planta (Yang *et al.*, 2009), hasta este momento no había sido descrito cómo es que se lleva a cabo el proceso de pigmentación en la planta a través de su ciclo de cultivo, el cual es relevante si se pretende aprovechar eficientemente esta fuente de antocianinas, ya que como lo señalan Arena *et al.* (2012) es necesario estudiar el patrón de acumulación de los metabolitos para determinar el periodo óptimo y las condiciones necesarias para la obtención del máximo rendimiento, pues la etapa fenológica del cultivo, el tipo de órgano y la hora del día en que se colectan los tejidos pueden ocasionar variación en la calidad y en la concentración del metabolito (Hye y Verpoorte, 2010).

En las poblaciones de maíz pigmentado evaluadas se encontró que, a diferencia de otras especies angiospermas, sí existe un patrón de acumulación de antocianinas bien definido, en el cual, los órganos de la planta que inician la pigmentación son las vainas foliares, seguidas por las láminas foliares, el tallo, la espiga, los jilotes inferiores, las brácteas de la mazorca, el pedúnculo, el olote y el grano; en la planta, la pigmentación ocurre en principio en los órganos maduros que se ubican en la base de la planta (vainas y láminas foliares) en sentido acrópeto y, en cada órgano se sigue un sentido de acumulación específico, el cual es basípeto en las vainas foliares, espiga, tallo, jilotes inferiores, brácteas de la mazorca, pedúnculo y grano; y acrópeto en las láminas foliares y el olote.

Durante el ciclo del cultivo de dichas poblaciones pigmentadas, se observó que a 77 dds inició el proceso de máxima acumulación de antocianinas, la cual provocó que los órganos de la planta mostraran una pigmentación morada intensa; dicha acumulación siguió en aumento hasta 98 dds, momento en el que se sugirió que se iniciaba el declive de la acumulación e inclusive una posible degradación de las antocianinas ya que algunos órganos de la planta comenzaron a reducir la intensidad de la

pigmentación y a deteriorarse; sin embargo, cuando se determinó el contenido de antocianinas totales a 98, 108, 118 y 138 dds, se encontró que pese al deterioro que sufrieron los órganos por la incidencia de factores ambientales adversos y el proceso de senescencia, la cantidad de antocianinas siguió aumentando entre 98 y 118 dds, por lo que se infiere que los cambios en la intensidad del pigmento observados, no siempre son indicadores totalmente confiables para señalar si la concentración de antocianinas aumenta o disminuye, sobretodo cuando no se sigue una metodología como la de las pruebas de colorimetría.

Mediante la determinación de la concentración de antocianinas totales (AT) en la planta de maíz de poblaciones pigmentadas se observó que la capacidad de acumular el pigmento es variable entre las poblaciones, entre los órganos de la planta y durante las diferentes fases de la etapa reproductiva del maíz. Se encontró que la cantidad de AT será mayor cuando todos los órganos de la planta acumulen antocianinas e inclusive es posible que los rendimientos obtenidos superen a los de algunos cereales (Bustos *et al.*, 2012; Abdel *et al.*, 2006), sin importar que en algunos momentos del ciclo del cultivo el rendimiento de AT por órgano sea reducido, ya sea por su baja capacidad para acumularlas o porque su aportación a la biomasa total no sea significativa, como es el caso del pedúnculo, jilotes inferiores láminas foliares, tallo y espiga.

Durante el ciclo reproductivo final del maíz se obtuvieron concentraciones de antocianinas entre 216 a 749 mg planta<sup>-1</sup>; en esos últimos 40 días del ciclo biológico del cultivo, hubo un incremento de AT durante los primeros 20 días (de 98 a 118 dds) de 8.5 y 54 % (población de planta pigmentada-grano pigmentado y población de planta pigmentada-grano no pigmentado), en donde las AT a 118 dds fueron 749 y 623 mg planta<sup>-1</sup>, respectivamente y, fue el momento en que la concentración fue más alta. En los 20 días posteriores a 118 dds, las antocianinas se degradaron y la concentración de AT se redujo en 60 y 65 %. Se observó que los órganos que aportaron más antocianinas a la concentración de AT por planta, fueron las brácteas y las láminas foliares que constituyeron entre 71 y 82 % (98 dds), 75 y 77 % (108 dds), 51 y 72 % (118 dds), 68 y 75 % (138 dds) de las antocianinas acumuladas.

A la vez, se confirmó que la cosecha de las plantas debe ser a 118 dds por estar en posibilidades de cosechar por unidad de superficie el máximo rendimiento de antocianinas el cual es de 48.7 kg ha<sup>-1</sup> en la población completamente pigmentada (PP-GP), 40.5 kg ha<sup>-1</sup> en la población de planta pigmentada-grano no pigmentado (PP-GnP) y 2.0 kg ha<sup>-1</sup> en la población de planta verde y grano pigmentado (PV-GP); los cuales pueden ser utilizados para la obtención de pigmentos, compuestos nutraceuticos, y en el caso de la población de PV-GP como un alimento funcional.

Puesto que se ha comprobado que el maíz pigmentado es una fuente rica en antocianinas, se sugiere que un paso siguiente es la búsqueda de tecnología económica y fácil para trabajar a mayor escala para lograr su aprovechamiento, así como el desarrollo de un paquete tecnológico que indique cual es el manejo más adecuado del cultivo que permita obtener los rendimientos más altos de antocianinas por unidad de superficie; como por ejemplo algunas prácticas agrícolas de fertilización (Bustos *et al.*, 2012).

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES GENERALES

El maíz pigmentado posee un gran potencial para la obtención de antocianinas cuyas propiedades bioactivas pueden ser aprovechadas directamente al consumir el grano (como un alimento funcional) o mediante la extracción de antocianinas de la planta completa para utilizarlas como compuestos nutracéuticos o colorantes naturales; sin embargo, se requiere el desarrollo de tecnología que permita lograr el aprovechamiento de este valioso recurso genético.

En la planta al igual que en los órganos del maíz pigmentado existe un patrón de acumulación de antocianinas claramente definido, la pigmentación se expresa primero en las vainas y láminas foliares y por último en el grano; cada órgano presenta un sentido de la pigmentación específico, el cual es basípeto o acrópeto.

La concentración de antocianinas totales es un indicador que permite determinar cuál es el potencial productivo tanto de las poblaciones como el de los órganos de la planta de maíz pigmentado. Los órganos con mayor potencial fueron las brácteas de la mazorca y las vainas foliares que acumularon  $0.92 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  y  $0.87 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ , respectivamente. Durante la etapa reproductiva de cultivo constituyeron entre 51 y 82 % de las antocianinas totales acumuladas por planta.

Por su alta concentración de antocianinas totales a 118 días después de la siembra (estado masoso-lechoso), se confirmó que la cosecha de las plantas deben ser en ese momento ya que por unidad de superficie las poblaciones pigmentadas producen los máximos rendimientos de antocianinas ( $48.7 \text{ kg ha}^{-1}$  en la población completamente pigmentada,  $40.5 \text{ kg ha}^{-1}$  en la población de planta pigmentada-grano no pigmentado y  $2.0 \text{ kg ha}^{-1}$  en la población de planta verde y grano pigmentado).

## CAPÍTULO VI

### BIBLIOGRAFÍA DE LA INTRODUCCIÓN Y DISCUSIÓN GENERAL

**Abdel, A. 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(13): 4696-4704.

**Andersen, O. M. and M. Jordheim. 2006.** The anthocyanins. *In: Flavonoids Chemistry, Biochemistry and Applications.* Andersen O. M. and K. R. Markham (eds.). CRC Press. 452–471 pp.

**Antonio, M. M., J. L. Arellano V., G. García S., S. Miranda C., J. A. Mejía C., 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.

**Aragón, C. F., S. Taba, J. M. Hernández C., J. D. Figueroa C., 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.

**Arena, M. E., P. Postemsky, N. R. Curvetto. 2012.** Accumulation patterns of phenolic compounds during fruit growth and ripening of *Berberis buxifolia*, a native Patagonian species. *New Zeland Journal of Botany* 50(1): 15-28.

**Ávalos, G. A y E. Pérez U. C. 2009.** Metabolismo secundario de las plantas. Serie Fisiología Vegetal-Reduca Biología 2(3): 119-145.

**Biruete, G. A., E. Juárez H., E. Sieiro O., R. Romero V., J. L. Silencio B. 2009.** Los nutraceuticos. Lo que es conveniente saber. *Revista Mexicana de Pediatría* 76(3): 136-145.

**Boo, H.O., S. J. Hwang, C.S. Bae, S. H. Park, B. G. Heo, S. Gorinstein. 2012.** Extraction and characterization of some natural plant pigments. *Industrial Crops and Products* 40: 129-135.

**Brat, P., F. Tourniaire, M. J. Amiot C. 2008.** Stability and analysis of phenolic pigments *In: Food Colorants: Chemical and Functional Properties.* Socaciu C. (ed.). CRC Press LLC. USA. 71-83 pp.

**Bridle, P. and C.F. Timberlake. 1997.** Anthocyanins as natural food colours-selected aspects. *Food Chemistry* 58(1-2): 103-109.

**Brush, S. B. and H. R. Perales. 2007.** A maize landscape: ethnicity and agrobiodiversity in Chiapas, México. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 121:211-221.

**Bustos, V. D., R. Riegel, D. F. Calderini. 2012.** Anthocyanin content of grains in purple wheat is affected by grain position, assimilate availability and agronomic management. *Journal of Cereal Science* 55:257-264.

**Castañeda, O. A., M. de L. Pacheco H., M. E. Páez H., J. A. Rodríguez, C. A. Galán V. 2009.** Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* 113: 859-871.

**Chan, C.F., C. Y. Lien, Y. C. Lai, C. L. Huang, W. C. Liao. 2010.** Influence of purple sweet potato extracts on the UV absorption properties of a cosmetic cream. *Journal of Cosmetic Science* 61(5): 333-341.

**Clifford, M. N. 2000.** Anthocyanins nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80(7): 1063–1072.

**Coisson, J. D., F. Travaglia, G. Piana, M. Capasso, M. Arlorio. 2005.** *Euterpe oleracea* juice as a functional pigment for yoghurt. *Food Research International* 38: 893–897.

**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.

**Cuevas, M. E., A. Antezana, P. Winterhalter. 2008.** Análisis y caracterización de antocianinas en diferentes variedades de maíz boliviano. *Memorias Red-Alpha-Lagrotech. Comunidad Europea. Cartagena* 79-95 pp.

**Cuevas, S. J. A., S. Miranda C., J. Sahagún C. 1998.** Conceptos y métodos para el estudio de la fitodomeesticación: maíz. *In: Lecturas de Etnobotánica.* Cuevas, S. J. A., E. Cedillo P., A. Muñoz O., P. Vera C. (eds.). PNE. Universidad Autónoma Chapingo. México. 495 p.

**Davies, K. M. 2009.** Modifying anthocyanin production in flowers. *In: Anthocyanins: Biosynthesis, Functions, and Applications.* Gould K., K. Davies, C. Winefield (eds.). Ed. Springer. New York. EUA. 49-83 pp.

**De Pascual, T. S. and M. T. Sánchez B. 2008.** Anthocyanins: from plant to health. *Phytochemistry Reviews* 7:281-299.

**Diehl, H. A. 2008.** Physics of color. *In: Food Colorants: Chemical and Functional Properties.* Socaciu C. (ed.). CRC Press LLC. USA. 3-20 pp.

**Dyrby, M., N. Westergaard, H. Stapelfeldt. 2001.** Light and heat sensitivity of red cabbage extract in soft drink model systems. *Food Chemistry* 72: 431–437.

**Espinosa, T. E. 2008.** Algunos aspectos genéticos y bioquímicos de las antocianinas en poblaciones criollas de maíz de granos pigmentados. Tesis Doctoral. Programa de Recursos Genéticos y Productividad-Genética. Colegio de Postgraduados, Montecillo. México. 165 p.

**Espinosa, T. E., M. C. Mendoza C., F. Castillo G. 2006.** Diversidad fenotípica entre poblaciones de maíz con diferentes grados de pigmentación. *Revista Fitotecnia Mexicana* 29(2): 19-23.

**Espinosa, T. E., M. C. Mendoza C., F. Castillo G., J. Ortiz C., A. Delgado A., A. Carrillo S. 2009.** Acumulación de antocianinas en pericarpio y aleurona del grano y sus efectos genéticos en poblaciones criollas de maíz pigmentado. *Revista Fitotecnia Mexicana* 32(4): 303-309.

**Garzón, G. A. 2008.** Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. *Acta Biológica Colombiana* 13(3): 27-36.

**Giusti, M. M. and P. Jing. 2008.** Analysis of anthocyanins. *In: Food Colorants: Chemical and Functional Properties.* Socaciu C. (ed.). CRC Press LLC. USA. 480-497 pp.

**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.

**Goodman, M. M. and W. L. Brown. 1988.** Races of corn. *In: Corn and Corn Improvement.* Sprague G. F. y J. W. Dudley (eds.). 3rd Ed., vol. 18. USA. 33-79 pp.

**Grobman, A., W. Salhuana, R. Sevilla, P. C. Mangelsdorf. 1961.** Races of maize in Peru: their origin, evolution and classification. National Academy of Science. National Research Council. Publication 915. Washington D.C. USA. 374 p.

**Hagiwara, A., H. Yoshino, T. Ichiharam, M. Kawabe, S. Tamano, H. Aoki, T. Koda, M. Nakamura, K. Imaida, N. Ito, T. Shirai. 2002.** Prevention by natural food anthocyanins, purple sweet potato color and red cabbage color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5-b] pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in rats initiated with 1, 2-dimethylhydrazine. *The Journal of Toxicological Sciences* 27:57–68.

**He, J. and M. M. Giusti. 2010.** Anthocyanins: Natural colorants with health-promoting properties. *Annual Review of Food and Science and Technology* 1: 163-187.

**Hernández, M. A. 2003.** Estabilización de antocianinas extraídas de rosas rojas por medio de la copigmentación para su uso como colorantes naturales en la industria alimenticia y farmacéutica. Tesis de Licenciatura en Quimicofarmacobiología. Universidad de las Américas Puebla. Escuela de Ciencias Departamento de Química y Biología.

**Hye, K. K. and R. Verpoorte. 2010.** Sample preparation for plant metabolomics. *Phytochemical Analysis* 21: 4-13.

**Jing, P. and M. M. Giusti. 2005.** Characterization of anthocyanin-rich waste from purple corn cobs (*Zea mays* L.) and its application to color milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 8775–8781.

**Kamei, H., Y. Hashimoto, T. Koide, T. Kojima, M. Hasegawa. 1998.** Antitumor effect of methanol extracts from red and white wines. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* 13(6):447-52.

**Koide, T., H. Kamei, Y. Hashimoto, T. Kojima, M. Hasegawa. 1997.** Antitumor effect of anthocyanin fractions extracted from red soybeans and red beans *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* 12(4):277-280.

**Li, C. Y., H. W. Kim, S. R. Won, H. K. Min, K. J. Park, J. Y. Park, M. S. Ahn , H. I. Rhee. 2008.** Corn husk as a potential source of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(23): 114-136.

**María, R. A., 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(2): 101-107.

**Márquez, S. F., L. Sahagún C., J. A. Carrera V., E. Barrera G. 2000.** Retrocruzamiento limitado para el mejoramiento genético de maíces criollos. Universidad Autónoma Chapingo. 31 p.

**Mateus, N. and V. de Freitas. 2009.** Anthocyanins as food colorants. *In: Anthocyanins: Biosynthesis, Functions, and Applications.* Gould K., K. Davies, C. Winefield (eds.). Ed. Springer. New York. EUA. 283-298 pp.

**Mendoza, R. M. 2004.** Notas del Curso de Genotecnia Vegetal. Teoría y Práctica. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. 120 p.

**Mercadante, A. Z. and F. O. Bobbio. 2008.** Anthocyanins in Foods: Occurrence and Physicochemical Properties. *In: Food Colorants: Chemical and Functional Properties.* Socaciu C. (Ed.). CRC Press LLC. USA. 241-268 pp.

**Ming, J. M., L.S. Chia, N. K. Goh, T.F. Chia, R. Brouillard. 2003.** Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 64: 923-933.

**Miranda, C. S. 2000.** Mejoramiento genético del maíz en la época prehispánica. *Agricultura Técnica Mexicana* 26(1):3-15.

**Miyazawa, T., K. Nakagawa, M. Kudo, K. Muraishi, K. Someya. 1999.** Intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3,5-diglucoside, into rats and humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:1083-1091.

**Muñoz, O. A. 2003.** Centli-Maíz. Prehistoria e Historia, Diversidad, Potencial, Origen Genético y Geográfico. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco. México. 210 p.

**Ohgami, K., I. Ilieva, K. Shiratori, Y. Koyoma, XH. Jin, K. Yoshida. 2005.** Anti-inflammatory effects of aronia extract on rat endotoxin-induced uveitis. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 46:275-281.

**Ortega, R. A., J. Sánchez, F. Castillo G., J. M. Hernández. 1991.** Estado actual sobre los maíces nativos de México. *In: Avances en el Estudio de los Recursos Fitogenéticos de México.* Ortega, R., P. G. Palomino, F. Castillo G., V. González, M. Livera (eds.). SOMEFI, A. C. México. 161-196 pp.

**Ota, M. and M. Yokoyama. 2010.** Chemistry of cosmetics. *In: Comprehensive Natural Products II. Chemistry and Biology.* Mander, L. and H-W. Liu (eds.). Elsevier Ltd. 3: 317-349 pp.

**Otsuki, T., H. Matsufuji, M. Takeda, Y. Goda. 2002.** Acylated anthocyanins from red radish (*Raphanus sativus* L.). *Phytochemistry* 60(1): 79–87.

**Pajic, Z. 2007.** Breeding of maize types with specific traits at the Maize Research Institute, Zemun Polje. *Genetika* 39:169-180.

**Pazmiño, D. E. A., M. M. Giusti, R. E. Wrolstad, M. B. A. Glória. 2001.** Anthocyanins from banana bracts (*Musa X paradisiaca*) as potential food colorants. *Food Chemistry* 73:327-332.

**Perossini M., G. Guidi, S. Chiellini, D. Siravo. 1987.** Studio clinico sull'impeigo degli antocianisidi del mirtillo (Tegens) nel trattamento delle microangiopathi retiniche di ripo diabetico ed ipertensivo. *Ottal Clinical Ocular* 113:1173-1190.

**Prior, L. R. 2004.** Absorption and metabolism of anthocyanins: Potential Health Effects. *In: Phytochemicals Mechanisms of Action.* Meskin, M. S., W.R. Bidlack, A. J. Davies, D. S. Lewis, R. K. Randolph (eds.). CRC Press LLC. USA. 1-19 pp.

**Prior, L. R. and X. Wu. 2006.** Anthocyanins: Structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radical Research* 40(10):1014-1028.

**Quintero, H. C. M. 2004.** Efecto de la copigmentación sobre el color y estabilidad de pigmento en un sistema modelo (bebida), usando antocianina de rábano. Tesis de Licenciatura en Quimicofarmacobiología. Universidad de las Américas Puebla. Escuela de Ciencias Departamento de Química y Biología.

**Raghvendra, V. Sharma, A. Shakya, M. D. Hedaytullah, G. Shankar A., A. Mishra, A. Deo. G., A. P. Pachpute, D. Patel. 2011.** Chemical and potential aspects of anthocyanins- a water-soluble vacuolar flavonoid pigments: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 6(1): 28-33.

**Rodríguez, S. L. E., M. M. Giusti, R. E. Wrolstad. 1999.** Color and pigment stability of red radish and red-fleshed potato anthocyanins in juice model sytems. *Journal of Food Science* 64: 451–456.

**Ron, P. J., J. 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., J. G. Rodríguez F. 2006.** Maíces nativos del Occidente de México I. Colectas 2004. Scientia-CUCBA 8(1):1-39.

**Rooney, L. W., R. D. Waniska, C. M. McDonough, S. O. Serna S. 2004.** Tortillas. *In*: Encyclopedia of Grain Science. Wrigley C., H. Corke, C. Walker (eds.). Elsevier: Oxford, UK. Vol 3. 290-298 pp.

**Rooney, L. W., R. D. Waniska, C. M. McDonough, S. O. Serna S. 2004.** Tortillas. *In*: Encyclopedia of Grain Science. Wrigley C., H. Corke, C. Walker (eds.). Elsevier: Oxford, UK. Vol 3. 290-298 pp.

**Saito, N., F. Tatsuzawa, K. Yoda, M. Yokoi, K. Kasahara, S. Lida, A. Shigihara. T. Honda. 1995.** Acylated cyanidin glycosides in the violet-blue flowers of *Ipomoea purpurea*. Phytochemistry 40: 1283–1289.

**Salinas, M. Y, J. J. López R., G. B. González F., G. M. 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. 2000.** Antocianinas en granos de maíces criollos mexicanos. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 102 p.

**Salinas, M. Y., J. Soria R., E. Espinosa T. 2010.** Aprovechamiento y Distribución de Maíz Azul en el Estado de México. Folleto Técnico No. 42. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Valle de México, México. 50 p.

**Sánchez, F. L. E. 2004.** Evaluación de las características químicas y nutricionales de maíces de color cultivados en el estado de Puebla. Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología. Universidad de las Américas-Puebla. Escuela de Ciencias. Departamento de Química y Biología. 119 p.

**Sánchez, G. J. J., M. M. Goodman, C. W. Stuber. 2000.** Isozymatic and morphological diversity in the races of maize of Mexico. Economic Botany 54:43-59.

**Santacruz, V. A., M. P. Widrlechner K., E. Ziegler R., J. Salvador M. J., P. Millard, P. K. Bretting. 2004.** Phylogenetic relationships among north American popcorns and their evolutionary links to Mexican and south American popcorns. CropScience 44: 1456-1467.

**Shukitt, H. B., R. L. Galli, V. Meterko, A. Carey, D. F. Bielinski, T. Mcghie, J. A. Joseph. 2005.** Dietary supplementation with fruit polyphenolics ameliorates age-related deficits in behavior and neuronal markers of inflammation and oxidative stress. Age 27(1): 49-57.

- Soto, V. A., A. Gutiérrez, J. N. Losso, Z. Xu, J. Finley. 2012.** Evolution of phenolic compounds from color and flavor problems to health benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (27): 6658-6677.
- Stintzing, F. C., A. S. Stintzing, R. Carle, B. Frei, R. E. Wrolstad. 2002.** Color and antioxidant properties of cyaniding-based anthocyanin pigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 6172–6181.
- Tanaka, Y., N. Sasaki, A. Ohmiya. 2008.** Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal* 54:733–749.
- Teh, L. S. and F. J. Francis. 1988.** Stability of anthocyanins from *Zebrina pendula* and *Ipomoea tricolor* in a model beverage. *Journal of Food Science* 53:1580–1581.
- Terahara, N., T. Shimizu, Y. Kato, M. Nakamura, T. Maitani, M. Yamaguchi, A. Goda. 1999.** Six diacylated anthocyanins from the storage root of purple sweet potato, *Ipomoea batatas*. *Journal of Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 63:1420–1424.
- Tristan, F., B. Kraft, B. M. Schmidt, G. G. Yousef, C. T. G. Knigh, M. Cuendet. 2005.** Chemopreventive potential of wild lowbush blueberry fruits in multiple stages of carcinogenesis. *Journal of Food Science* 70(3):S159-S166.
- Tristan, F., D. Mould, R. B. D. Rogers, D. M. Ribnicky, W. T. Gipp, Cefaluo. 2008.** Phytochemical composition and metabolic performance-enhancing activity of dietary berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(3):654-660.
- Tsuda, T., F. Horio, K. Uchida, H. Aoki, T. Osawa. 2003.** Dietary cyanidin 3-O-beta-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. *The Journal of Nutrition* 133:2125–2130.
- Wang, S. Y. and H. Jiao. 2000.** Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:5677-5684.
- Wang, S. Y. and H. S. Lin. 2000.** Antioxidant activity in fruit and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry is affected by cultivar and maturity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:140-146.
- Wegener, J. W., J. C. Klammer, H. Govers, U. A. Th. Brinkman. 1987.** Determination of organic colorants in cosmetic products by High-Performance Liquid Chromatography. *Chromatographia* 24: 865-875.
- 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, Secretaria de Agricultura y Ganadería. México, D.F. 273 p.

- Wu, X., G. R. Beecher, J. M. Holden, D. B. Haytowitz, S. E. Gebhardt, R. L. Prior. 2006.** Concentration of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (11): 4069-4075.
- Yamasaki, M., S. I. Wright, M. D. McMullen. 2007.** Genomic screening for artificial selection during domestication and improvement in maize. *Annals of Botany* 100: 967-973.
- Yang, Z. and W. Zhai. 2010.** Identification and antioxidant activity of anthocyanins extracted from the seed and cob of purple corn (*Zea mays* L.). *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11:169-176.
- Yang, Z., G. Fan, Z. Gu, Y. Han, Z. Chen. 2008a.** Optimization extraction of anthocyanins from purple corn (*Zea mays* L.) cob using tristimulus colorimetry. *European Food Research Technology* 227:409–415.
- Yang, Z., Y. Han, Z. Gu, G. Fan, Z. Chen. 2008b.** Thermal degradation kinetics of aqueous anthocyanins and visual color of purple corn (*Zea mays* L.) cob. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9:341-347.
- Yang, Z., Z. Chen, S. Yuan, W. Zhai, X. Piao, X. Piao. 2009.** Extraction and identification of anthocyanin from purple corn (*Zea mays* L.) *International Journal of Food and Science and Technology* 44: 2485-2492.
- Zhao, X., C. Zhang, C. Guigas, Y. Ma, M. Corrales, B. Tauscher, X. Hu. 2009.** Composition, antimicrobial activity, and antiproliferative capacity of anthocyanin extracts of purple corn (*Zea mays* L.) from China. *European Food Research and Technology* 228: 759-765.

## APÉNDICE

**Cuadro A-1. Porcentaje de poblaciones pigmentadas que mostraron acumulación de antocianinas en cada muestreo y órgano estudiado, durante los ciclos del cultivo Primavera-Verano 2009 y 2010.**

Órgano	Porcentaje											
	Días después de la siembra											
	30	45	50	57	70	77	84	91	98	108	118	138
<b>Vainas foliares</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>Tallos</b>	0	0	0	88	88	88	88	88	88	88	88	88
<b>Láminas foliares</b>	25	25	50	50	63	63	63	63	63	63	63	63
<b>Espiga</b>	-	0	0	50	88	88	88	88	88	88	88	88
<b>Jilotes</b>	-	-	-	0	67	100	100	100	100	100	100	100
<b>Brácteas</b>	-	-	-	-	67	67	100	100	100	100	100	100
<b>Olote</b>	-	-	-	-	0	19	38	38	38	38	38	38
<b>Pedúnculo</b>	-	-	-	-	32	32	32	63	63	63	63	63
<b>Grano</b>	-	-	-	-	-	-	0	0	50	50	50	50

-: No se pudo separar al órgano de la planta porque en ese periodo no existía o porque aún era de dimensiones muy pequeñas.

**Cuadro A-2. Valores promedio de biomasa de los órganos de la planta de maíz en la interacción Poblaciones x Órganos de la planta. Montecillo, México. 2010.**

<b>Biomasa (g)</b>									
<b>Población</b>	<b>T</b>	<b>LF</b>	<b>VF</b>	<b>E</b>	<b>J</b>	<b>B</b>	<b>O</b>	<b>P</b>	<b>G</b>
<b>PP-GP</b>	85.8 <sup>b</sup>	42.6 <sup>de</sup>	27.3 <sup>gh</sup>	8.6 <sup>jk</sup>	1.7 <sup>k</sup>	26.7 <sup>gh</sup>	8.0 <sup>jk</sup>	2.8 <sup>k</sup>	41.1 <sup>de</sup>
<b>PP-GnP</b>	43.7 <sup>de</sup>	19.3 <sup>hi</sup>	16.4 <sup>ij</sup>	3.9 <sup>k</sup>	1.5 <sup>k</sup>	16.8 <sup>ij</sup>	8.6 <sup>jk</sup>	2.2 <sup>k</sup>	42.1 <sup>de</sup>
<b>PV-GP</b>	109.0 <sup>a</sup>	38.7 <sup>ef</sup>	30.3 <sup>fg</sup>	5.5 <sup>k</sup>	1.4 <sup>k</sup>	24.0 <sup>ghi</sup>	8.0 <sup>jk</sup>	4.0 <sup>k</sup>	49.6 <sup>cd</sup>
<b>PV-GnP</b>	53.1 <sup>c</sup>	27.1 <sup>gh</sup>	17.0 <sup>ij</sup>	3.7 <sup>k</sup>	1.2 <sup>k</sup>	18.4 <sup>hi</sup>	9.0 <sup>jk</sup>	4.6 <sup>k</sup>	45.6 <sup>cde</sup>
<b>DMS</b>	9.1								

Los valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Prueba de Tukey  $\alpha$ : 0.05); **PP-GP** = Planta pigmentada-grano pigmentado; **PP-GnP** = Planta pigmentada-grano no pigmentado; **PV-GP** = Planta verde-grano pigmentado; **PV-GnP** = Planta verde-grano no pigmentado; **T** = Tallo; **LF** = Láminas foliares; **VF** = Vainas foliares; **E** = Espiga, **J** = Jilote inferiores; **B** = Brácteas de la mazorca; **O** = Olote; **P** = Pedúnculo; **G** = Grano. **DMS** = Diferencia mínima significativa.

**Cuadro A-3. Valores promedio del contenido de antocianinas totales en la interacción Poblaciones x Órganos de la planta x Muestreos. Montecillo, México. 2010.**

		AT (g·100 g <sup>-1</sup> )								
Población	Muestreo	T	LF	VF	E	J	B	O	P	G
PP-GP	98 dds	0.016 <sup>t</sup>	0.030 <sup>t</sup>	1.371 <sup>a</sup>	0.585 <sup>efghij</sup>	0.661 <sup>e</sup>	0.897 <sup>c</sup>	0.428 <sup>mno</sup>	0.044 <sup>t</sup>	0.017 <sup>t</sup>
	108 dds	0.026 <sup>t</sup>	0.029 <sup>t</sup>	0.555 <sup>hijkl</sup>	0.566 <sup>fghijk</sup>	0.600 <sup>efghi</sup>	0.931 <sup>c</sup>	0.471 <sup>lmn</sup>	0.420 <sup>mno</sup>	0.009 <sup>t</sup>
	118 dds	0.027 <sup>t</sup>	0.411 <sup>no</sup>	0.585 <sup>efghij</sup>	0.489 <sup>klmn</sup>	0.652 <sup>efg</sup>	0.784 <sup>d</sup>	0.628 <sup>efgh</sup>	0.035 <sup>t</sup>	0.020 <sup>t</sup>
	138 dds	0.017 <sup>t</sup>	0.028 <sup>t</sup>	0.346 <sup>opqr</sup>	0.024 <sup>t</sup>	0.355 <sup>opq</sup>	0.555 <sup>hijkl</sup>	0.373 <sup>op</sup>	0.021 <sup>t</sup>	0.008 <sup>t</sup>
PP-GnP	98 dds	0.021 <sup>t</sup>	0.034 <sup>t</sup>	0.531 <sup>ijkl</sup>	0.491 <sup>klmn</sup>	0.604 <sup>efghi</sup>	0.788 <sup>d</sup>	0.527 <sup>ijkl</sup>	0.025 <sup>t</sup>	0.006 <sup>t</sup>
	108 dds	0.021 <sup>t</sup>	0.264 <sup>qrs</sup>	1.380 <sup>a</sup>	0.506 <sup>ijklm</sup>	0.625 <sup>efgh</sup>	1.065 <sup>b</sup>	0.543 <sup>hijkl</sup>	0.314 <sup>pqrs</sup>	0.004 <sup>t</sup>
	118 dds	0.033 <sup>t</sup>	0.260 <sup>rs</sup>	1.068 <sup>b</sup>	0.532 <sup>ijkl</sup>	0.562 <sup>ghijkl</sup>	1.093 <sup>b</sup>	0.657 <sup>ef</sup>	0.248 <sup>s</sup>	0.004 <sup>t</sup>
	138 dds	0.036 <sup>t</sup>	0.023 <sup>t</sup>	0.435 <sup>mno</sup>	0.028 <sup>t</sup>	0.011 <sup>t</sup>	0.754 <sup>d</sup>	0.539 <sup>hijkl</sup>	0.057 <sup>t</sup>	0.004 <sup>t</sup>
PV-GP	98 dds	0.006 <sup>t</sup>	0.032 <sup>t</sup>	0.009 <sup>t</sup>	0.008 <sup>t</sup>	0.014 <sup>t</sup>	0.012 <sup>t</sup>	0.006 <sup>t</sup>	0.005 <sup>t</sup>	0.012 <sup>t</sup>
	108 dds	0.006 <sup>t</sup>	0.022 <sup>t</sup>	0.012 <sup>t</sup>	0.008 <sup>t</sup>	0.010 <sup>t</sup>	0.010 <sup>t</sup>	0.005 <sup>t</sup>	0.005 <sup>t</sup>	0.009 <sup>t</sup>
	118 dds	0.006 <sup>t</sup>	0.022 <sup>t</sup>	0.009 <sup>t</sup>	0.010 <sup>t</sup>	0.009 <sup>t</sup>	0.008 <sup>t</sup>	0.006 <sup>t</sup>	0.006 <sup>t</sup>	0.011 <sup>t</sup>
	138 dds	0.006 <sup>t</sup>	0.000 <sup>t</sup>	0.013 <sup>t</sup>	0.006 <sup>t</sup>	0.007 <sup>t</sup>	0.010 <sup>t</sup>	0.006 <sup>t</sup>	0.007 <sup>t</sup>	0.013 <sup>t</sup>
PV-GnP	98 dds	0.008 <sup>t</sup>	0.017 <sup>t</sup>	0.009 <sup>t</sup>	0.017 <sup>t</sup>	0.007 <sup>t</sup>	0.007 <sup>t</sup>	0.007 <sup>t</sup>	0.005 <sup>t</sup>	0.006 <sup>t</sup>
	108 dds	0.006 <sup>t</sup>	0.029 <sup>t</sup>	0.009 <sup>t</sup>	0.009 <sup>t</sup>	0.007 <sup>t</sup>	0.006 <sup>t</sup>	0.006 <sup>t</sup>	0.005 <sup>t</sup>	0.004 <sup>t</sup>
	118 dds	0.005 <sup>t</sup>	0.012 <sup>t</sup>	0.009 <sup>t</sup>	0.010 <sup>t</sup>	0.014 <sup>t</sup>	0.005 <sup>t</sup>	0.006 <sup>t</sup>	0.005 <sup>t</sup>	0.005 <sup>t</sup>
	138 dds	0.008 <sup>t</sup>	0.000 <sup>t</sup>	0.012 <sup>t</sup>	0.006 <sup>t</sup>	0.008 <sup>t</sup>	0.006 <sup>t</sup>	0.007 <sup>t</sup>	0.012 <sup>t</sup>	0.005 <sup>t</sup>
<b>DMS</b>		0.092567								

Los valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Prueba de Tukey  $\alpha$ : 0.05); **PP-GP** = Planta pigmentada-grano pigmentado; **PP-GnP** = Planta pigmentada-grano no pigmentado; **PV-GP** = Planta verde-grano pigmentado; **PV-GnP** = Planta verde-grano no pigmentado; **T** = Tallo; **LF** = Láminas foliares; **VF** = Vainas foliares; **E** = Espiga, **J** = Jilote inferiores; **B** = Brácteas de la mazorca; **O** = Olote; **P** = Pedúnculo; **G** = Grano. **DMS** = Diferencia mínima significativa.

**Cuadro A-4. Valores promedio de la biomasa de los órganos de la planta de maíz en la interacción Poblaciones x Órganos de la planta x Muestreos. Montecillo, México. 2010.**

Biomasa (g)											
Población	Muestreo	T	LF	VF	E	J	B	O	P	G	g planta <sup>-1</sup>
<b>PP-GP</b>	98 dds	72.93 <sup>gh</sup>	34.34 <sup>nopq</sup>	25.90 <sup>qrst</sup>	10.57 <sup>vx</sup>	1.45 <sup>y</sup>	23.84 <sup>rst</sup>	5.80 <sup>y</sup>	2.30 <sup>y</sup>	6.73 <sup>y</sup>	183.9
	108 dds	86.63 <sup>def</sup>	38.46 <sup>mno</sup>	28.77 <sup>pqrs</sup>	8.39 <sup>xy</sup>	1.64 <sup>y</sup>	30.49 <sup>opqr</sup>	6.85 <sup>y</sup>	2.98 <sup>y</sup>	21.59 <sup>rstu</sup>	225.8
	118 dds	100.50 <sup>c</sup>	51.80 <sup>jkl</sup>	30.20 <sup>opqr</sup>	7.74 <sup>y</sup>	2.15 <sup>y</sup>	26.96 <sup>pqrst</sup>	8.80 <sup>xy</sup>	3.00 <sup>y</sup>	47.94 <sup>klm</sup>	279.1
	138 dds	83.00 <sup>defg</sup>	31.02 <sup>opqr</sup>	21.95 <sup>rstu</sup>	5.72 <sup>y</sup>	1.46 <sup>y</sup>	24.34 <sup>qrst</sup>	10.86 <sup>vx</sup>	2.93 <sup>y</sup>	88.12 <sup>de</sup>	269.4
<b>PP-GnP</b>	98 dds	39.33 <sup>mno</sup>	19.02 <sup>stuv</sup>	16.77 <sup>tuvx</sup>	4.84 <sup>y</sup>	0.62 <sup>y</sup>	14.92 <sup>uvx</sup>	6.80 <sup>y</sup>	1.44 <sup>y</sup>	14.19 <sup>uvx</sup>	117.9
	108 dds	53.52 <sup>jkl</sup>	18.50 <sup>stuvx</sup>	16.76 <sup>tuvx</sup>	4.14 <sup>y</sup>	1.47 <sup>y</sup>	17.19 <sup>tuvx</sup>	8.82 <sup>xy</sup>	1.94 <sup>y</sup>	23.85 <sup>rst</sup>	146.2
	118 dds	62.05 <sup>ij</sup>	21.66 <sup>rstu</sup>	19.24 <sup>stuv</sup>	3.21 <sup>y</sup>	2.28 <sup>y</sup>	22.27 <sup>rstu</sup>	9.24 <sup>xy</sup>	3.18 <sup>y</sup>	50.73 <sup>kl</sup>	193.9
	138 dds	19.89 <sup>stuv</sup>	17.06 <sup>tuvx</sup>	11.91 <sup>vx</sup>	2.45 <sup>y</sup>	1.31 <sup>y</sup>	12.67 <sup>vx</sup>	9.50 <sup>xy</sup>	1.50 <sup>y</sup>	79.80 <sup>efg</sup>	156.1
<b>PV-GP</b>	98 dds	100.62 <sup>c</sup>	36.42 <sup>nop</sup>	30.29 <sup>opqr</sup>	9.35 <sup>xy</sup>	0.97 <sup>y</sup>	23.29 <sup>rstu</sup>	6.19 <sup>y</sup>	3.57 <sup>y</sup>	21.31 <sup>rstu</sup>	232.0
	108 dds	117.98 <sup>b</sup>	35.46 <sup>nop</sup>	34.43 <sup>nopq</sup>	7.05 <sup>y</sup>	1.15 <sup>y</sup>	22.19 <sup>rstu</sup>	7.79 <sup>y</sup>	4.34 <sup>y</sup>	37.12 <sup>nop</sup>	267.5
	118 dds	130.08 <sup>a</sup>	43.28 <sup>lmn</sup>	35.34 <sup>nop</sup>	3.45 <sup>y</sup>	2.34 <sup>y</sup>	34.26 <sup>nopq</sup>	8.51 <sup>xy</sup>	5.30 <sup>y</sup>	57.48 <sup>ijk</sup>	320.0
	138 dds	90.40 <sup>cd</sup>	0.00 <sup>y</sup>	22.64 <sup>rstu</sup>	2.59 <sup>y</sup>	1.18 <sup>y</sup>	16.07 <sup>uvx</sup>	9.50 <sup>xy</sup>	2.90 <sup>y</sup>	82.55 <sup>defg</sup>	227.8
<b>PV-GnP</b>	98 dds	35.19 <sup>nop</sup>	23.49 <sup>rstu</sup>	14.45 <sup>uvx</sup>	5.79 <sup>y</sup>	0.64 <sup>y</sup>	12.70 <sup>vx</sup>	6.72 <sup>y</sup>	1.97 <sup>y</sup>	20.26 <sup>stuv</sup>	121.2
	108 dds	55.00 <sup>jk</sup>	23.21 <sup>rstu</sup>	17.54 <sup>tuvx</sup>	3.70 <sup>y</sup>	1.57 <sup>y</sup>	19.07 <sup>stuv</sup>	8.41 <sup>xy</sup>	4.81 <sup>y</sup>	37.40 <sup>no</sup>	170.7
	118 dds	67.23 <sup>hi</sup>	34.66 <sup>nopq</sup>	19.39 <sup>stuv</sup>	2.79 <sup>y</sup>	0.64 <sup>y</sup>	23.87 <sup>rst</sup>	10.44 <sup>vxy</sup>	6.68 <sup>y</sup>	48.32 <sup>klm</sup>	214.0
	138 dds	54.81 <sup>jk</sup>	0.00 <sup>y</sup>	16.53 <sup>tuvx</sup>	2.47 <sup>y</sup>	1.80 <sup>y</sup>	18.03 <sup>tuvx</sup>	10.43 <sup>vxy</sup>	4.88 <sup>y</sup>	76.50 <sup>fgh</sup>	185.5
<b>DMS</b>											10.42

Los valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Prueba de Tukey  $\alpha$ : 0.05); **PP-GP** = Planta pigmentada-grano pigmentado; **PP-GnP** = Planta pigmentada-grano no pigmentado; **PV-GP** = Planta verde-grano pigmentado; **PV-GnP** = Planta verde-grano no pigmentado; **T** = Tallo; **LF** = Láminas foliares; **VF** = Vainas foliares; **E** = Espiga, **J** = Jilote inferiores; **B** = Brácteas de la mazorca; **O** = Olote; **P** = Pedúnculo; **G** = Grano. **DMS** = Diferencia mínima significativa.

**Cuadro A-5. Valores promedio del contenido de antocianinas totales en la interacción Poblaciones x Órganos de la planta x Muestreos. Montecillo, México. 2010.**

Población	Muestreo	AT - órgano (g)								
		T	LF	VF	E	J	B	O	P	G
PP-GP	98 dds	0.012 <sup>pq</sup>	0.010 <sup>pq</sup>	0.352 <sup>a</sup>	0.0618 <sup>jk</sup>	0.00962 <sup>pq</sup>	0.215 <sup>d</sup>	0.0228 <sup>nopq</sup>	0.0009 <sup>q</sup>	0.0011 <sup>q</sup>
	108 dds	0.024 <sup>lmnopq</sup>	0.011 <sup>pq</sup>	0.162 <sup>fg</sup>	0.0473 <sup>klm</sup>	0.01004 <sup>pq</sup>	0.308 <sup>b</sup>	0.0323 <sup>lmnop</sup>	0.0122 <sup>opq</sup>	0.0012 <sup>q</sup>
	118 dds	0.027 <sup>lmnop</sup>	0.216 <sup>d</sup>	0.177 <sup>f</sup>	0.0379 <sup>lmn</sup>	0.01402 <sup>opq</sup>	0.211 <sup>d</sup>	0.0555 <sup>kl</sup>	0.0011 <sup>q</sup>	0.0097 <sup>pq</sup>
	138 dds	0.015 <sup>opq</sup>	0.009 <sup>q</sup>	0.082 <sup>ij</sup>	0.0014 <sup>q</sup>	0.00581 <sup>q</sup>	0.147 <sup>g</sup>	0.0373 <sup>lmn</sup>	0.0005 <sup>q</sup>	0.0071 <sup>q</sup>
PP-GnP	98 dds	0.008 <sup>q</sup>	0.006 <sup>q</sup>	0.089 <sup>i</sup>	0.0237 <sup>nopq</sup>	0.00364 <sup>q</sup>	0.114 <sup>h</sup>	0.0359 <sup>lmno</sup>	0.0004 <sup>q</sup>	0.0009 <sup>q</sup>
	108 dds	0.011 <sup>pq</sup>	0.041 <sup>klmn</sup>	0.232 <sup>c</sup>	0.0208 <sup>nopq</sup>	0.00917 <sup>pq</sup>	0.184 <sup>ef</sup>	0.0477 <sup>klm</sup>	0.0036 <sup>q</sup>	0.0011 <sup>q</sup>
	118 dds	0.021 <sup>nopq</sup>	0.052 <sup>kl</sup>	0.206 <sup>de</sup>	0.0171 <sup>opq</sup>	0.01295 <sup>opq</sup>	0.246 <sup>c</sup>	0.0606 <sup>jk</sup>	0.0064 <sup>q</sup>	0.0022 <sup>q</sup>
	138 dds	0.007 <sup>q</sup>	0.004 <sup>q</sup>	0.052 <sup>kl</sup>	0.0007 <sup>q</sup>	0.00015 <sup>q</sup>	0.097 <sup>hi</sup>	0.0512 <sup>kl</sup>	0.0009 <sup>q</sup>	0.0036 <sup>q</sup>
PV-GP	98 dds	0.006 <sup>q</sup>	0.012 <sup>pq</sup>	0.002 <sup>q</sup>	0.0008 <sup>q</sup>	0.00013 <sup>q</sup>	0.003 <sup>q</sup>	0.0004 <sup>q</sup>	0.0002 <sup>q</sup>	0.0025 <sup>q</sup>
	108 dds	0.008 <sup>q</sup>	0.008 <sup>q</sup>	0.004 <sup>q</sup>	0.0006 <sup>q</sup>	0.00016 <sup>q</sup>	0.002 <sup>q</sup>	0.0004 <sup>q</sup>	0.0002 <sup>q</sup>	0.0034 <sup>q</sup>
	118 dds	0.008 <sup>q</sup>	0.010 <sup>pq</sup>	0.003 <sup>q</sup>	0.0003 <sup>q</sup>	0.00021 <sup>q</sup>	0.003 <sup>q</sup>	0.0005 <sup>q</sup>	0.0003 <sup>q</sup>	0.0064 <sup>q</sup>
	138 dds	0.006 <sup>q</sup>	0.000 <sup>q</sup>	0.003 <sup>q</sup>	0.0001 <sup>q</sup>	0.00009 <sup>q</sup>	0.002 <sup>q</sup>	0.0006 <sup>q</sup>	0.0002 <sup>q</sup>	0.0108 <sup>pq</sup>
PV-GnP	98 dds	0.003 <sup>q</sup>	0.004 <sup>q</sup>	0.001 <sup>q</sup>	0.0010 <sup>q</sup>	0.00005 <sup>q</sup>	0.001 <sup>q</sup>	0.0004 <sup>q</sup>	0.0001 <sup>q</sup>	0.0012 <sup>q</sup>
	108 dds	0.004 <sup>q</sup>	0.007 <sup>q</sup>	0.002 <sup>q</sup>	0.0003 <sup>q</sup>	0.00012 <sup>q</sup>	0.001 <sup>q</sup>	0.0005 <sup>q</sup>	0.0002 <sup>q</sup>	0.0017 <sup>q</sup>
	118 dds	0.003 <sup>q</sup>	0.004 <sup>q</sup>	0.002 <sup>q</sup>	0.0003 <sup>q</sup>	0.00010 <sup>q</sup>	0.001 <sup>q</sup>	0.0006 <sup>q</sup>	0.0003 <sup>q</sup>	0.0022 <sup>q</sup>
	138 dds	0.004 <sup>q</sup>	0.000 <sup>q</sup>	0.002 <sup>q</sup>	0.0001 <sup>q</sup>	0.00014 <sup>q</sup>	0.001 <sup>q</sup>	0.0007 <sup>q</sup>	0.0006 <sup>q</sup>	0.0036 <sup>q</sup>
<b>DMS</b>		0.023835								

Los valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Prueba de Tukey  $\alpha$ : 0.05); **AT-órgano<sup>-1</sup>** = Antocianinas totales por órgano; **PP-GP** = Planta pigmentada-grano pigmentado; **PP-GnP** = Planta pigmentada-grano no pigmentado; **PV-GP** = Planta verde-grano pigmentado; **PV-GnP** = Planta verde-grano no pigmentado; **T** = Tallo; **LF** = Láminas foliares; **VF** = Vainas foliares; **E** = Espiga; **J** = Jilote inferiores; **B** = Brácteas de la mazorca; **O** = Olote; **P** = Pedúnculo; **G** = Grano. **DMS** = Diferencia mínima significativa.

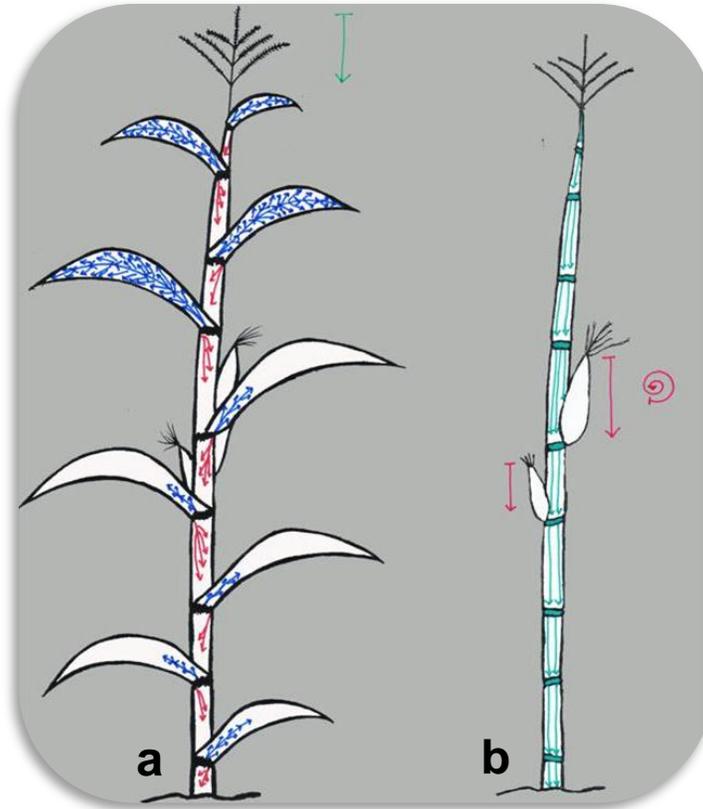


Figura 1 A. Sentido en el que se presenta la acumulación de antocianinas en los órganos de la planta de maíz pigmentado. a) Las flechas rojas indican el sentido de acumulación en las vainas foliares, las flechas azules en las láminas foliares y la flecha verde en la espiga. b) Las flechas rojas indican el sentido de la acumulación de antocianinas en los jilotes y las brácteas, mientras que las flechas verdes señalan el sentido de la acumulación de antocianinas en el tallo.

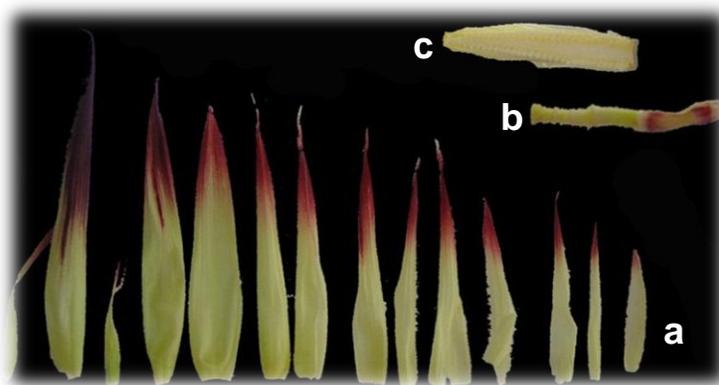


Figura 2 A. Jilote superior de una población de maíz pigmentado que a los 70 días después de la siembra se conforma por a) brácteas, b) pedúnculo y c) olote, el cual en este momento es el único órgano de los mencionados que no ha iniciado la acumulación de antocianinas.



**Figura 3 A. Fenotipos de las poblaciones evaluadas a 84 días después de la siembra durante los ciclos Primavera-Verano 2009 y 2010.**

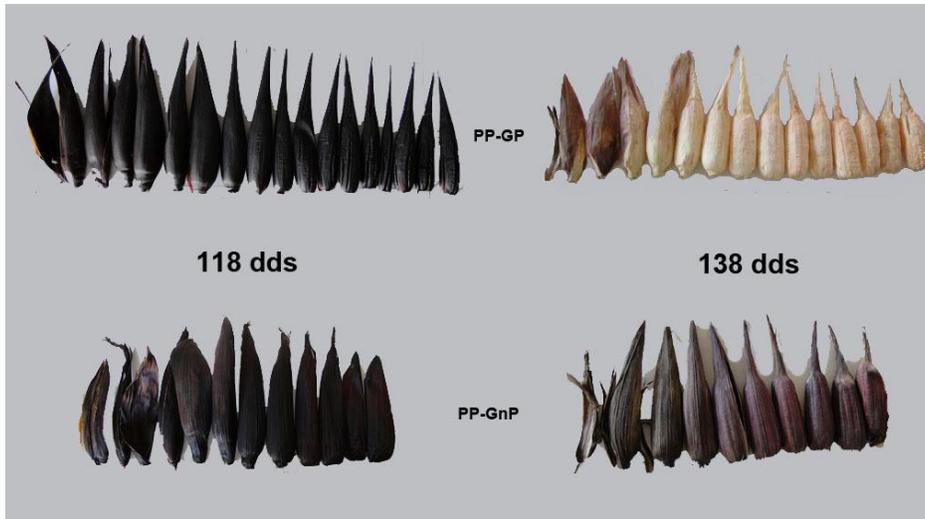


Figura 4 A. Cambios en la intensidad de la pigmentación en las brácteas del jilote superior de poblaciones con planta pigmentada (PP) con y sin grano pigmentado (GP y GnP) a 118 y 138 días después de la siembra.

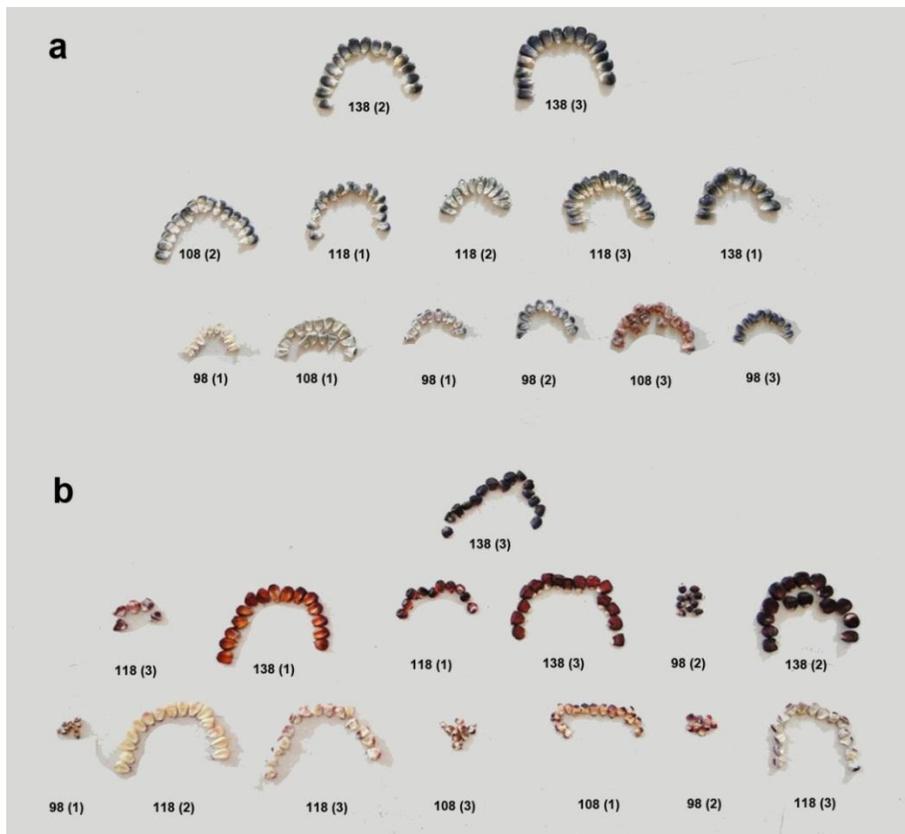
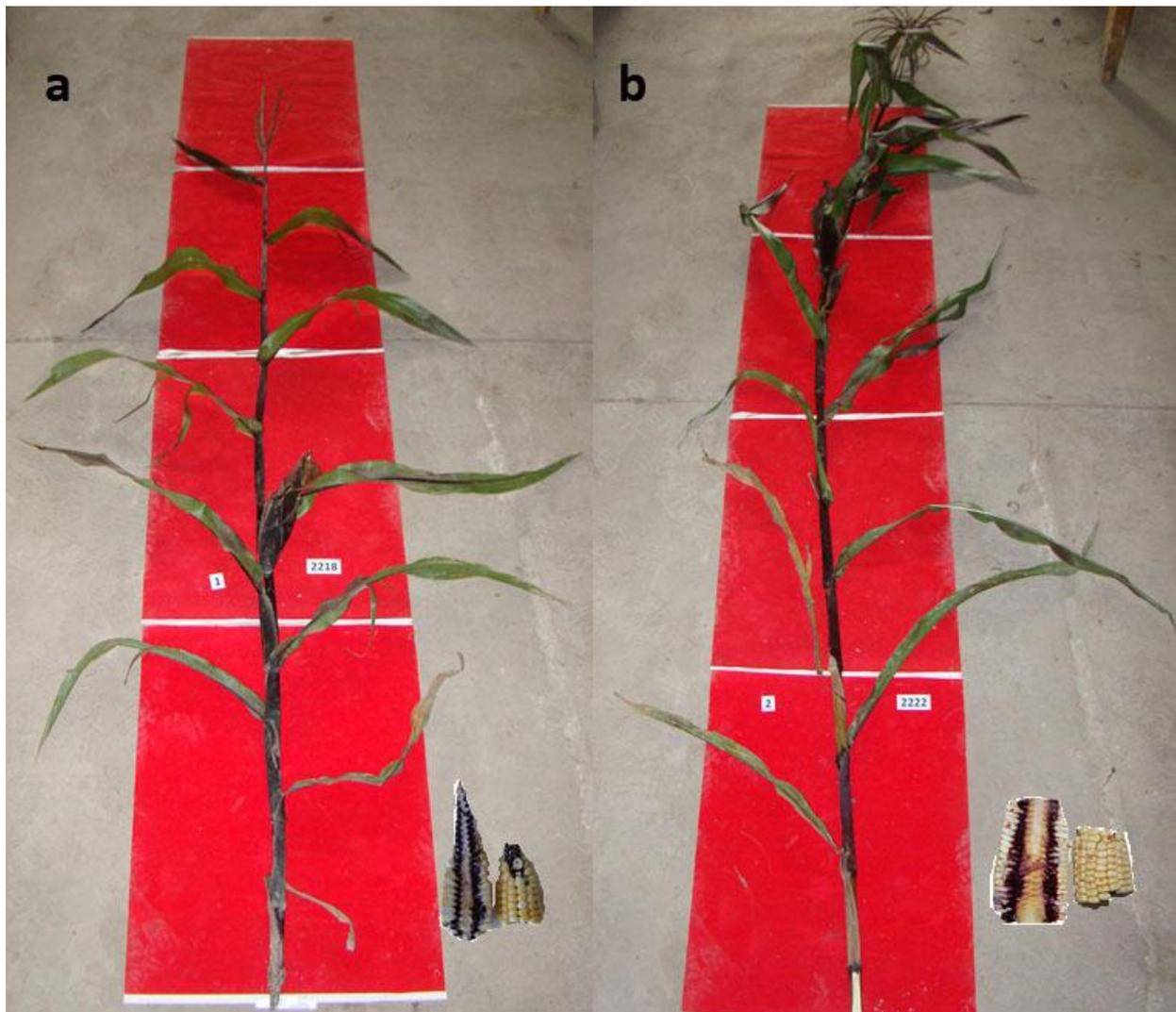


Figura 5 A. Tonalidades del color de grano en a) Población de planta pigmentada-grano pigmentado y b) Población de planta verde-grano pigmentado obtenidos a 98, 108, 118 y 138 días después de la siembra. El número entre paréntesis corresponde a la repetición.



**Figura 6 A. Poblaciones pigmentadas a 118 días después de la siembra en estado masoso-lechoso del grano. a) Población de planta pigmentada grano no pigmentado; b) Población de planta pigmentada-grano pigmentado.**