



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

---

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS  
CAMPUS MONTECILLO  
PROGRAMA DE POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
GENÉTICA

## EXPLORACIÓN DE MAÍCES AZULES PARA MEJORAMIENTO DE LA BASE GENÉTICA DE LOS MATERIALES CULTIVADOS EN LOS VALLES ALTOS DE MÉXICO

JUAN DE DIOS HERNÁNDEZ QUINTERO

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS


MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2017

## **CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN**

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe **Juan de Dios Hernández Quintero**, Alumno de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor **Serafin Cruz Izquierdo** por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **Exploración de maíces azules para mejoramiento de la base genética de los materiales cultivados en los valles altos de México** y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 23 de Noviembre del 2017



Juan de Dios Hernández Quintero

Firma del Alumno



Serafin Cruz Izquierdo

Vo. Bo. Del Consejero o Director de Tesis

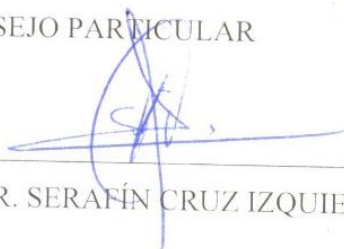
La presente tesis titulada: “**Exploración de maíces azules para mejoramiento de la base genética de los materiales cultivados en los Valles Altos de México**”, realizada por el alumno: **Juan de Dios Hernández Quintero**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
GENÉTICA**

**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DR. SERAFÍN CRUZ IZQUIERDO

ASESORA:



DRA. SARAH HEARNE

ASESOR:

DR. AMALIO SANTACRUZ VARELA

ASESOR:



DR. RICARDO LOBATO ORTIZ

ASESOR:



DR. TERENCE MOLNAR

ASESOR:



DR. MANUEL HUMBERTO REYES VALDÉS

ASESOR:



DR. JUAN MANUEL HERNÁNDEZ CASILLAS

Montecillo, Texcoco, Estado de México, noviembre de 2017

# EXPLORACIÓN DE MAÍCES AZULES PARA MEJORAMIENTO DE LA BASE GENÉTICA DE LOS MATERIALES CULTIVADOS EN LOS VALLES ALTOS DE MÉXICO

Juan de Dios Hernández Quintero, M. en C.  
Colegio de Postgraduados, 2017

## RESUMEN

Con el propósito de aprovechar los enormes recursos genéticos presentes en los bancos de germoplasma ubicados en el CIMMYT y el INIFAP en beneficio de todos los productores nacionales de maíz se realizaron dos experimentos para evaluar el contenido de antocianinas, así como, evaluar la estructura y diversidad genética de una colección de accesiones de maíz azul (*Zea mays* L.) provenientes de las instituciones antes mencionadas. En el primer experimento se evaluaron 554 muestras pertenecientes a 24 razas de maíz pigmentado que fueron utilizadas en el desarrollo y validación de modelos matemáticos para la estimación del contenido de antocianinas por espectroscopía de infra-rojo cercano (NIR), a través de la espectroscopía de UV-Vis como método de referencia. Se determinó el perfil de antocianinas mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los más altos contenidos de antocianinas se encontraron en muestras de grano de maíz C11-IXT de Tlaxcala, con hasta 1989.9  $\mu\text{g Pel g}^{-1}$  PS. Los mayores porcentajes de cianidina 3-glucósido, pelargonidina 3-glucósido y peonidina 3-glucósido fueron 48.79 %, 39.84 % y 12.14 %, respectivamente. El segundo experimento consistió en la evaluación de una colección de 150 accesiones de maíz azul pertenecientes a 16 razas de maíz azul. Se identificaron mediante la plataforma DArTseq un total de 235 580 alelos con un promedio de alelos efectivos por locus de 1,241. Los índices de diversidad genética obtenidos mostraron un rango de  $He$  de 0.0000174 a 0.5 (media 0.1498) y un rango de 0.0001587 a 1.0 para  $Sh$  (media 0.3467). El coeficiente de endogamia promedio obtenido fue de - 5.1220 y la matriz de distancias genéticas tuvo un promedio de 0.2317, un valor mínimo de 0.1367 y un máximo de 0.2725 entre las accesiones de la colección. El análisis de agrupamiento presentó un coeficiente de aglomeración de 0.86, lo que indica una fuerte conexión de la agrupación mostrando la integración de cuatro grupos ( $k = 4$ ) formados de la siguiente manera: Grupo 1 con 66 accesiones, Grupo 2 con tres accesiones, Grupo 3 con 16 accesiones y Grupo 4 con 65 accesiones. La prueba de Mantel

presento una baja correlación ( $R = 0.1121$ ,  $P = 0.021$ ) entre distancias genéticas y geográficas lo que podría indicar la probable existencia de un patrón de aislamiento por distancia, lo que sugiere que la divergencia en la colección no es causada por el aislamiento geográfico de las colecciones. La información obtenida de este trabajo nos permitió identificar a la accesión BOZM342 procedente del CIMMYT como un material con un contenido destacado de cianidina 3-glucósido, que fue de  $628.32 \mu\text{g g}^{-1}$  PS lo que la hace un material de interés para direccionar a un programa de pre-mejoramiento. Por otra parte, de los 32 modelos de calibración analizados para NIR destacaron dos, con altos coeficientes de determinación para la validación cruzada (0.64 y 0.65). Los modelos de NIR presentados en este trabajo se pueden utilizar para la determinación de antocianinas totales y apoyar a los programas de mejoramiento de maíces azules. Para el caso de la segunda parte del trabajo se identificó una amplia diversidad genética entre las 150 accesiones de maíz pigmentado estudiadas, según lo indicado por los parámetros genéticos estimado. Los resultados indican una alta estructura genética y la presencia de accesiones con una estructura genética compleja, con las razas Azul, Cónico, Elotero de Sinaloa, Elotes Cónicos, Tepecintle y Tuxpeño agrupadas en diferentes conglomerados. Hubo baja correlación entre las matrices de distancia geográfica y genética, lo que implica la falta de aislamiento por la distancia y sugiere un flujo continuo de genes entre los sitios donde se realizaron las colecciones, produciendo una estructura genética compleja.

**Palabras clave:** *Zea mays*, antocianinas, HPLC, maíz pigmentado, NIR, diversidad genética, distancias genéticas y geográficas.

EXPLORACIÓN DE MAÍCES AZULES PARA MEJORAMIENTO DE LA BASE  
GENÉTICA DE LOS MATERIALES CULTIVADOS EN LOS VALLES ALTOS DE  
MÉXICO

Juan de Dios Hernández Quintero, M. en C.  
Colegio de Postgraduados, 2017

**ABSTRACT**

In order to take advantage of the vast genetic resources present in germplasm banks located at CIMMYT and INIFAP in benefit of all national producers of maize, two experiments were conducted to evaluate the content of anthocyanins, as well as, to evaluate the structure and genetic diversity of a collection of blue maize accessions (*Zea mays* l.) from the aforementioned institutions. In the first experiment 554 samples belonging to 24 races of pigmented maize were evaluated and in the validation of mathematical models for the estimation of the anthocyanin content by near infrared spectroscopy (NIR), to through spectroscopy UV-Vis as reference method. It was determined the profile of anthocyanins by means of liquid chromatography high resolution (HPLC). The highest anthocyanin contents were found in C11-IXT maize grain samples from Tlaxcala; samples contained up to  $1989.97 \mu\text{g Pel g}^{-1} \text{ DW}$ . The highest percentages of cyanidin 3-glucoside, pelargonidin 3-glucoside and peonidin 3-glucoside were 48.79 %, 39.84 % and 12.14 %, respectively. The second experiment consisted in the evaluation of a collection of 150 blue maize accessions belonging to 16 races of blue corn. A total of 235 580 alleles were identified by the DArTseq platform with an average of effective alleles per locus of 1.241. Obtained genetic diversity indices obtained showed a range of *He* 0.0000174 to 0.5 (average 0.1498) and a range of 0.0001587 to 1.0 for *Sh* (average 0.3467). The retrieved average inbreeding coefficient was - 5.1220 and genetic distance matrix had an average of 0.2317, a minimum value of 0.1367 and a maximum of 0.2725 among the accessions in the collection. The cluster analysis presented a coefficient of agglomeration of 0.86, indicating a strong connection from the group showing the integration of four groups ( $k = 4$ ) formed in the following way: Group 1 with 66 accessions, Group 2 with three accessions, Group 3 with 16 accessions and Group 4 with 65 accessions. The Mantel test presented a low correlation ( $R = 0.1121$ ,  $P = 0.021$ ) between genetic and geographic distances which could indicate the probable existence of a

pattern of isolation by distance, which suggests that the divergence in the collection is not caused by geographic isolation of the Collections. The information obtained from this study allowed us to identify the accession BOZM342 from CIMMYT as a material with a featured content of cyanidin 3-glucoside, which was  $628.32 \mu\text{g g}^{-1}$  PS making it a material of interest to direct a pre-breeding program. On the other hand, of the 32 calibration models analyzed for NIR highlighted two, with high coefficients of determination for the validation cross (0.64 and 0.65). NIR models presented in this paper can be used for the determination of total anthocyanins and support blue maize breeding programs. The second part of this research was able to identify a wide genetic diversity among the 150 pigmented maize accessions studied, as indicated by the estimated genetic parameters. The results indicate a high genetic structure and the presence of accessions with a complex genetic structure, with the races Azul, Cónico, Elotero de Sinaloa, Elotes Cónicos, Tepecintle and Tuxpeño grouped in different clusters. There was a low correlation between genetic and geographic distance matrices, which implies the lack of isolation by distance, and suggests a continuous flow of genes between the sites where the collections were producing a complex genetic structure.

**Key words:** *Zea mays*, anthocyanins, HPLC, pigmented maize, NIR, genetic diversity, genetic and geographical distances.

## AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados, que mediante el Dr. Serafín Cruz Izquierdo fui recibido y aconsejado desde mi llegada a esta institución en la cual he pasado una de las etapas más importantes de mi vida.

Al Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) y al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) que mediante al asesoramiento y supervisión de la Dra. Sarah Hearne y el Dr. Terence Molnar me permitieron participar en el programa MasAgro en la descripción de la diversidad genética de la colección de maíces azules.

A mis asesores Dra. Sarah Hearne, Dr. Amalio Santacruz Varela, Dr. Ricardo Lobato Ortiz, Dr. Terence Molnar, Dr. Manuel Humberto Reyes Valdés, Dr. Juan Manuel Hernández por sus sugerencias, observaciones y por brindarme su tiempo en el presente trabajo lo que agradezco sinceramente.

A la Dra. Natalia Palacios Rojas y a su equipo conformado por Alejandra Miranda Piliado, Aidé Molina Macedo y Aldo Rosales Nolasco por sus consejos y apoyo para la determinación del contenido de antocianinas y la publicación de la información.

A la Dra. Martha Willcox, al Dr. Terence Molnar y a todo el equipo involucrado en hacer polinizaciones a mano para formar el material usado en el experimento en las estaciones experimentales del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Productores de Semillas de Copándaro e Investigación y Capacitación Agropecuaria (ICAMEX)

Al CONACYT por el apoyado en la beca de doctorado en el Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad - Genética (COLPOS, Campus Montecillo).



A mis grandes amigos Eva Arenas Hernández, Juana Inés Rodríguez de León, Violeta Aspeitia Echegaray, Livier Guizar Guzmán, Cynthia Ortiz Robles, Noemí Ortega, Alejandra Miranda Piliado, Dulce Victoria Mendoza Rodríguez, Víctor Vázquez Pozos y Luis Antonio Corona Gonzales por alentarme a cumplir mis metas.

A mis compañero y personal del Colegio de Postgraduados y CIMMYT que formaron parte de esta etapa de mi vida.

### **A MIS PADRES**

Juan de Dios Hernández Bolaños y Dulce María Quintero Amezcuca

Que han sido un apoyo en todo momento, por su amor, sus consejos, sus valores mostrando en todo momento ese interés por mi persona motivándome a seguir mis sueños.

### **A MIS HERMANOS**

Cesar Octavio y José Alberto

Que siempre me han brindado de sus consejos, apoyo en este proceso y sobre todo por su cariño.

### **A MIS FAMILIARES**

A mis abuelitas que me han brindado su cariño, comprensión, pero sobre todo su amor y a todos aquellos que me apoyaron directa o indirectamente en la elaboración de mi tesis.

### **A MIS AMIGOS**

Que siempre me han apoyado y acompañado a lo largo de mi vida: Georgina García Zambrano, Violeta Aspeitia Echegaray, Livier Guizar Guzmán, Dulce Victoria Mendoza

Rodríguez, Andrés Sebastián López Ortiz, Marco Antonio Zúñiga Gómez, Edgar López García, Luis Antonio Corona González y Alberto Garnica Ibarra por haberme apoyado con sus consejos nunca lo voy a olvidar les deseo lo mejor en la vida.

Finalmente, a los maestros y compañeros que marcaron esta etapa de mi vida, que me ayudaron en asesorías y dudas presentadas en la elaboración de la tesis.

## CONTENIDO

	<u>Pagina</u>
<b>RESUMEN</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>vi</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>xiv</b>
<b>LISTA DE CUADROS</b>	<b>xv</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>1</b>
1.1. Planteamiento del problema	4
1.2. Objetivos	5
1.3. Hipótesis	6
1.4. Revisión de literatura	6
1.4.1. Descripción de la especie	6
1.4.2. Estructura y clasificación de las antocianinas	7
1.4.3. Usos de las antocianinas	9
1.4.3.2. Antocianinas en la industria alimentaria	9
1.4.3.3. Utilización de las antocianinas como colorantes	10
1.4.3.4. Usos de las antocianinas en la agricultura	11
1.4.3.5. Usos especiales de los maíces pigmentados	11
1.4.4. Fuentes naturales de las antocianinas	12
1.4.4.1. Ruta de síntesis de las antocianinas	15
1.4.5. Producción de las antocianinas	17
1.4.5.1. Extracción de antocianinas de origen vegetal	17
1.4.5.2. Biosíntesis de antocianinas mediante ingeniería metabólica	18
1.4.6. Métodos de determinación	19
1.4.6.1. Espectrometría de masas (MS)	20
1.4.6.2. Resonancia magnética nuclear (NMR)	20
1.4.6.3. Electroforesis capilar (CE)	20
1.4.6.4. Espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR)	21
1.4.6.5. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	21

1.4.7. Situación de la producción del maíz pigmentado	22
1.4.8. Beneficios a la salud	24
1.4.8.1. Cianidina	25
1.4.8.2. Pelargonidina	25
1.4.8.3. Peonidina	26
1.4.8.4. Delfinidina	26
1.4.8.5. Malvidina	27
1.4.9. Estudio de diversidad genética	27
1.5. BIBLIOGRAFÍA	30
<b>2. Cuantificación de antocianinas mediante espectroscopía de infrarrojo cercano y cromatografía líquida en maíces pigmentados</b>	<b>38</b>
2.1. Resumen	39
2.2. Summary	40
2.3. Introducción	41
2.4. Materiales y Métodos	43
2.4.1. Muestras de maíz	43
2.4.2. Preparación de las muestras	44
2.4.3. Determinación de antocianinas totales	45
2.4.4. Cuantificación de antocianinas glicosiladas	45
2.4.6. Pre-tratamiento de los espectros y procedimientos matemáticos para las calibraciones y validación	47
2.4.7. Análisis estadístico	48
2.5. Resultados y Discusión	49
2.5.1. Antocianinas totales	49
2.5.2. Perfil de antocianinas glicosiladas	50
2.5.3. Modelo de calibración de NIR	52
2.5.4. Correlación entre los métodos utilizados para la cuantificación de antocianinas	53
2.6. Conclusiones	54
2.7. Agradecimientos	54
2.8. Bibliografía	56

<b>3. Population structure and genetic diversity among accessions of mexican native blue maize</b>	<b>60</b>
3.1. Summary	61
3.2. Resumen	62
3.3 Introduction	63
3.4. Materials and Methods	66
3.4.1. Genetic material	66
3.4.1. Obtaining of SNP by genotyping	69
3.4.2. Estimation of genetic diversity indices	69
3.5. Results and Discussion	71
3.5.1. Study of genetic diversity	71
3.5.2. Cluster analysis	72
3.5.3. Correlation between genetic and geographic distances	74
3.6. Conclusions	75
3.7. Acknowledgments	76
3.8. Bibliography	77
<b>4. CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>82</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Estructura de las 6 antocianinas más comunes en las plantas superiores. 8
- Figura 2. Biosíntesis de las antocianinas en maíz. Las enzimas (genes) que intervienen son PAL (pal): Fenilalanina amonio liasa, C4H (c4h): Cinamato-4-hidroxilasa, CHS (c2): Chalcona sintasa, CHI (chi1): Chalcona isomerasa, F3H (f3h): Flavonona 3-hidrogenasa, F3'H (pr1): Flavonoide 3' hidroxilasa, DFR (a1): Dihydroflavonol 4-reductasa, ANS (a2): Antocianidina sintasa, UFGT (bz1): Flavonoide glucosil transferasa, GST (bz2): Glutación S-transferasa (Sharma et al., 2011, 2012) 16
- Figura 3. Distribución del contenido de antocianinas totales por espectroscopía de UV-Vis en 554 muestras de maíz pigmentado. 50
- Figura 4. Granos de color púrpura en la accesión BOZM342. 51
- Figura 5. Regresiones lineales de TAC y NIRS de 183 muestras, calibración at04 (A) y at22 (B). 53
- Figura 6. Graphical representation of the estimated genetic diversity. Dendrogram generated from the Ward method. 73
- Figura 7. Weighted dispersion diagram. The size of the circumference expresses Association of accession with the collection to smaller more Association site 75

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Razas reportadas con pigmentos naturales.	14
Cuadro 2. Producción del cultivo de maíz de color en México en el año 2013. (Fuente: SIAP, 2017).	23
Cuadro 3. Exportación de maíz morado en Perú en el año 2016 (Fuente: MINAGRI, 2017).	24
Cuadro 4. Razas asociadas a las 254 accesiones de maíces pigmentados utilizadas en la cuantificación.	44
Cuadro 5. Cuantificación por HPLC de antocianinas glicosiladas.	51
Cuadro 6. Valores de referencia obtenidos por espectrofotometría y validación cruzada para contenido de antocianinas totales (TAC).	52
Cuadro 7. A collection of 150 pigmented maize accessions used in the study of genetic diversity. Origin CIMMYT (C), INIFAP (I).	67

## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

En México, el maíz abarca la mitad de la superficie total destinada a los demás cultivos juntos, 7.4 millones de hectáreas. Prácticamente 3 millones de personas trabajan en el cultivo del maíz, equivalente a más del 40 % de la fuerza de trabajo del sector agrícola y cerca del 8 % del total de la fuerza laboral de México (Kato *et al.*, 2009). La mayor parte de los estudios de diversidad genética de maíz (*Zea mays* L.) consideran a México como centro primario de diversidad y domesticación (Herrera-Cabrera *et al.*, 2004). Este país posee la mayor variedad de fuentes genéticas en el mundo, con aproximadamente 59 razas diferentes, entre ellas muchas del tipo pigmentado, siendo las más comunes el azul, el rojo y el morado (López y Baeza, 2010). México es considerado centro de origen de aproximadamente 225 especies vegetales cultivadas, una de las principales aportaciones del centro de diversidad mesoamericano (Kato *et al.*, 2009).

Todos los maíces pertenecen a la misma especie y las razas que los diferencian corresponden a una clasificación no botánica. Los distintos tipos de maíz presentan una gran diversidad de formas, tamaños, colores, texturas y adaptación a diferentes ambientes, constituyendo numerosas variedades tradicionales. México aloja una gran diversidad de variedades de maíces azules, las cuales corresponden a varias razas. Además, dentro del complejo genético del maíz y sus parientes silvestres, existe diversidad genética que no ha sido aprovechada, que debería de utilizarse para la generación de nuevas variedades de alto rendimiento y con tolerancias a estrés (Hellin *et al.*, 2013). Dentro de las regiones de México en que se cultivan variedades nativas de maíces azules se encuentran los valles altos de la Meseta Central. En los valles altos de la Mesa Central predomina por ejemplo el maíz azul



de la raza Chalqueño, para riego y el Cónico para temporal. Una gran parte de la producción es utilizada para el consumo familiar mediante la elaboración de numerosos platillos asociados con entorno cultural. En el caso del maíz azul debe su característico color a las antocianinas, las cuales están localizadas en una capa delgada que recubre al endospermo y en la capa de aleurona (Agama-Acevedo *et al.*, 2011). La aleurona y el pericarpio del grano tienen capacidad de sintetizar y almacenar antocianinas, bajo la acción de factores de transcripción específicos (Espinosa *et al.*, 2009). Estudios reportan la presencia de antocianinas en maíz azul del tipo cianidina y malvidina, mientras el maíz de grano de color rojo contiene pelargonidina, cianidina y malvidina (Salinas-Moreno *et al.*, 2003).

Las antocianinas son un grupo de compuestos fenólicos del reino vegetal, son responsables del color rojo, púrpura y azul ampliamente distribuidas en hojas, raíces, flores y frutos. En las plantas superiores se encuentran seis antocianinas, que son pelargonidina, peonidina, cianidina, malvidina, petunidina y delphinidina. Las antocianinas no metiladas (cianidina, delphinidina y peonidina) son las más extendidas en la naturaleza, con un 80 % de las hojas pigmentadas, un 69 % de las frutas y un 50 % de las flores, en las partes comestibles de la planta la distribución de estas seis antocianinas es cianidina (50 %), pelargonidina (12 %), peonidina (12 %), delphinidina (12 %), petunidina (7 %) y malvidina (7 %) (Kong *et al.*, 2003)

Las antocianinas son muy importantes debido a que poseen propiedades farmacológicas y son usadas con fines medicinales tales como la prevención de cáncer (Yang y Zhai, 2010). Se reporta que algunas antocianinas muestran efectos potenciadores en la expresión y la actividad de la enzima superóxido dismutasa, que tiene un papel antioxidante importante en

los seres vivos (Hosoda *et al.*, 2012). Existe también evidencia de una asociación positiva entre el consumo de antocianinas y los efectos biológicos positivos que conlleva su ingesta. En estudios recientes se ha demostrado la habilidad de las antocianinas para influenciar el desarrollo de tumores en ratón, dichos estudios resaltan la habilidad foto-quimiopreventiva de la delfinidina (Wang y Stoner, 2008), también se ha observado que la cianidina-3-glucósido tiene cualidades anti-inflamatorias y anti-oxidantes (Zhang *et al.*, 2005).

En la ruta de la síntesis de antocianinas en la capa de aleurona del endospermo del maíz está involucrada la expresión de siete genes que codifican enzimas catalíticas, seis genes que son reguladores que codifican factores de transcripción y dos que están involucrados en el transporte del pigmento. Estos genes se encuentran en diferentes cromosomas, lo que indica que no se encuentran ligados (Espinosa *et al.*, 2009).

Se han reportado también en otros estudios, genes que controlan la expresión del color en la capa de la aleurona: sin antocianina-1 (*a-1*), sin antocianina-2 (*a-2*), bronce-1 (*bz-1*), bronce-2 (*bz-2*), sin color-1 (*c-1*), sin color-2 (*c-2*), grano defectuoso-1 (*dek-1*), aleurona roja (*pr*), sin color (*r*), y vivíparo-1 (*vp-1*) (Arellano *et al.*, 2003). En el caso del color púrpura se necesita la presencia del alelo dominante en cada gen: *A-1*, *A-2*, *Bz-1*, *Bz-2*, *C-1*, *C-2*, *Dek-1*, *Pr*, *R*, y *Vp-1*. La pigmentación azul se intensifica si el factor *in* es homocigote recesivo (Arellano *et al.*, 2003). En tejidos de origen materno actúan genes reguladores *CI/RI*, mientras en los del esporofito se expresan los reguladores *PII/BI*.

En la región centro oriente de Puebla, la comercialización favorable de maíz azul indujo a un crecimiento en la superficie sembrada, que llegó a ser de 2500 ha en el año 2000, lo que

equivale a 3.3 % del área sembrada con maíz en la región, donde se estimó que es factible obtener de manera comercial 5.0 t ha<sup>-1</sup> con variedades criollas con una relación costo/beneficio de 2.24, mientras que con el maíz blanco la relación es de 1.57; en el caso de las tortillas elaboradas de maíz azul el precio se encuentra entre 104 y 135 % arriba con relación al de la tortilla de maíz blanco (Hellin *et al.*, 2013). Lo anterior es aliciente de interés para considerar beneficios a los productores que decidan producir maíz azul. Sobre la utilización de maíz en la industria se han obtenido compuestos químicos que son utilizados en alimentos, medicinas y cosméticos.

### **1.1. Planteamiento del problema**

El propósito de la investigación es aprovechar los enormes recursos genéticos presentes en los bancos de germoplasma ubicados en el CIMMYT y el INIFAP en beneficio de todos los productores nacionales de maíz. Se propone traer estos recursos a un programa sistemático de evaluación y mejoramiento de maíces azules. También se plantea describir la diversidad genética de estos materiales y la identificación de las regiones genéticas de interés para la industria y los consumidores.

## **1.2. Objetivos**

### **Objetivos generales:**

- Evaluación de las características fenotípicas y diversidad genética de maíces azules nativos de los valles altos de México proveniente de accesiones de bancos de germoplasma del CIMMYT e INIFAP.

### **Objetivos específicos:**

- Evaluación fenotípica y genotípica de las accesiones de maíz azul presentes en los bancos de germoplasma del INIFAP y CIMMYT.
- Estudiar nuevas fuentes de variación genética en los maíces azules.
- Con base en la caracterización realizada de las accesiones se identificarán individuos candidatos para direccionar a programas de mejoramiento.

### **1.3. Hipótesis**

La alta variabilidad fenotípica y genética presente en las accesiones de maíz azul revelaran candidatos potenciales para direccionar a programas de mejoramiento, de tal manera que con el apoyo de la identificación de las regiones de interés dentro del genoma del sujeto de estudio nos permitirá la asociación de características deseables con marcadores moleculares específicos para la eficiente selección en futuros estudios.

### **1.4. Revisión de literatura**

#### **1.4.1. Descripción de la especie**

El maíz es una planta de hábito anual; el tallo es simple, erecto y puede llegar alcanzar una elevada longitud de hasta 5 metros; cuenta con pocas ramificaciones, su aspecto recuerda al de una caña de azúcar por la presencia de nudos y entrenudos y su médula esponjosa. Es una planta monoica de flores unisexuales, que presenta flores masculinas y femeninas bien diferenciadas en la misma planta. En la mazorca cada semilla es un fruto independiente, el cual es llamado cariósido, que está insertado en un raquis cilíndrico también llamado olote (Kato *et al.*, 2009). Al igual que otros cereales, las estructuras que constituyen el grano le confieren propiedades químicas y físicas importantes por las cuales fue seleccionado como alimento.

Se tiene conocimiento que en la época pre-colombina los antiguos pobladores hacían uso del teocintle (*Zea mays ssp. parviglumis*), que es un ancestro del maíz, al igual que del maíz de los que tal vez se bebían el jugo de la caña, pero sin duda, el proceso de nixtamalización para la elaboración de la masa para tortillas y tamales es uno de los grandes logros de las

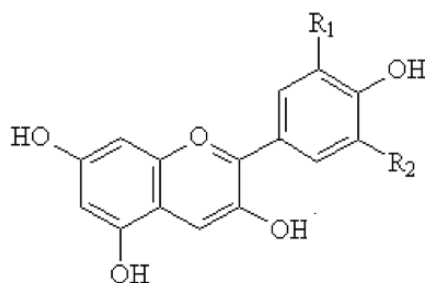
culturas mesoamericanas, al favorecer la bio-disposición del calcio y aminoácidos (Kato *et al.*, 2009).

Existen regiones en México donde se cultivan variedades criollas de maíz azul, que poseen variabilidad de tamaño, densidad y dureza del grano, así como composición química. Si bien estas características son regidas por factores genéticos, también son influenciadas por el manejo agronómico y el ambiente. Las características físicas de grano están relacionadas con la producción y rendimiento, mientras que sus características químicas y morfológicas definen su calidad nutritiva y su uso en la elaboración de alimentos (Agama-Acevedo *et al.*, 2011).

#### 1.4.2. Estructura y clasificación de las antocianinas

Las antocianinas son compuestos elaborados por las plantas y se acumulan en las vacuolas de las células epidérmicas foliares como un mecanismo de fotoprotección de los cloroplastos en ambientes de clima templado-frío y de igual forma se acumulan en cualquier órgano vegetativo en respuesta de radiación ultravioleta (Espinosa, 2008). En las plantas superiores se encuentran comúnmente seis antocianinas, cianidina, pelargonidina, peonidina, malvidina, petunidina y delphinidina (Figura 1). Las antocianidinas no metiladas (cianidina, delphinidina y peonidina) son las más extendidas en la naturaleza en un 80 % de las hojas pigmentadas, un 69 % de las frutas y un 50 % de las flores; en las partes comestibles la distribución es cianidina 50 %, pelargonidina 12 %, peonidina 12 %, delphinidina 12 %, petunidina 7 % y malvidina 7 % (Kong *et al.*, 2003). Las antocianinas son químicamente glucósidos de las antocianidinas y consisten de dos anillos aromáticos (anillo A y B) con seis

átomos de carbono que están interconectadas por un anillo heterocíclico (anillo C), están constituidas por una molécula de antocianidina (aglicona) que está unida a un carbohidrato mediante un enlace  $\beta$ -glucósido (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). El carbohidrato presente en la molécula se encuentra generalmente en la posición 3 del grupo fenólico. Se pueden clasificar las antocianinas según el número de carbohidratos en monoglucósidos, diglucósidos y triglucósidos (Aguilera *et al.*, 2011). Es posible encontrar en ocasiones los carbohidratos acilados en las antocianinas, característica que les confiere mayor estabilidad en pH extremos. Las antocianinas son susceptibles a la degradación y su estabilidad es afectada por varios factores como pH, solventes, presencia de proteínas y iones metálicos. Esta susceptibilidad de las antocianinas al pH alcalino es una desventaja en el proceso de nixtamalización del maíz azul debido a la influencia del pH alcalino de la solución de calcio durante el proceso de nixtamalización (Salinas-Moreno *et al.*, 2003).



Antocianina	R1	R2
Cianidina	OH	H
Pelargonidina	H	
Peonidina	OCH3	H
Malvidina	OCH3	OCH3
Petunidina	OH	OCH3
Malvidina	OH	OH

Figura 1. Estructura de las 6 antocianinas más comunes en las plantas superiores. (Pascual-Teresa y Sánchez-Ballesta, 2007).

### 1.4.3. Usos de las antocianinas

El uso de las antocianinas en productos nutracéuticos y terapéuticos en la industria farmacéutica es gracias a su alta biodisponibilidad; sin embargo, su administración y metabolismo *in vivo* han sido investigados en detalle en ratas (*Rattus norvegicus*), mientras tanto los análisis detallados sobre humanos aún son escasos (Ananga *et al.*, 2013). Se ha demostrado la habilidad de las antocianinas para atenuar el desarrollo de tumores en ratón, resaltando la actividad foto-quimiopreventiva de la delfinidina (Wang y Stoner, 2008). Existen reportes de que algunas antocianinas muestran efectos potenciadores en la expresión y la actividad de la enzima superóxido dismutasa, que tiene un papel antioxidante importante en los seres vivos (Hosoda *et al.*, 2012); también se ha observado que la cianidina-3-glucósido tiene cualidades anti-inflamatorias y anti-oxidantes (Zhang *et al.*, 2005).

#### 1.4.3.2. Antocianinas en la industria alimentaria

Los pigmentos naturales están ganando protagonismo en la industria alimenticia debido a que los consumidores evalúan críticamente a los colorantes sintéticos y asocian positivamente los colorantes naturales con la buena salud y la calidad. Hasta hoy, la fuente de suministro de colorante natural más recurrente proviene de la pulpa de la uva (*Vitis vinifera L.*) (Ananga *et al.*, 2013), lo que podría suponer una ventana de oportunidad para aprovechar las partes no comestibles de la planta de maíz como las hojas, tallos y totomoxtle. También las antocianinas son usadas como marcadores de control de calidad en la industria alimentaria en la comida de color. La forma en que se evalúa es mediante perfiles de



antocianinas que son fácilmente detectadas llegando incluso a detectar adulteraciones en mermeladas (Rymbai *et al.*, 2011).

#### 1.4.3.3. Utilización de las antocianinas como colorantes

En la actualidad, diversas industrias han sido criticadas debido a la contaminación que generan los colorantes sintéticos en su etapa de fabricación. Los colorantes naturales extraídos de plantas tienen múltiples ventajas sobre los sintéticos que van desde su fácil acceso, fácil forma de extraer, menor costo y no contaminan el medio ambiente. Dentro de los estudios que se están realizando sobre colorantes naturales se encuentran los que tratan sobre el uso de estos como células solares sensibilizadas con colorante (TiO<sub>2</sub> dye-sensitized solar cells) (Senthil *et al.*, 2011).

En su estudio, Senthil *et al.* (2011) crearon fotoelectrodos de TiO<sub>2</sub> sensibilizados con extractos derivados de las plantas *Delonix regia* y *Eugenia jambolana*, que contienen cianidina 3-*O*-glucósido, molécula que contiene grupos carboxilo que se adhieren fácilmente a la superficie de la película de TiO<sub>2</sub>. Encontraron que el máximo de absorción de *Delonix regia* fue 538.25 nm, mientras en *Eugenia jambolana* es 542.86 nm, con un coeficiente de absorción máximo de aproximadamente 15 veces mayor al colorante N-719, que es el más utilizado en la fabricación de células solares. De entre estos dos extractos, los investigadores comentan que *Eugenia jambolana* fue superior en su eficiencia; de esta manera, la célula construida con *Eugenia jambolana* exhibió una fotocorriente de cortocircuito de 1.49 mA y una eficiencia de poder de conversión de 0.5 %. Estos resultados son alentadores para los

investigadores, ya que permiten continuar con los estudios que precisen aumentar la eficiencia de estas células solares.

#### 1.4.3.4. Usos de las antocianinas en la agricultura

Las plantas cuentan con la capacidad de sintetizar compuestos secundarios que son tóxicos a patógenos y animales, estos compuestos se sintetizan en repuesta a un estrés biótico, como parte de una respuesta de defensa. En el trabajo reportado por Hedin *et al.*, (1983) se señala la identificación de cianidina-3- $\beta$ -glucósido como un factor importante en la resistencia al gusano cogollero de tabaco (*Heliothis virescens*) y también indican que existe una correlación entre la concentración de taninos (pro-antocianinas) en las hojas terminales y el crecimiento de las larvas, las cuales fueron más pequeñas. Los investigadores indican que las larvas que se alimentaron de brácteas y hojas de algodón (*Gossypium hirsutum* L.) rojo ganaron 20 % menos de peso que las que se alimentaron de brácteas y hojas verdes.

#### 1.4.3.5. Usos especiales de los maíces pigmentados

El principal uso de los maíces pigmentados en México es en la elaboración de platillos tradicionales asociados al entorno cultural como tamales, tlacoyos, tortillas, gorditas y atoles. En países como Perú es común utilizar el maíz morado en preparación de bebidas y postres como la chicha morada o la mazamorra morada, y constituyen un componente importante en la dieta peruana (Moreno-Loaiza y Paz-Aliaga, 2010).

La preparación de la masa con que se realizan algunos de estos platillos, como las tortillas, consiste en someterla a un proceso de nixtamalización, que consiste en la cocción y remojo de los granos de maíz en hidróxido de calcio durante 24 horas. Transcurrido este tiempo la solución es drenada y los granos son lavados para eliminar el pericarpio, el exceso de cal; los granos se muelen para formar la masa con la que se formaran las tortillas (Salinas-Moreno *et al.*, 2003).

La nixtamalización es un proceso que puede llegar a generar hasta una pérdida del 70 % de las antocianinas, esta degradación es debida a la influencia del pH alcalino de la solución de cal. Para tratar de solucionar este problema Sánchez-Madrigal *et al.* (2014) propusieron realizar la nixtamalización con dos fuentes diferentes de calcio que fueron  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  y  $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_6\text{Ca}$ . El resultado indico que las harina y tortillas hechas con  $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_6\text{Ca}$  en la nixtamalización tuvieron un alto contenido de antocianinas y actividad antioxidante. Los autores sugieren que la mayor conservación de la actividad antioxidante observada en la nixtamalización realizada con  $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_6\text{Ca}$  se pudo deber al pH, observándose en  $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_6\text{Ca}$  un pH de 5.66, mientras que en la nixtamalización realizada con  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  el pH fue de pH 6.57.

#### 1.4.4. Fuentes naturales de las antocianinas

Las principales fuentes de antocianinas son las frutas rojas como las bayas y las uvas, los cereales y las verduras, aunque también son encontradas en los tallos, hojas y granos como es el caso del maíz (Pascual-Teresa y Sanchez-Ballesta 2007). México es el centro de origen y diversidad del maíz y la (CONABIO, 2016) menciona que existen 64 razas

diferentes en el país; de entre ellas, se han reportado 23 razas maíz pigmentado (Cuadro 1). En el maíz azul las antocianinas están localizadas principalmente la capa de aleurona o en el pericarpio (Agama-Acevedo *et al.*, 2011). Dentro de las variantes en el color de grano presentes en las razas de maíz es posible encontrar desde negro hasta rosa pálido, encontrándose el rojo y el azul entre los más comunes (Salinas *et al.*, 2013). Estudios realizados en maíz azul reportan la presencia de antocianinas del tipo cianidina y malvidina, mientras el maíz de grano de color rojo contiene pelargonidina, cianidina y malvidina (Salinas *et al.*, 2003).

Cuadro 1. Razas reportadas con pigmentos naturales.

Raza	Color	Referencia
Palomero de Chihuahua	Amarillo	Wellhausen <i>et al.</i> , 1951
Arrocillo	Azul, Rojo, Amarillo	Wellhausen <i>et al.</i> , 1951; Salinas <i>et al.</i> , 2003
Cónico	Negro, Azul, Anaranjado, Amarillo	Agama-Acevedo <i>et al.</i> , 2011; Vázquez <i>et al.</i> , 2003; Wellhausen <i>et al.</i> , 1951
Elotes cónicos	Negro, Rojo	Vázquez <i>et al.</i> , 2010
Chalqueño	Azul Rojo, Amarillo	Agama-Acevedo <i>et al.</i> , 2011; Salinas <i>et al.</i> , 2003; Vázquez <i>et al.</i> , 2010; Wellhausen <i>et al.</i> , 1951
Dulce	Rojo, Amarillo	Wellhausen <i>et al.</i> , 1951
Azul	Azul	Salinas <i>et al.</i> , 2003
Cristalino de Chihuahua	Azul	Salinas <i>et al.</i> , 2003
Elotes occidentales	Negro	Vázquez <i>et al.</i> , 2010
Tabloncillo	Azul	Agama-Acevedo <i>et al.</i> , 2011; Wellhausen <i>et al.</i> , 1951
Bolita	Azul, Rojo	Salinas <i>et al.</i> , 2003; Vázquez <i>et al.</i> , 2010; Wellhausen <i>et al.</i> , 1951
Chapalote	Marrón	Wellhausen <i>et al.</i> , 1951
Reventador	Rojo	Wellhausen <i>et al.</i> , 1951
Nal-Tel	Amarillo	Wellhausen <i>et al.</i> , 1951
Tepecintle	Azul	Wellhausen <i>et al.</i> , 1951; Salinas <i>et al.</i> , 2012
Tuxpeño	Azul, Rojo, Morado	Salinas <i>et al.</i> , 2012; Vázquez <i>et al.</i> , 2010; Wellhausen <i>et al.</i> , 1951
Vandéño	Azul, Rojo, Morado	Wellhausen <i>et al.</i> , 1951; Salinas <i>et al.</i> , 2012
Celaya	Blanco Cremoso	Vázquez <i>et al.</i> , 2010; Wellhausen <i>et al.</i> , 1951
Zapalote grande	Azul	Wellhausen <i>et al.</i> , 1951; Salinas <i>et al.</i> , 2012
Olotillo	Azul, Rojo	Salinas <i>et al.</i> , 2012; Vázquez <i>et al.</i> , 2010; Wellhausen <i>et al.</i> , 1951
Olotón	Azul, Morado, Rojo, Amarillo	Salinas <i>et al.</i> , 2012; Wellhausen <i>et al.</i> , 1951
Tehua	Azul, Rojo, Morado	Salinas <i>et al.</i> , 2012; Wellhausen <i>et al.</i> , 1951
Comiteco	Amarillo	Wellhausen <i>et al.</i> , 1951

#### 1.4.4.1. Ruta de síntesis de las antocianinas

Las antocianinas son compuestos que se derivan del metabolismo secundario de las plantas, su biosíntesis es estimulada por factores ambientales. En maíz, las antocianinas se sintetizan y acumulan en los tallos, hojas y órganos reproductores. Las antocianinas en el grano de maíz están presentes en el eje embrionario, la capa de aleurona y el pericarpio. En el caso de los tejidos vegetativos, las antocianinas se acumulan en respuesta a ambientes templado-fríos y con alta radiación, como los Valles Altos.

Los genes que participan en la ruta metabólica de las antocianinas están clasificados en estructurales, reguladores y transportadores (Espinosa, 2008). La regulación de los genes estructurales es mediada por proteínas codificadas por genes reguladores. Esta regulación se manifiesta en determinados tejidos y tiempos de desarrollo. En el caso de los tejidos de origen materno los genes reguladores son *c1/r1* y en el esporofito en crecimiento se expresan los genes *pl1/b1* (Espinosa *et al.*, 2009). En la biosíntesis de la estructura química de las antocianinas en maíz intervienen las enzimas fenilalanina amonio liasa (PAL), cinamato-4-hidroxilasa (C4H), chalcona sintasa (CHS), chalcona isomerasa (CHI), flavonona 3-hidrogenasa (F3H), flavonoide 3' hidroxilasa (F3' H), dihidroflavonol 4-reductasa (DFR), antocianidina sintasa (ANS), flavonoide glucosil transferasa (UFGT) y glutatión S-transferasa (GST), las cuales desarrollan la biosíntesis en la superficie del retículo endoplásmico. Todas las proteínas reguladoras son indispensables para la biosíntesis de las antocianinas y los genes que codifican a las proteínas estructurales son *c2*, *chi1*, *f3h*, *a1*, *a2*, *bz1* y *bz2* (Figura 2).

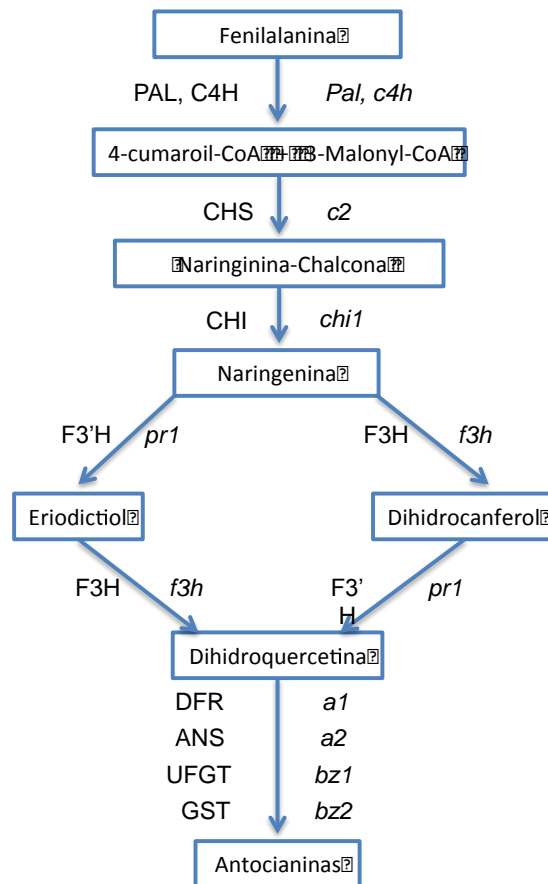


Figura 2. Biosíntesis de las antocianinas en maíz.

Las enzimas (genes) que intervienen son: PAL (*pal*) = Fenilalanina amonio liasa; C4H (*c4h*) = cinamato-4-hidroxilasa; CHS (*c2*) = chalcona sintasa; CHI (*chi1*) = chalcona isomerasa; F3H (*f3h*) = flavonona 3–hidrogenasa; F3' H (*pr1*) = flavonoide 3' hidroxilasa; DFR (*a1*) = dihidroflavonol 4-reductasa; ANS (*a2*) = antocianidina sintasa; UFGT (*bz1*) = flavonoide glucosil transferasa; GST (*bz2*) = glutatión S-transferasa (Sharma *et al.*, 2011; 2012).

Los flavonoides se producen a través de la vía de los fenilpropanoides y ésta depende de la constitución genética de la planta. La biosíntesis de las antocianinas en maíz (Figura 2) inicia con la reacción de la fenilalanina para producir 4-cumaroil CoA, posteriormente la chalcona sintasa cataliza los precursores de malonil CoA y 4-coumaril CoA para formar naringenina-chalcona. La enzima chalcona isomerasa cataliza una reacción intramolecular para cerrar el anillo C de la naringenina-chalcona y dar lugar a la naringenina. Posteriormente, las enzimas F3'H hidroxilan el carbono 3' del anillo B de la naringenina y del dihidrocaempferol para producir eriodictiol y dihidroquercetina y la enzima F3'5'H hidroxila el anillo B del dihidrocaempferol y de la dihidroquercetina para formar la dihidromiricetina (Espinosa, 2008; Sharma *et al.*, 2012).

#### 1.4.5. Producción de las antocianinas

##### 1.4.5.1. Extracción de antocianinas de origen vegetal

Para tener una buena calidad y cantidad de antocianinas se deben de tomar en cuenta diversos factores durante el proceso de su extracción, sin importar el método que se elija el primer factor a considerar es la temperatura, la cual debe de ser alta para permitir la solubilidad del pigmento, recomendándose temperaturas cercanas a 60 °C (Gorriti *et al.*, 2009). El tamaño de partícula debe de ser lo más pequeña posible para tener una mayor área de interferencia entre el sólido y el líquido. El tiempo de difusión está en función de la temperatura y la agitación. Por último, el número de lavados depende del grado de concentración del pigmento en la materia prima.



La extracción mediante disolvente es el método más común para la extracción de antocianinas, ya que son moléculas no polares; por lo tanto, los disolventes más utilizados en las extracciones son mezclas acuosas de etanol, metanol o acetona. Estas metodologías consisten en la extracción conjunta de los fenoles junto con azúcares, ácidos grasos y proteínas, lo que hace necesario un proceso de purificación. En relación con los extractantes, el más utilizado es el metanol acidificado, ya que es 20 % más eficiente que el etanol y 73 % más eficiente que el agua (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). Para la extracción de antocianinas aciladas es necesario utilizar ácidos débiles para evitar su hidrólisis, por ejemplo metanol con TFA (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). En la industria del vino se utiliza el método de extracción llamado remojo, que consiste en moler las muestras frescas y la puesta en contacto del mosto con los hollejos para extraer los pigmentos (Ella *et al.*, 2003).

Uno de los problemas en la producción de antocianinas es la inestabilidad de estos compuestos bajo condiciones neutras y bajas de pH, por lo que existen pocos métodos de síntesis. Actualmente, las antocianinas se producen en forma industrial como una mezcla de varios extractos de plantas, lo que ha generado la necesidad de buscar alternativas para la producción de antocianinas, como la tecnología de ingeniería metabólica mediante la producción de hospederos microbianos, tales como *Escherichia coli*.

#### 1.4.5.2. Biosíntesis de antocianinas mediante ingeniería metabólica

Yan *et al.* (2005) construyeron un grupo de cuatro genes artificiales que intervienen en la ruta metabólica de las antocianinas. Estos cuatro genes convierten la naringenina y el eriodictiol en pelargonidina 3-*O*-glucósido y cianidina 3-*O*-glucósido. La biosíntesis de las

antocianinas es realizada con un cultivo de la cepa recombinante de *E. coli* en un medio con glucosa como fuente de carbohidratos y se suplementa con naringenina o eriodictiol a una concentración de 0.2 mM y UDP-glucosa a una concentración de 5 mM. Después de la fermentación, los medios fueron colectados en un matraz de agitación y se extrajeron los diversos compuestos fenólicos. Las concentraciones que obtuvieron de antocianinas sintetizadas después de la fermentación fueron de 5.6  $\mu\text{g L}^{-1}$  para pelargonidina 3-*O*-glucósido y 6.0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para cianidina 3-*O*-glucósido. Esta técnica permite la fácil producción de antocianinas a un bajo costo; aunque la técnica aun es mejorable, ya que los investigadores mencionan la posibilidad de generar un grupo de genes artificiales que permitan la transformación de la fenilalanina o tirosina a naringenina y lograr así la expresión simultanea de los dos grupos de genes sintéticos que permitiría aprovechar los aminoácidos fenilalanina o tirosina, que son nativos de la bacteria *E. coli*.

#### 1.4.6. Métodos de determinación

Existen múltiples métodos de determinación de antocianinas en frutas y semillas, entre los que se encuentran la espectrometría de masas (MS), la resonancia magnética nuclear (NMR), la electroforesis capilar (CE) y la espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR), entre otros. A pesar de existir diferentes métodos, muchos de ellos son destructivos, tienen un alto costo o generan residuos tóxicos. Otra limitante es que existen métodos en los cuales es necesario personal especializado, lo cual limita su uso. A continuación, se mencionan los métodos de determinación más usados.

#### 1.4.6.1. Espectrometría de masas (MS)

La técnica de espectrometría de masas permite determinar antocianinas mediante la identificación de la masa de los iones moleculares de la muestra a través de energías de ionización muy alta (Escribano-Bailón *et al.*, 2004). Actualmente el acoplamiento con otras técnicas como el HPLC con MS APCI-MS y FAB-MS, ESI-MS ha generado herramientas muy poderosas para la determinación de antocianinas (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). Una ventaja de esta técnica es que evita la volatilización e ionización de la muestra; como consecuencia, se obtiene un espectro más simplificado.

#### 1.4.6.2. Resonancia magnética nuclear (NMR)

La técnica de NMR es utilizada para la elucidación estructural de las antocianinas, como en el caso de las antocianinas aciladas con derivados ramnósidos encontrados en algunas frutas como las bayas (Aguilera *et al.*, 2011; Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). El uso de espectroscopia MNR unidimensional y de dos dimensiones  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  con métodos de supresión larga permite una identificación segura de las antocianinas (Aguilera *et al.*, 2011; González-Manzano *et al.*, 2008). Estas técnicas tienen la ventaja de ser simples y consumen poco tiempo siendo útiles como un complemento con otras técnicas.

#### 1.4.6.3. Electroforesis capilar (CE)

La CE es una técnica reciente adecuada para la separación, extracción y cuantificación de antocianinas (Da Costa *et al.*, 2000). Esta técnica tiene una excelente sensibilidad, alta resolución, un bajo consumo de muestra y una mínima generación de residuos tóxicos.

#### 1.4.6.4. Espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR)

La espectroscopía de NIR está incrementando su uso en los últimos años gracias a que es un método no destructivo y sin ningún tipo de preparación de las muestras, siendo éstas colocadas directamente en el instrumento para su lectura. Estas características proporcionan a esta técnica tenga una gran ventaja sobre las técnicas convencionales. Aun teniendo esto en cuenta, la técnica NIR también tiene sus desventajas, una de las principales es en el análisis de frutas que puede dar señales débiles de TAC en comparación con otros componentes. No obstante, para resolver estos inconvenientes existen varios algoritmos quimiométricos que son aplicados a los datos de espectroscopía NIR, lo que permite superar estos obstáculos (Cavalcanti *et al.*, 2013).

#### 1.4.6.5. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

La cromatografía en HPLC se lleva a cabo mediante una fase móvil que es un líquido que fluye a través de una columna que contiene una fase fija. La separación por cromatografía es el resultado de las interacciones específicas de las moléculas entre ambas fases. A diferencia de la cromatografía de gases, la cromatografía en HPLC no está limitada por la volatilización ni por la estabilidad térmica de la muestra. El HPLC es un proceso automatizado y los resultados obtenidos son de alta resolución y fáciles de leer. Dentro de las desventajas se puede mencionar el alto costo del equipo y la necesidad de tener personal técnico capacitado para operarlo (Jiménez, 2000).

#### 1.4.7. Situación de la producción del maíz pigmentado

Los maíces pigmentados son apreciados por los consumidores debido a su color, textura, sabor y beneficios a la salud, lo que ha propiciado el interés de inclusión en platillos típicos como tortillas, tamales, totopos, entre otros. Recientemente un nuevo interés ha surgido hacia el apoyo al sector de maíz en México, generando la posibilidad de que los pequeños productores de maíces criollos puedan incrementar sus beneficios (Hellin *et al.*, 2013). Los principales estados productores de maíz pigmentado en México son Campeche, Chiapas, Chihuahua, Guerrero, Jalisco, Michoacán, México, Puebla y Tlaxcala y en conjunto suman una superficie sembrada de 56 689 ha con una producción de 95 357 toneladas para el año 2013 (SIAP, 2017). En la Cuadro 2 se describe a detalle la superficie sembrada de cada uno de los estados, así como su producción, rendimiento por hectárea y el valor de la producción. Cabe señalar que la producción de maíz azul genera mayores beneficios económicos que el maíz blanco, lo que ha provocado el incremento de la superficie sembrada; por ejemplo, en el estado de Puebla ésta llegó a ser de 2500 ha en el año 2000, lo que equivale a 3.3 % del área sembrada, donde se estimó que es factible obtener de manera comercial 5.0 t ha<sup>-1</sup> con variedades criollas, con una relación costo/beneficio de 2.24, mientras que con el maíz blanco la relación es de 1.57. En el caso de las tortillas elaboradas de maíz azul el precio se encuentra entre 104 y 135 % más que el de la totilla de maíz blanco (Hellin *et al.*, 2013), lo anterior sugiere un gran incentivo a los productores mexicanos para decidir sembrar maíces pigmentados.

Cuadro 2. Producción del cultivo de maíz de color en México en el año 2013. (Fuente: SIAP, 2017).

Producción de maíz pigmentado en México				
Ubicación	Sup. cosechada (Ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton / Ha)	Valor de producción (Pesos)
Campeche	25 554	27 475.88	1.08	80 403.06
Chiapas	7 675	10 260.14	1.34	32 713.39
Chihuahua	1 180	2 579	2.19	10 316
Guerrero	1 037	2 514.75	2.43	7 830.9
Jalisco	2 025	1 316.25	0.65	5 923.12
Michoacán	1 000	3 657	3.66	12 722.12
México	17 058.75	44 266.83	2.59	15 8811.03
Puebla	880	2 618	2.98	6 935.8
Tlaxcala	280	670	2.39	2 123
	56 689.75	95 357.85	1.68	317 778.42

En el caso de Perú, recientemente ha tenido una mayor apertura comercial que ha permitido el desarrollo de la exportación de productos emergentes, como es el caso del maíz morado. Perú en el año 2016 exportó 739.11 toneladas de maíz morado, con un valor 1009.03 miles dólares (Cuadro 3), teniendo como principal destino EE.UU. y España con un porcentaje de FOB de 63.92 % y 13.13 % respectivamente (MINAGRI, 2017). El cultivo y la industrialización del maíz morado en Perú están orientado a la exportación y se ha incrementado año tras año.

Cuadro 3. Exportación de maíz morado en Perú en el año 2016 (Fuente: MINAGRI, 2017).

País	Peso Neto (t)	Peso Bruto (t)	Valor FOB (Miles US\$)
ESTADOS UNIDOS	304.68	333.94	645.01
ESPAÑA	60.71	66.35	132.92
ECUADOR	153.32	153.82	73.37
CHILE	123.34	127.06	34.93
ITALIA	11.73	12.02	28.87
JAPON	10.2	10.65	28.73
HOLANDA	11.49	12.18	27.64
CANADA	6.16	8.47	13.9
BELGICA	5.28	6.87	10.28
RUSIA	2	2.08	5.5
TAILANDIA	2	2.03	2.5
SUIZA	1.12	1.22	2.23
INGLATERRA	0.6	0.6	1.21
E. ARABES UNIDOS	0.51	0.55	0.71
COLOMBIA	1	1	0.5
ARUBA	0.16	0.17	0.39
COSTA RICA	0.03	0.03	0.11
SINGAPUR	0.03	0.03	0.11
REPUBLICA CHECA	0.02	0.02	0.1
MALAYSIA	0.02	0.02	0.02
Total	694.4	739.11	1009.03

#### 1.4.8. Beneficios a la salud

Las antocianinas tienen un papel importante en la salud humana, debido a los beneficios obtenidos al incluirlas en la dieta diaria. Su consumo disminuye el riesgo de padecer enfermedades cardíacas, diabetes, artritis, cáncer; también tienen cuenta con la cualidad de inducir apoptosis en las células (Ananga *et al.*, 2013; Wang y Stoner, 2008; Zhang *et al.*, 2005). A continuación, se describen algunas de sus cualidades.

#### 1.4.8.1. Cianidina

La Cianidina-3-glucósido es la antocianina más extendida entre las frutas y verduras pigmentadas. Entre sus beneficios está la prevención de la inflamación intestinal. En un estudio realizado por Serra *et al.* (2013) evaluaron la eficiencia de cianidina-3-glucósido contra la inflamación intestinal, demostrándose que esta antocianina es eficaz inhibiendo los marcadores pro-inflamatorios producidos por citoquinas. También se ha demostrado en estudios realizados en ratones que la antocianina cianidina-3-*O*-glucósido cuenta con efecto neuroprotector contra la isquemia cerebral (Min *et al.*, 2011). Sobre las propiedades quimiopreventivas de cianidina-3-glucósido se puede mencionar que induce apoptosis en células con leucemia en humanos, aunque es un área aun por investigar (Fimognari *et al.*, 2004). La cianidina también tiene efecto quimiopreventivo contra la neoplasia (Song *et al.*, 2012), también cuenta con la capacidad de inducir la diferenciación celular como prevención y tratamiento de cánceres (Fimognari *et al.*, 2004).

#### 1.4.8.2. Pelargonidina

La pelargonidina es la responsable del color rojo que se encuentra en las frutas y verduras; además, se conoce que cuenta con atributos que benefician la salud humana. Recientes estudios han demostrado que la pelargonidina tiene efectos preventivos contra la arterosclerosis, un síndrome que se caracteriza por el depósito e infiltración de sustancias lipídicas en las paredes de las arterias (Son *et al.*, 2014). Se ha demostrado que esta antocianina tiene capacidad antidiabética; los tratamientos de pelargonidina aplicados en



ratas contrarrestaron la hiperglucemia y aliviaron el estrés oxidativo mediante la reducción del nivel de glicosilación (Roy *et al.*, 2008).

#### 1.4.8.3. Peonidina

En la investigación realizada por Chen *et al.*, (2005) se analizaron los efectos inhibidores de crecimiento y de apoptosis de cianidina 3-glucósido y peonidina 3-glucósido en células de carcinoma humano. Este estudio demostró que tanto la cianidina 3-glucósido como la peonidina 3-glucósido inhiben el crecimiento sobre células de cáncer. En el estudio se aplicaron a los animales para inducir crecimiento tumoral. Los tumores se observaron ocho días después de la inoculación y una reducción de 1.5 veces el volumen del tumor con el tratamiento de antocianinas en el día 20 y de 2.1 el día 29. El estudio sugiere que estas antocianinas ejercen inhibición de crecimiento celular mediante la detención de la fase G<sub>2</sub> del ciclo celular; además, se observó la inhibición de la proliferación celular y apoptosis *in vitro*.

#### 1.4.8.4. Delfinidina

Los efectos biológicos más mencionados de esta antocianina son la inhibición del crecimiento y la inducción de apoptosis de células cancerígenas. En un estudio que analizaba la capacidad inhibidora de crecimiento en células de cáncer de mama se comprobó la inhibición del crecimiento y la apoptosis en múltiples subtipos moleculares de este cáncer (Ozbay y Nahta, 2011). En el crecimiento de tumores y la angiogénesis *in vivo*, Pal *et al.*

(2013), encontraron que en ratones con cáncer de pulmón se redujo la progresión tumoral de aquellos tratados con delfinidina.

#### 1.4.8.5. Malvidina

La antocianina malvidina posee gran capacidad antioxidante y citotoxicidad contra células de leucemia monocítica y células de cáncer de colon (Huang *et al.*, 2014). Un ejemplo de su beneficio se muestra en el estudio de Wang y Stoner, (2008) donde comprobaron que la malvidina es eficaz en la inducción de la muerte celular programada de las células gástricas humanas, lo que sugiere su eficiencia en la prevención de cáncer. En un estudio realizado sobre el efecto de la malvidina en lipopolisacáridos (LPS) se encontró que aumenta el LPS inducido por la activación Akt y MKP-1, que son procesos importantes en la inmunidad innata, sugiriendo efectos positivos en enfermedades crónicas como la obesidad, diabetes, hipertensión y enfermedades cardiovasculares (Bognar *et al.*, 2013).

#### 1.4.9. Estudio de diversidad genética

El estudio de la diversidad genética consiste en la estimación de la variabilidad a nivel de ADN entre individuos o grupos de individuos. Actualmente se usan los polimorfismos presentes en el genoma de un grupo de individuos detectados mediante marcadores moleculares para estimar esta variabilidad, ya que, mediante estas herramientas se pueden identificar las pequeñas diferencias presentes entre los diferentes genomas de los miembros de la población. La variabilidad genética es la que permite que una población tenga oportunidad de adaptarse a condiciones cambiantes del ambiente y a la presión de selección;

de esta manera, es importante su determinación para identificar fuentes de germoplasma que permitan minimizar riesgos de vulnerabilidad genética al identificar alelos favorables.

El conocer la diversidad y la estructura genética de una población permite seleccionar mejores estrategias de mejoramiento y gestionar eficazmente la conservación de las razas de maíz presentes en el país. Teniendo en cuenta lo anterior, poblaciones con índices de diversidad pobres deben tomarse en cuenta en esquemas de conservación tales como el mejoramiento participativo; por otro lado, cuando se identifiquen poblaciones con índices de diversidad altos se deben de direccionar a programas de mejoramiento donde se evalúen los caracteres fenotípicos de interés y se identifiquen germoplasmas con alelos favorables para ambientes adversos (González *et al.*, 2013).

Para medir la diversidad genética existen diversos parámetros que pueden ser estimados dentro de las especies, entre poblaciones y dentro de las poblaciones (Berg y Hamrick, 1997). Dentro de los estimadores más usados se encuentran el porcentaje de loci polimórfico que sirve para comparar especies y poblaciones, la diversidad alélica promedio por locus ( $A_e$ ) medida que indica el número de alelos y la uniformidad de las frecuencias alélicas, la proporción esperada de loci heterocigóticos ( $H_e$ ), que es frecuentemente denominado como diversidad génica y junto con  $A_e$  está función de la proporción de loci polimórficos, número de alelos por locus polimórficos y la uniformidad de las frecuencias de los alelos dentro de las poblaciones (Berg y Hamrick, 1997).

Otro parámetro muy importante es la distancia genética que es la diferencia entre dos individuos dada por la variación genética, este parámetro puede ser calculado por varias

medidas estadísticas en función del conjunto de datos (Mohammadi y Prasanna, 2003). Entre las distancias más conocidas se pueden mencionar la distancia Euclidiana la cual se recomienda usar cuando se dispone de información con marcadores alélicos y se analizan poblaciones o individuos en combinación de métodos multivariados, la distancia de Rogers, que es una modificación de la distancia Euclidiana y su desarrollo asume el desconocimiento de las fuerzas evolutivas que divergen de las unidades taxonómicas, la distancia modificada de Rogers que puede aplicarse en las mismas consideraciones que la distancia Euclidiana, la distancia Cavalli-Sforza y Edwards desarrollada para analizar la frecuencia de los grupos sanguíneos en poblaciones humanas, la distancia de Reynolds que utiliza el coeficiente de coancestría como la base para medir el grado de disimilitud genética, y la similaridad genética estándar de Nei es usada para estimar el número promedio de sustituciones de codones por locus (Reif *et al.*, 2005).

Una técnica multivariante que ayuda a agrupar individuos u objetos basada en las características que poseen es el análisis de agrupamiento; así, los grupos formados deben exhibir homogeneidad dentro de los grupos y una alta heterogeneidad entre grupos. Una agrupación exitosa mostrará que los individuos deben estar más cerca cuando están próximos geográficamente y los grupos más diferentes más lejanos (Mohammadi y Prasanna, 2003).

Los dos métodos de agrupamiento más ampliamente utilizados son aquellos basados en distancia donde se utiliza la matriz de distancias genéticas como entrada para el análisis de agrupamiento, y los métodos basados en modelos en los que las observaciones de cada grupo son puestas aleatoriamente en algún modelo paramétrico y las inferencias de cada parámetro corresponde a la agrupación (Mohammadi y Prasanna, 2003).

## 1.5. BIBLIOGRAFÍA

- Agama-Acevedo E., Y. Salinas-Moreno, G. Pacheco-Vargas y L. A. Bello-Pérez (2011)** Características físicas y químicas de dos razas de maíz azul: morfología del almidón. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2:317-329.
- Aguilera O. M., M. C. Reza V., R. G. Chew M. y J. A. Meza V. (2011)** Propiedades funcionales de las antocianinas. *Revista Biotecnia* 13:16–22.
- Ananga A., V. Georgiev, J. Ochieng, B. Phills and V. Tsoleva (2013)** Production of anthocyanins in grape cell cultures: a potential source of raw material for pharmaceutical, food, and cosmetic industries. In: *The Mediterranean Genetic Code - Grapevine and Olive*. D. Poljuha and B. Sladonja (eds.). InTech. Rijeka, Croatia. pp:247- 287.
- Arellano V. J. L., C. C. Tut, R. A. María, M. Y. Salinas y G. O. R. Taboada (2003)** Maíz azul de los valles altos de México. I. rendimiento de grano y caracteres agronómicos. *Revista Fitotecnica Mexicana* 26:101-107.
- Berg E. E., and J. L. Hamrick (1997)** Quantification of genetic diversity at allozyme loci. *Canadian Journal of Forest Research* 27:415-424.
- Bognar E., Z. Sarszegi, A. Szabo, B. Debreceni, N. Kalman, Z. Tucsek, B. Sumegi and F. Gallyas (2013)** Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects in RAW264.7 Macrophages of Malvidin, a Major Red Wine Polyphenol. *PLoS ONE* 8:6.
- Castañeda-Ovando A., M. L. Pacheco-Hernández, M. E. Páez-Hernández, J. A. Rodríguez and C. A. Galán-Vidal (2009)** Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* 113:859-871.
- González C. M. E., N. Palacios R., A. Espinoza B. y C. A. Bedoya S. (2013)** Diversidad

genética en maíces nativos mexicanos tropicales. *Revista Fitotecnia Mexicana* 36:329-338.

**Cavalcanti I. M. R., K. M. Gomes L., V. Garcia L., J. D. Cruz P. and G. H. Almeida T.**

(2013) Total anthocyanin content determination in intact açai (*Euterpe oleracea* Mart.) and palmitero-juçara (*Euterpe edulis* Mart.) fruit using near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate calibration. *Food Chemistry* 136:1160-1164.

**Chen P. N., S. C. Chu, H. L. Chiou, C. L. Chiang, S. F. Yang and Y. S. Hsieh (2005)**

Cyanidin 3-glucoside and peonidin 3-glucoside inhibit tumor cell growth and induce apoptosis in vitro and suppress tumor growth in vivo. *Nutrition and Cancer* 53:232-43.

**CONABIO, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (2016)**

Razas de maíz en México. <http://www.biodiversidad.gob.mx/usos/maices/razas2012.html> (Mayo 2016).

**Da Costa C. T., D. Horton and S. A. Margolis (2000)** Analysis of anthocyanins in foods

by liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 881:403-10.

**Ella M. C., S. Guyot and C. M. G. C. Renard (2003)** Flavonols and anthocyanins of bush

butter, *Dacryodes edulis* (G. Don) H.J. Lam, fruit. changes in their composition during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:7475-80.

**Escribano-Bailón M. T., C. Santos-Buelga and J. C. Rivas-Gonzalo (2004)** Anthocyanins

in cereals. *Journal of Chromatography A* 1054:129-141.

**Espinosa T. E. (2008)** Algunos aspectos genéticos y bioquímicos de las antocianinas en

poblaciones criolas de maíz de granos pigmentados. Colegio de Postgraduados.

**Espinosa T. E., M. C. Mendoza C., F. Castillo G., J. Ortiz C., A. Delgado A. y 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* 32:303-309.
- Fimognari C., F. Berti, M. Nüsse, G. Cantelli-Forti and P. Hrelia (2004)** Induction of apoptosis in two human leukemia cell lines as well as differentiation in human promyelocytic cells by cyanidin-3-O-beta-glucopyranoside. *Biochemical Pharmacology* 67:2047-56.
- González-Manzano S., J. J. Pérez-Alonso, Y. Salinas-Moreno, N. Mateus, A. M. S. Silva, V. Freitas and C. Santos-Buelga (2008)** Flavanol–anthocyanin pigments in corn: NMR characterisation and presence in different purple corn varieties. *Journal of Food Composition and Analysis* 21:521-526.
- Gorriti G. A., F. Quispe J. J. Arroyo A., A. Cordova R., B. Jurado T., I Santiago A. y E. Taype E. (2009)** Extracción de antocianinas de las corontas de *Zea mays* L. Maíz Morado. *Ciencia E Investigación* 12:64-74.
- Hedin P. A., J. N. Jenkins, D. H. Collum, W. H. White, M. W. W. L. Parrott and M. W. MacGown (1983)** Cyanidin-3- $\beta$ -glucoside, a newly recognized basis for resistance in cotton to the tobacco budworm *heliiothis virescens* (Fab.) (lepidoptera: Noctuidae). *Experientia* 39:799-801.
- Hellin J., A. Keleman, D. López, L. Donnet y D. Flores (2013)** La importancia de los nichos de mercado. Un estudio de caso del maíz azul y del maíz para pozole en México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 36:315-328.
- Herrera-Cabrera B. E., F. Castillo-González, J. J. Sánchez-González, J. M. Hernández-Casillas, R. A. Ortega-Pazkca y M. Major-Goodman (2004)** Diversidad del maíz chalqueño. *Agrociencia* 38:192-206.

- Hosoda K., M. Miyaji, H. Matsuyama, S. Haga, H. Ishizaki and K. Nonaka (2012)** Effect of supplementation of purple pigment from anthocyanin-rich corn (*Zea mays* L.) on blood antioxidant activity and oxidation resistance in sheep. *Livestock Science* 145:266–270.
- Huang W., Y. Liu, J. Wang, X. Wang and C. Li (2014)** Anti-Inflammatory Effect of the Blueberry Anthocyanins Malvidin-3-Glucoside and Malvidin-3-Galactoside in Endothelial Cells. *Molecules* 19:12827-12841.
- Jiménez A. R. (2000)** Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains - Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 40:173-289.
- Kato Y. T. A., C. Mapes S., L. Mera O., J. A. Serratos H. y R. A. Bye B. (2009)** Origen y Diversificación del Maíz en México. (U. A. de México, Ed.) (Edición, P). México, D.F.: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Kong J. M., L. S. Chia, N. K. Goh, T. F. Chia and R. Brouillard (2003)** Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 64:923-933.
- López M. L. X. y R. Baeza. J. (2010)** Comparación de la Capacidad Antioxidante, Compuestos Fenólicos y Antocianinas Totales de Diferentes Variedades de Maíz (*Zea mays* L.). *INVURNUS* 2:19-22.
- MINAGRI, Ministerio de Agricultura y Riego (2017)** Comercio Exterior para el Agro. <http://sistemas.minagri.gob.pe/siscex/exportaciones/partidaIN> (Noviembre 2017).
- Min J., S. W. Yu, S. H. Baek, K. M. Nair, O. N. Bae, A. Bhatt, M. Kassab, M. G. Nair and A. Majid (2011)** Neuroprotective effect of cyanidin-3-O-glucoside anthocyanin in mice with focal cerebral ischemia. *Neuroscience Letters* 500:157-161.
- Mohammadi S. A. and B. M. Prasanna (2003)** Analysis of Genetic Diversity in Crop Plants



— Salient Statistical Tools. *Crop Science* 43:1235-1248.

**Moreno-Loaiza O. y A. Paz-Aliaga (2010)** Efecto vasodilatador mediado por óxido nítrico del extracto hidroalcohólico de *Zea mays* L. (Maíz morado) en anillos aórticos de rata.

*Rev Peru Med Exp Salud Publica* 27:527-531.

**Ozbay T. and R. Nahta (2011)** Delphinidin inhibits HER2 and Erk1/2 signaling and suppresses growth of HER2-overexpressing and triple negative breast cancer cell lines.

*Breast Cancer: Basic and Clinical Research* 5:143-154.

**Pal H. C., S. Sharma, L. R. Strickland, J. Agarwal, M. Athar, C. A. Elmets and F. Afaq (2013)** Delphinidin Reduces Cell Proliferation and Induces Apoptosis of Non-Small-Cell Lung Cancer Cells by Targeting EGFR/VEGFR2 Signaling Pathways. *PLoS ONE*

8:1-13.

**Pascual-Teresa S. and M. T. Sanchez-Ballesta (2007)** Anthocyanins: from plant to health.

*Phytochemistry Reviews* 7:281-299.

**Reif J. C., A. E. Melchinger and M. Frisch (2005)** Genetical and mathematical properties of similarity and dissimilarity coefficients applied in plant breeding and seed bank management. *Crop Science* 45:1-7.

**Roy M., S. Sen and A. S. Chakraborti (2008).** Action of pelargonidin on hyperglycemia and oxidative damage in diabetic rats: Implication for glycation-induced hemoglobin modification. *Life Sciences* 82:1102-1110.

**Rymbai H., R. R. Sharma and M. Srivastav (2011)** Biocolorants and its implications in Health and Food Industry - A Review. *International Journal of Pharm Tech Research* 3:2228-2244.

**Salinas M. Y., F. J. Cruz C., S. A. Díaz O. y F. Castillo G. (2012)** Granos de maíces pigmentados de Chiapas, características físicas, contenido de antocianinas y valor

nutracéutico. *Revista Fitotecnia Mexicana* 35:33-41.

**Salinas-Moreno Y., F. Martínez-Bustos, M. Soto-Hernández, R. Ortega-Paczka y J. L.**

**Arellano-Vázquez (2003)** Efecto de la nixtamalización sobre las antocianinas del grano de maíces pigmentados. *Agrociencia* 37:617-628.

**Salinas M. Y., C. García S., B. Coutiño E. y V. A. Vidal M. (2013)** Variabilidad en contenido y tipos de antocianinas en granos de color azul/ morado de poblaciones mexicanas de maíz. *Revista Fitotecnia Mexicana* 36:285-294.

**Sánchez-madrigal M. Á., A. Quintero-Ramos, F. Martínez-bustos, C. O. Meléndez-Pizarro and M. G. Ruiz-Gutiérrez (2014)** Effect of different calcium sources on the antioxidant stability of tortilla chips from extruded and nixtamalized blue corn (*Zea mays* L.) flours. *Food Science and Technology* 34:143-149.

**Senthil T. S., N. Muthukumarasamy, D. Velauthapillai, S. Agilan, M. Thambidurai and R. Balasundaraprabhu (2011)** Natural dye (cyanidin 3-O-glucoside) sensitized nanocrystalline TiO<sub>2</sub> solar cell fabricated using liquid electrolyte/quasi-solid-state polymer electrolyte. *Renewable Energy* 36:2484-2488.

**Serra D., J. Paixão, C. Nunes, T. C. P. Dinis and L. M. Almeida (2013)** Cyanidin-3-glucoside suppresses cytokine-induced inflammatory response in human intestinal cells: comparison with 5-aminosalicylic acid. *PLoS ONE* 8:e73001, doi:10.1371/journal.pone.0073001.

**Sharma M., C. Chai, K. Morohashi, E. Grotewold, M. E. Snook and S. Chopra (2012)** Expression of flavonoid 3'-hydroxylase is controlled by P1 the regulator of 3-deoxyflavonoid biosynthesis in maize. *BMC Plant Biology* 12:196.

**Sharma M., M. Cortes-Cruz, K. R. Ahern, M. McMullen, T. P. Brutnell and S. Chopra (2011)** Identification of the Pr1 Gene Product Completes the Anthocyanin Biosynthesis

Pathway of Maize. *Genetics* 188:69-79.

**SIAP, Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (2017)** Agricultura:

Producción Anual: Cierre de la producción agrícola por cultivo. SAGARPA. México.

[http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola\\_siap\\_gb/ientidad/index.jsp](http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/ientidad/index.jsp) (Marzo 2017).

**Son J. E., H. Jeong, H. Kim, Y. A. Kim, E. Lee, H. J. Lee and K. W. Lee (2014)**

Pelargonidin attenuates PDGF-BB-induced aortic smooth muscle cell proliferation and migration by direct inhibition of focal adhesion kinase. *Biochemical Pharmacology* 89:236-245.

**Song N. R., H. Yang, J. Park, J. Y. Kwon, N. J. Kang, Y. S. Heo, K. W. Lee and H. J.**

**Lee (2012).** Cyanidin suppresses neoplastic cell transformation by directly targeting phosphatidylinositol 3-kinase. *Food Chemistry* 133:658-664.

**Vázquez C. M. G., J. P. Pérez C., J. M. Hernández C., M. D. L. Marrufo D. y E.**

**Martínez R. (2010)** Calidad de grano y de tortillas de maíces criollos del altiplano y valle del mezquital, México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 33:49-56.

**Wang L. S. and G. D. Stoner (2008)** Anthocyanins and their role in cancer prevention.

*Cancer Letters* 269:281-90.

**Wellhausen E. J., L. M. Roberts y E. Hernández X. (1951)** Razas de Maíz en México, su

origen, características y distribución. México D. F.

**Yan Y., J. Chemler, L. Huang, S. Martens and M. A. G. Koffas (2005)** Metabolic

Engineering of Anthocyanin Biosynthesis in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 71:3617-3623.

**Yang Z. and W. Zhai (2010)** Optimization of microwave-assisted extraction of

anthocyanins from purple corn (*Zea mays* L.) cob and identification with HPLC-MS.

*Innovative Food Science & Emerging Technologies* 11:470-476.

**Zhang Y., S. K. Vareed and M. G. Nair (2005)** Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables. *Life Sciences* 76:1465-1472.

**2. Cuantificación de antocianinas mediante espectroscopía de infrarrojo cercano y cromatografía líquida en maíces pigmentados<sup>1</sup>**

**Quantification of anthocyanins through near infrared spectroscopy and liquid chromatography in pigmented maize**

**Juan de Dios Hernández-Quintero<sup>1,2</sup>, Aldo Rosales-Nolasco<sup>2</sup>, Aidé Molina-Macedo<sup>2</sup>, Alejandra Miranda-Piliado<sup>2</sup>, Martha Willcox<sup>2</sup>, Juan M. Hernández-Casillas<sup>3</sup> y Natalia Palacios-Rojas<sup>2\*</sup>**

<sup>1</sup>Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad - Genética, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados. km 36.5 Carr. México-Texcoco. 56230, Montecillo, Texcoco, Estado de México. <sup>2</sup>Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. km 45 Carr. México Veracruz. El Batán. 56130, Texcoco, Edo. de México. <sup>3</sup>Programa de Recursos Genéticos, Campo Experimental Valle de México. km 13.5 Carr. Los Reyes-Texcoco. 56250, Coatlinchán, Texcoco, Estado de México, México.

\*Autor para correspondencia: n.palacios@cgiar.org

---

<sup>1</sup> Enviado a Revista Fitotecnia Mexicana “Cuantificación de antocianinas mediante espectroscopía de infrarrojo cercano y cromatografía líquida en maíces pigmentados”. Recibido 14 de septiembre de 2016. Publicado en Rev. Fitotec. Mex. Vol. 40 (2): X - XX, 2017.

## 2.1. Resumen

El método de espectroscopia de infrarrojo cercano se utiliza ampliamente para la determinación de ciertos compuestos químicos. Actualmente es una herramienta de soporte para los programas de mejoramiento, que permite la determinación de compuestos como proteína, almidón, aceite, humedad y cenizas, entre otros. Un total de 554 muestras pertenecientes a 24 razas de maíz (*Zea mays* L.) pigmentado fueron utilizadas en el desarrollo y validación de modelos matemáticos para la estimación del contenido de antocianinas por espectroscopía de infra-rojo cercano (NIR), a través de la espectroscopía de UV-Vis como método de referencia. Se determinó el perfil de antocianinas mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los más altos contenidos de antocianinas se encontraron en muestras de grano de maíz C11-IXT de Tlaxcala, con hasta 1989.9  $\mu\text{g Pel g}^{-1}$  PS. Los mayores porcentajes de cianidina 3-glucósido, pelargonidina 3-glucósido y peonidina 3-glucósido fueron 48.79 %, 39.84 % y 12.14 %, respectivamente. Muestras de la accesión BOZM342 destacaron por el contenido de cianidina 3-glucósido, que fue de 628.32  $\mu\text{g g}^{-1}$  PS. Se desarrollaron y analizaron 32 modelos de calibración de los cuales destacaron dos por cumplir los parámetros para una calibración de NIR robusta, con altos coeficientes de determinación para las validaciones cruzadas (0.64 y 0.65). Los modelos de NIR presentados en este trabajo se pueden utilizar para la determinación de antocianinas totales y apoyar a los programas de mejoramiento de maíces azules.

**Palabras clave:** *Zea mays*, antocianinas, HPLC, maíz pigmentado, NIR.

## 2.2. Summary

Near infrared reflectance, NIR, is a method largely used for rapid and robust determination of chemical compounds. It is currently used to support breeding programs to analyze protein, oil, starch, moisture and ash content, among others. Five hundred fifty four samples belonging to 24 races of pigmented maize (*Zea mays* L.) were used in the development and validation of mathematical models to estimate anthocyanin content by near-infrared spectroscopy (NIR), using UV-Vis spectroscopy as a reference method. The anthocyanins profile was determined through high performance liquid chromatography (HPLC). The highest anthocyanin contents were found in C11-IXT maize grain samples from Tlaxcala; samples contained up to 1989.97  $\mu\text{g Pel g}^{-1}$  DW. The highest percentages of cyanidin 3-glucoside, pelargonidin 3-glucoside and peonidin 3-glucoside were 48.79 %, 39.84 % and 12.14 %, respectively. Samples of the BOZM342 accession were outstanding for the cyanidin 3-glucoside content of 628.32  $\mu\text{g Pel g}^{-1}$  PS. Thirty two calibration models were developed and analyzed, and two of them fulfilled the parameters for a robust NIR calibration, with high coefficients of determination for cross validations (0.64 and 0.65). The NIR models presented here can be used for the determination of total anthocyanins and provides support for blue maize breeding programs.

**Index words:** *Zea mays*, anthocyanins, HPLC, pigmented maize, NIR.

### 2.3. Introducción

En México, centro de origen y diversidad del maíz (*Zea mays* L.), existen 64 razas de maíz y 23 de ellas tienen variantes de grano pigmentado (CONABIO, 2016). Dentro de las variantes en el color de grano de los maíces pigmentados se encuentran desde el negro, café, rojo hasta rosa pálido, y los maíces rojos y azules son los más comunes (Salinas *et al.*, 2013). Los maíces pigmentados son apreciados por los consumidores debido al color, textura y sabor que imparten al producto procesado, y por lo tanto son utilizados en la preparación de diversos platillos típicos como atoles, tortillas, pozole, totopos, etc. (Fernández *et al.*, 2013). Estos maíces son considerados especiales y, aunque la producción alcanzó solamente 12,916.1 t en el año 2015 (SIAP, 2017), constituyen una fuente de ingreso importante para agricultores en ciertas regiones del país (Hellin *et al.*, 2013). El color rosado, azul, morado y negro de estos maíces está dado por la presencia de antocianinas, las cuales se acumulan principalmente en el pericarpio y la capa de aleurona (Agama-Acevedo *et al.*, 2011). Las antocianinas del tipo cianidina y malvidina se encuentran en maíces azules, morados y negros, mientras que los maíces más rosados contienen pelargonidina, cianidina y malvidina (Salinas-Moreno *et al.*, 2003).

Las antocianinas son compuestos sintetizados por las plantas y se clasifican como flavonoides, que se acumulan en cualquier órgano vegetativo en respuesta a radiación ultravioleta. Su consumo en la dieta humana disminuye el riesgo de padecer enfermedades cardíacas, diabetes, artritis, cáncer, y destaca su alto potencial antioxidante y anti-inflamatorio (Hosoda *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2005). Dada su alta biodisponibilidad, las



antocianinas tienen gran aplicación en productos nutracéuticos y terapéuticos en la industria alimenticia y farmacéutica (Ananga *et al.*, 2013).

Existen diferentes métodos de determinación de antocianinas en matrices alimenticias. La espectroscopía de UV-Vis es el método más utilizado para cuantificar antocianinas totales a una longitud de onda de 465 a 550 nm (He y Giusti, 2010). La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) también se utiliza para la cuantificación del perfil de antocianinas; sin embargo, el tiempo de análisis y el costo es mayor comparado con la espectroscopía de UV-Vis. Un método alternativo es la espectroscopía de infra-rojo cercano (NIR, por sus siglas en inglés), el cual permite analizar un gran número de muestras en corto tiempo sin necesidad de hacer extracción previa de los compuestos. Mediante algoritmos quimiométricos se realizan modelos de calibración basados en los datos analíticos obtenidos por los métodos de referencia (Rosales *et al.*, 2011).

El NIR es un método simple, de bajo costo, que permite obtener los resultados en tiempo real, y es de gran utilidad en programas de mejoramiento donde se debe analizar gran número de muestras en periodos de tiempo relativamente cortos. En maíz, el NIR es utilizado para la determinación de proteína, almidón, aceite, humedad, cenizas y determinación de aminoácidos como lisina y triptófano (Rosales *et al.*, 2011). Cavalcanti *et al.* (2013) desarrollaron un modelo NIR para la determinación de antocianinas en frutos intactos de acai (*Euterpe oleracea* Mart.) y palmitero-juçara (*Euterpe edulis* Mart.). Para maíz no se encontraron reportes. Por lo anterior, los objetivos de este trabajo fueron: 1) desarrollar modelos de calibración en el NIR para antocianinas totales y 2) evaluar el perfil de antocianinas en los maíces analizados.

## **2.4. Materiales y Métodos**

### **2.4.1. Muestras de maíz**

Se utilizaron 254 accesiones de maíz pigmentado, pertenecientes a 24 razas de maíz (Cuadro 4), resguardadas en los bancos de germoplasma del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) y del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Las accesiones fueron clasificadas en grupos según su área de colecta a nivel del mar. Los grupos se incrementaron por polinización controlada en ambientes similares a su origen tropical, sub-tropical o valles altos. Se utilizó un diseño sin réplicas de entrada con testigos replicados y se sembraron en Santa Lucía, Edo. de México; Almoloya, Edo. de México; Celaya, Guanajuato; Tarímbaro, Michoacán e Iguala, Guerrero en el ciclo verano-otoño de 2013, según su ambiente de origen, donde finalmente se realizaron las polinizaciones de forma manual. Adicionalmente, y para la validación del método, se utilizaron 26 muestras de maíces adquiridos de agricultores del estado de Tlaxcala (producto de polinización libre de 2014). Un total de 554 muestras fueron utilizadas para el desarrollo y validación de los métodos aquí presentados.

Cuadro 4. Razas asociadas a las 254 accesiones de maíces pigmentados utilizadas en la cuantificación.

Área de adaptación	Accesiones	Raza
Valles altos	124	Azul, Cristalino Chihuahua, Elotes Occidentales, Vandeño, Elotes Cónicos, Bolita, Negro de Chimaltenango, Celaya, Cónico y Chalqueño.
Tropical	44	Elotes Occidentales, Pepitilla, Bofo, Chococeño, Coscomatepec, Dzit-Bacal, Elotero de Sinaloa, Elotes Cónicos, Nal-Tel, Negrito, Ratón, Tepecintle, Tuxpeño y Vandeño.
Subtropical	86	Elotes Occidentales, Pepitilla, Bofo, Bolita, Chococeño, Cónico, Coscomatepec, Dzit-Bacal, Elotero de Sinaloa, Elotes Cónicos, Mushito, Nal-Tel, Olotillo, Tepecintle, Tuxpeño y Vandeño.

#### 2.4.2. Preparación de las muestras

Con el propósito de desarrollar y validar los métodos analíticos se utilizaron 20 granos al azar por muestra, que fueron molidos en un molino de discos de la marca Perten (Perten, Falling Number 3303, Huddinge, Sweden), con el cual se obtuvieron partículas de aproximadamente 2 mm de diámetro; posteriormente se utilizó un molino ciclónico (Cyclotec™ 1093, FOSS Tecator, Hoganas, Sweden) con una malla de acero inoxidable de 0.5 mm de diámetro.

#### 2.4.3. Determinación de antocianinas totales

El método utilizado se basó en el protocolo descrito por Galicia *et al.* (2012). Para la extracción de antocianinas las muestras previamente molidas se secaron a 65 °C por 16 h a fin de asegurar una humedad homogénea de las mismas. De cada muestra de harina se pesaron 20 mg y se colocaron en un tubo Eppendorf, al que se agregaron 1.5 mL de ácido trifluoroacético (TFA) al 1 %. Los tubos se agitaron en el vortex (Scientific Industries, Genie-2, New York, USA), luego fueron incubados horizontalmente sobre hielo y en agitación a 150 rpm por 90 min. Terminado el tiempo de incubación las muestras se centrifugaron a 15,339 X g durante 5 min. De éstas se transfirieron por duplicado 200 µL del sobrenadante de cada muestra a los pozos de una microplaca y se leyó la absorbancia a 520 nm en un espectrofotómetro de microplacas BioTek® (µQuant MQX200, Winooski, Vermont, USA). Se elaboró una curva patrón de cloruro de pelargonidina de 0 a 15 µg mL<sup>-1</sup> (Sigma-Aldrich Cat. P-1659-10MG CAS 134-04-3) para realizar la estimación del contenido de antocianinas. Los resultados se expresan en µg de pelargonidina (Pel) por g de muestra en peso seco (PS).

#### 2.4.4. Cuantificación de antocianinas glicosiladas

A partir de las 554 muestras previamente molidas se hizo una selección de las 126 con mayor contenido de antocianinas totales determinadas por espectroscopía de UV-Vis para su análisis en HPLC. El análisis del perfil de antocianinas y su cuantificación mediante HPLC fue realizada en un cromatógrafo de líquidos con detector de arreglo de diodos de la marca Alliance Waters (Waters® 2696, Milford, Massachusetts, USA), a través del método descrito por Salinas *et al.* (2012a) con ligeras modificaciones. Las condiciones cromatográficas

fueron: una fase móvil de agua con 0.09 % de TFA a un pH de 2.0, como solvente A, y una mezcla de acetonitrilo-metanol (50:50) con 0.09 % de TFA, como solvente B. Se utilizó una columna Zorbax SB Aq 3.5  $\mu\text{m}$  4.6  $\times$  150 mm (No. Parte: 863953-914) y una pre-columna SecurityGuard™ cartridge kit Phenomenex® (No. Parte: KJ0-4282). El tiempo de elución fue de 20 min a un flujo de 0.4 mL min<sup>-1</sup> y la temperatura de la columna fue de 35 °C.

El volumen de inyección fue de 20  $\mu\text{L}$ . Las antocianinas fueron detectadas a una longitud de onda de 520 nm. Los estándares utilizados fueron cianidina 3-glucósido (Sigma-Aldrich, Cat. 52976 pureza  $\geq$  95 %), pelargonidina 3-glucósido (Sigma-Aldrich, Cat. 79576 pureza  $\geq$  97 %) y peonidina 3-glucósido (Sigma-Aldrich, Cat. 40796 pureza  $\geq$  95 %); cada estándar fue reconstituido con 5 mL de metanol con ácido clorhídrico al 1 % para obtener una concentración de 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; posteriormente se agregó a cada uno 200  $\mu\text{L}$  de metanol acidificado (pH 2). De cada estándar se tomó 1 mL de la solución de 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y se adicionó 1 mL de metanol acidificado para tener una solución stock de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y se procedió a la realización de la curva de calibración, en un rango de concentraciones de 1 a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### 2.4.5. Espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR). Obtención de espectros

La misma harina de las 554 muestras analizadas por espectroscopía de UV-Vis fue utilizada para desarrollar los modelos de calibración de NIR. La humedad se ajustó entre 10 y 11 %, y se escanearon de 2 a 4 g por muestra en un equipo NIRST™ 6500 (monocromador FOSS NIRSystems, Inc., Silver Spring, Maryland, USA) el cual registra las señales de reflectancia difusa, mediante celdas circulares (diámetro interno de 35 mm y profundidad de

8 mm). Los espectros entre 400 y 2500 nm de longitud de onda fueron capturados. Se registró el valor promedio de  $\log(1/R)$  de 400 a 2500 nm a intervalos de 2 nm como un promedio de 32 sub escaneos, donde R fue el valor de reflectancia a cada longitud de onda. Para asegurar que tanto las muestras de la calibración como las de la validación independiente estaban dentro de los mismos intervalos del contenido de antocianinas, las 554 muestras se ordenaron ascendientemente de acuerdo con la concentración de dichos pigmentos y se fueron seleccionando dos para los modelos de calibración y una para la validación. Así, 371 muestras se utilizaron para la realización de las calibraciones y 183 muestras como grupo independiente para validar los modelos.

#### 2.4.6. Pre-tratamiento de los espectros y procedimientos matemáticos para las calibraciones y validación

Las ecuaciones de calibración fueron realizadas mediante el software WinISI™ versión 4.5.0.14017 de Infracsoft International (FOSS NIRSystems, Inc., Silver Spring, Maryland, USA), a través del modelo de regresión lineal de mínimos cuadrados parciales modificado (MPLS, por sus siglas en inglés) y técnicas de validación cruzada. Previo a la regresión MPLS fueron aplicados tratamientos matemáticos y de derivación, de los que se registraron los mejores resultados con las combinaciones 0, 0, 1, 1 y 1, 4, 4, 1; donde, el primer número corresponde al grado de derivación, el segundo número es el espacio entre cada punto de los datos, y el tercero y cuarto son los puntos utilizados para el suavizado. Adicionalmente, un algoritmo de ajuste Detrend fue aplicado, el cual consiste en restar la media o la línea de mayor ajuste de los datos para reducir los efectos de radiación dispersa.

La desviación estándar (SDc) y el error estándar de laboratorio (SEL) de las muestras utilizadas para la calibración fueron calculadas, y se reportó el porcentaje de muestras anómalas que fueron omitidas para la realización de las calibraciones (valores atípicos), además de los términos utilizados en los modelos con la regresión lineal de mínimos cuadrados parciales modificados. Los coeficientes de determinación de la calibración ( $R^2c$ ) y de la validación independiente ( $R^2vi$ ) fueron calculados, además de la desviación estándar del grupo de validación independiente (SDgvi) y de los valores obtenidos en la validación para cada modelo (SDvi).

Adicionalmente, el cociente de la desviación de desempeño (Radio Performance Deviation, RPD, por sus siglas en inglés) fue determinado tras dividir SDvi entre el SEP (Error Estándar de Predicción), ya que la calidad y robustez de la calibración NIRS también puede ser evaluada con este parámetro; un valor menor a 2 indicaría una calibración poco confiable (Chang *et al.*, 2001).

#### 2.4.7. Análisis estadístico

Adicional a los análisis estadísticos descritos anteriormente, para la elaboración y validación de los modelos para el NIR, se utilizó el lenguaje y ambiente para cómputo estadístico R (R Core Team, 2015) para determinar los coeficientes de correlación  $r$  de Pearson de los métodos de cuantificación de antocianinas.

## 2.5. Resultados y Discusión

### 2.5.1. Antocianinas totales

El contenido de antocianinas totales de las muestras osciló de 2.52 a 1989.97  $\mu\text{g Pel g}^{-1}$  PS (Figura 3), con un promedio de 281.01  $\mu\text{g Pel g}^{-1}$  PS. Lo anterior muestra una alta variabilidad dentro de las muestras analizadas, con contenidos superiores a los reportados previamente en grano de maíz (Camelo-Méndez *et al.*, 2016; Espinosa *et al.*, 2009; Salinas-Moreno *et al.*, 2012b; Urias-Lugo *et al.*, 2015; Žilić *et al.*, 2012). Diez muestras superaron los 1000  $\mu\text{g Pel g}^{-1}$  PS, en las que destacaron las accesiones de Tlaxcala C11-IXT, C08-IXT y C10-IXT, con concentraciones de 1989.97, 1952.49 y 1741.89  $\mu\text{g Pel g}^{-1}$  PS, respectivamente. Salinas *et al.* (2012b) reportaron el contenido de antocianinas en 18 muestras recolectadas en el Estado de México, Ciudad de México y Oaxaca, con valores promedio de 579.4 a 1046.1, 997.8 a 1332.2 y 304.1 a 528.0  $\mu\text{g Pel g}^{-1}$  PS para las razas Chalqueño, Elotes cónicos y Bolita, respectivamente. En el presente estudio se encontraron contenidos más bajos para las razas Chalqueño, Elotes cónicos y Bolita, con 256.3, 336.4 y 89.7 a 242.0  $\mu\text{g Pel g}^{-1}$  PS, respectivamente.



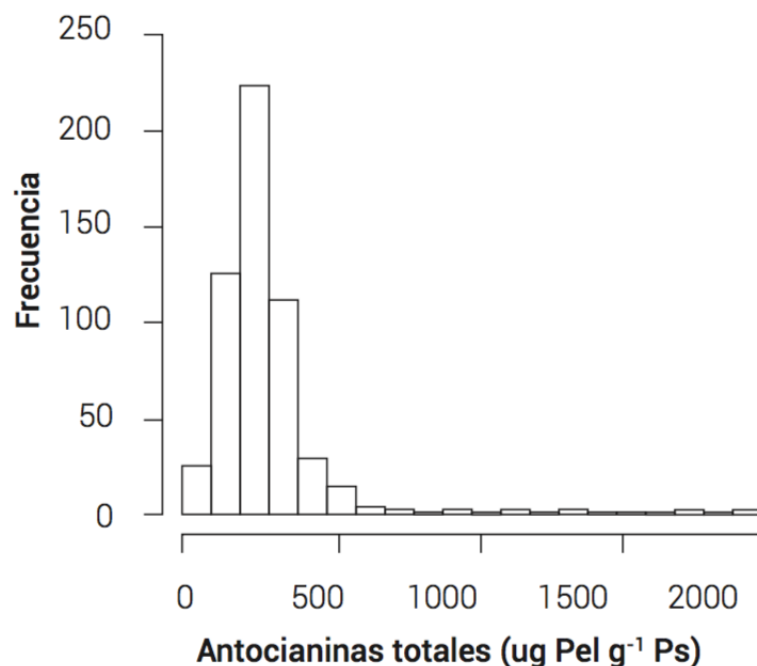


Figura 3. Distribución del contenido de antocianinas totales por espectroscopía de UV-Vis en 554 muestras de maíz pigmentado.

### 2.5.2. Perfil de antocianinas glicosiladas

Cianidina 3-glucósido, pelargonidina 3-glucósido y peonidina 3-glucósido fueron las tres antocianinas glicosiladas observadas en el perfil de HPLC (Cuadro 5). Cianidina 3-glucósido fue la antocianina encontrada en mayor cantidad, con una media de 154.6  $\mu\text{g g}^{-1}$  PS, lo que coincide con reportes previos en granos de maíz púrpura y magenta (Salinas *et al.*, 2013; Salinas Moreno *et al.*, 2003). La accesión de Tlaxcala C11-IXT presentó 1989.9  $\mu\text{g Pel g}^{-1}$  PS de antocianina total, con una distribución de 28.1 % de cianidina 3-glucósido, 1.0 % de pelargonidina 3-glucósido y 7.1 % de peonidina 3-glucósido. La muestra perteneciente a la accesión BOZM342, color púrpura muy intenso, destacó en el contenido de cianidina 3

glucósido, con una concentración de 628.3  $\mu\text{g g}^{-1}$  PS (Figura 4). Estos resultados sugieren un potencial para estos maíces como fuentes de nutraceuticos. Se ha reportado, por ejemplo, que cianidina-3-glucósido ayuda al tratamiento contra la inflamación intestinal y se ha demostrado que esta antocianina es eficaz para la inhibición de las marcadoras pro-inflamatorias producidas por citoquinas (Serra *et al.*, 2013).

Cuadro 5. Cuantificación por HPLC de antocianinas glicosiladas.

Antocianina	Promedio ( $\mu\text{g g}^{-1}$ PS)	Valor máximo ( $\mu\text{g g}^{-1}$ PS)	Valor mínimo ( $\mu\text{g g}^{-1}$ PS)
Cianidina 3-glucósido	154.69	628.32	24.10
Pelargonidina 3-glucósido	14.33	521.14	0.62
Peonidina 3-glucósido	25.45	158.83	10.37

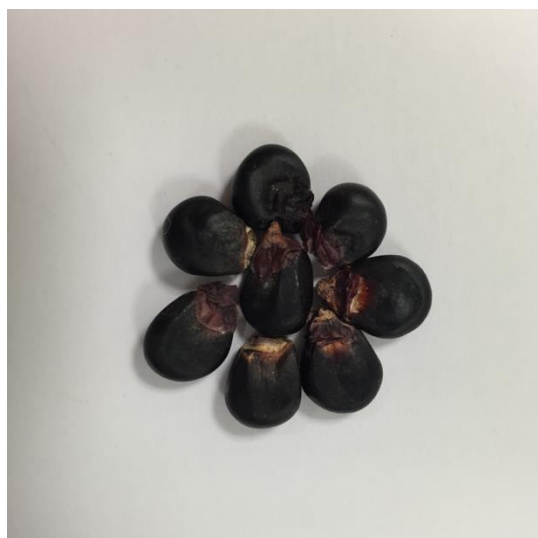


Figura 4. Granos de color púrpura en la accesión BOZM342.

### 2.5.3. Modelo de calibración de NIR

Se realizaron 32 calibraciones para el NIR, de las cuales cuatro tuvieron un  $R^2c$  superior a 0.7. El porcentaje de datos atípicos eliminados con los criterios dados en las calibraciones fue bajo (de 3.5 a 5.1 %), lo cual sugiere que las ecuaciones son robustas. En la Cuadro 6 se presentan los resultados de las dos mejores calibraciones llamadas at04 y at22. Los coeficientes de determinación de validaciones cruzadas fueron ligeramente menores con respecto a los  $R^2c$ , 0.64 y 0.65, para at04 y at22, respectivamente.

Cuadro 6. Valores de referencia obtenidos por espectrofotometría y validación cruzada para contenido de antocianinas totales (TAC).

Modelo	Grupo de calibración					Validación cruzada		$R^2c^*$
	N	Intervalo	Promedio	SDc <sup>†</sup>	SEL <sup>††</sup>	% Valores atípicos <sup>*</sup>	MPLS terms <sup>**</sup>	
at04						3.5	11	0.7068
at22	371	2.5 - 1989.9	290.6	204.8	19.9	5.1	9	0.7757

Modelo	Grupo de validación				Validación independiente					
	N	Intervalo	Promedio	SDgvi <sup>‡</sup>	Intervalo	Promedio	SDvi <sup>§</sup>	$R^2vi^¶$	SEP <sup>‡</sup>	RPD <sup>‡‡</sup>
at04					0 - 925.1	266	115.90	0.7698	39.90	2.90
at22	183	3.9 - 1237.7	280.6	153.50	0 - 964.8	266.8	120.10	0.7758	39.90	3.01

<sup>†</sup> SDc: desviación estándar del grupo de calibración; <sup>††</sup> SDvc: desviación estándar de la validación cruzada; <sup>‡</sup>SEC: error estándar de la calibración; <sup>¶¶</sup> $R^2cv$ : coeficiente de determinación de la validación cruzada; <sup>§</sup>SECV: error estándar de la validación cruzada; <sup>‡‡</sup>RPD: cociente de la desviación de desempeño.

Se realizó una validación independiente con 183 muestras. Los coeficientes de determinación obtenidos de 0.7698 y 0.7758 (Figura 5), para at04 y at22, respectivamente, fueron superiores a los obtenidos en la validación interna y similares a coeficientes de determinación obtenidos en la validación de ecuaciones NIR para la cuantificación de

contenido total de antocianinas (TAC) en flores y frutos (Cavalcanti *et al.*, 2013; Xiaowei *et al.*, 2014); para maíz no se encontraron reportes. El intervalo de predicción abarcó el 74.9 y 78.2 % del calculado en el grupo de validación (Cuadro 6); el porcentaje que no está dentro del intervalo es debido a las muestras con los valores más altos de TAC, las cuales fueron identificadas como valores atípicos. Adicionalmente, los valores RPD obtenidos (2.9 y 3.0) indican que los modelos son lo suficientemente robustos para monitorear el contenido total de antocianinas en muestras de maíz, especialmente para apoyar las etapas iniciales de los programas de mejoramiento (Cuadro 6). Estos resultados de los modelos de calibración son similares a los obtenidos para la cuantificación de lisina y triptófano en muestras de harina de maíz blanco (Rosales *et al.*, 2011) y que actualmente se utilizan para apoyar los programas de mejoramiento de maíz de alta calidad proteica (Twumasi- Afriyie *et al.*, 2016).

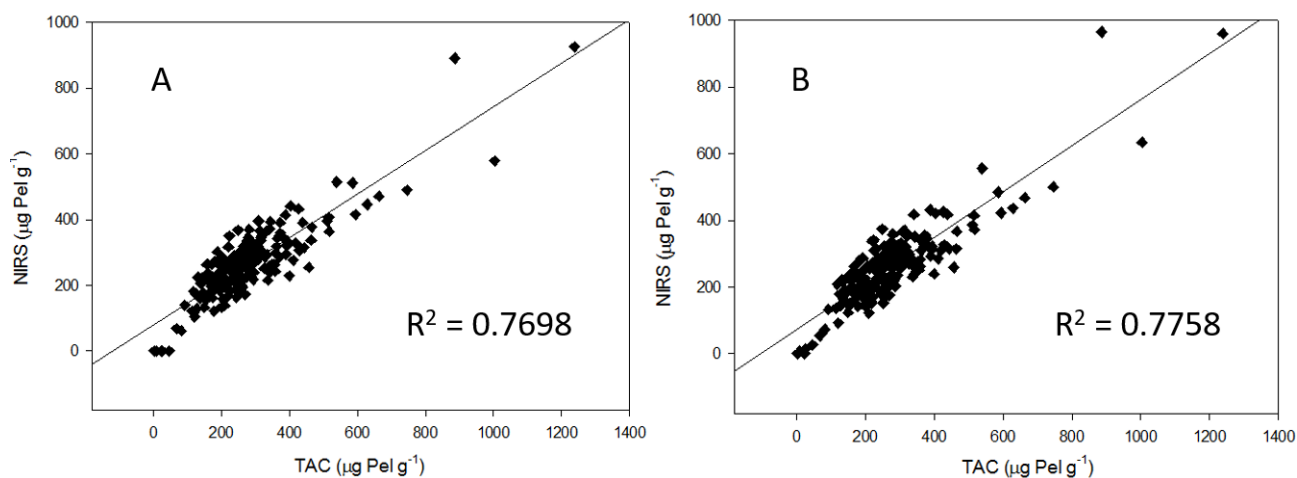


Figura 5. Regresiones lineales de TAC y NIRS de 183 muestras, calibración at04 (A) y at22 (B).

#### 2.5.4. Correlación entre los métodos utilizados para la cuantificación de antocianinas

Correlaciones significativamente altas fueron obtenidas entre los datos de antocianinas totales obtenidos por el NIR y los obtenidos por espectroscopía de UV-Vis y HPLC, de 0.825 y 0.827, respectivamente, lo que confirma la utilidad de este método para la cuantificación de antocianinas en maíces pigmentados.

## **2.6. Conclusiones**

Los dos modelos propuestos para NIR son robustos dados los valores de SEP, SD<sub>vi</sub>, R<sup>2</sup><sub>vi</sub> y RPD obtenidos. Estos modelos de NIR para antocianina brindan una alternativa rápida y de bajo costo para la determinación de antocianinas totales. Los resultados obtenidos en los métodos de análisis de antocianinas estuvieron altamente correlacionados entre sí. El método por HPLC es una herramienta muy importante para la caracterización y cuantificación de antocianinas individuales; sin embargo, su alto costo, necesidad de equipo y personal especializado hacen que sea un método más complejo comparado con el NIR. Todas las muestras analizadas presentaron cianidina-3-glucósido, pelargonidina-3-glucósido y peonidina-3-glucósido en el perfil de HPLC, en la que cianidina-3-glucósido fue la antocianina encontrada en mayor cantidad.

## **2.7. Agradecimientos**

Este trabajo ha sido parcialmente cubierto por el programa “MASAGRO: Modernización sustentable de la agricultura tradicional” y por Kellogg’s. El primer autor es apoyado por una beca de doctorado de CONACYT en el Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad - Genética (COLPOS Campus Montecillo). Agradecemos a los Drs. Ricardo

Ernesto Preciado Ortiz, Gilberto Esquivel Esquivel, Víctor Antonio Vidal Martínez, Noel Orlando Gómez Montiel, MSc. Arturo Daniel Terrón Ibarra, Humberto L. Vallejo Delgado, Armando Guadarrama Espinoza, Enrique Rodríguez Chanona, Daniel Chepetla Calderón, Javier Manjarrez Juárez y a todo el equipo involucrado en hacer polinizaciones a mano para formar el material usado en el experimento en las estaciones experimentales del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Productores de Semillas de Copandero e Investigación y Capacitación Agropecuaria (ICAMEX). Agradecemos a los Drs. Terrance Molnar y Sarah Hearne y a el M. C. Daniel Díaz Mora y a todo el personal del laboratorio de calidad de maíz del CIMMYT por su colaboración, muestras de maíz de Tlaxcala e información de pasaporte del material utilizado.

## 2.8. Bibliografía

**Agama-Acevedo E., Y. Salinas-Moreno, G. Pacheco-Vargas y L. A. Bello-Pérez (2011)**

Características físicas y químicas de dos razas de maíz azul: morfología del almidón.

*Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2:317-329.

**Ananga A., V. Georgiev, J. Ochieng, B. Phills and V. Tsolova (2013)** Production of

anthocyanins in grape cell cultures: a potential source of raw material for

pharmaceutical, food, and cosmetic industries. In: *The Mediterranean Genetic Code*

- Grapevine and Olive. D. Poljuha and B. Sladonja (eds.). InTech. Rijeka, Croatia.

pp:247- 287.

**Camelo-Méndez G. A., M. J. Jara-Palacios, M. L. Escudero-Gilete, B. Gordillo, D.**

**Hernanz, O. Paredes-López, P. E. Vanegas-Espinoza, A. A. Del Villar-Martínez**

**and F. J. Heredia (2016)** Comparative study of phenolic profile, antioxidant

capacity, and color-composition relation of roselle cultivars with contrasting

pigmentation. *Plant Foods for Human Nutrition* 71:109-114.

**Cavalcanti I. M. R., K. M. Gomes L., V. Garcia L., J. D. Cruz P. and G. H. de Almeida**

**T. (2013)** Total anthocyanin content determination in intact açai (*Euterpe oleracea*

Mart.) and palmitero-juçara (*Euterpe edulis* Mart.) fruit using near infrared

spectroscopy (NIR) and multivariate calibration. *Food Chemistry* 136:1160-1164.

**Chang C. W., D. A. Laird, M. J. Mausbach and C. R. Hurburgh (2001)** Near-infrared

reflectance spectroscopy – principal components regression analyses of soil

properties. *Soil Science Society of America Journal* 65:480-490.

**CONABIO, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (2016)**

Razas de maíz en México. <http://www.biodiversidad.gob.mx/usos/maices/razas2012.html> (Mayo 2016).

**Espinosa T. E., M. C. Mendoza C., F. Castillo G., J. Ortiz C., A. Delgado A. y 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* 32:303-309.

**Fernández S. R., L. A. Morales C. y A. Gálvez M. (2013)** Importancia de los maíces

nativos de México en la dieta nacional. Una revisión indispensable. *Revista Fitotecnia Mexicana* 36:275-283.

**Galicia L., A. Miranda, M. G. Gutiérrez, O. Custodio, A. Rosales, N. Ruíz, R. Surlless y**

**N. Palacios (2012)** Protocolos de Laboratorio 2012. Laboratorio de Calidad Nutricional de Maíz y Análisis de Tejido Vegetal. CIMMYT. México, D.F. 50 p.

**He J. and M. M. Giusti (2010)** Anthocyanins: natural colorants with health-promoting

properties. *Annual Review of Food Science and Technology* 1:163-187.

**Hellin J., A. Keleman, D. López, L. Donnet y D. Flores (2013)** La importancia de los

nichos de mercado. Un estudio de caso del maíz azul y del maíz para pozole en México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 36:315-328.

**Hosoda K., M. Miyaji, H. Matsuyama, S. Haga, H. Ishizaki and K. Nonaka (2012)** Effect

of supplementation of purple pigment from anthocyanin-rich corn (*Zea mays* L.) on blood antioxidant activity and oxidation resistance in sheep. *Livestock Science* 145:266-270.



- R Core Team (2015)** R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/> (Marzo 2016).
- Rosales A., L. Galicia, E. Oviedo, C. Islas and N. Palacios-Rojas (2011)** Near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for protein, tryptophan, and lysine evaluation in quality protein maize (QPM) breeding programs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59:10781-10786.
- Salinas-Moreno Y., F. Martínez-Bustos, M. Soto-Hernández, R. Ortega-Paczka y J. L. Arellano-Vázquez (2003)** Efecto de la nixtamalización sobre las antocianinas del grano de maíces pigmentados. *Agrociencia* 37:617-628.
- Salinas M. Y., F. J. Cruz C., S. A. Díaz O. y F. Castillo G. (2012a)** Granos de maíces pigmentados de Chiapas, características físicas, contenido de antocianinas y valor nutracéutico. *Revista Fitotecnia Mexicana* 35:33-41.
- Salinas-Moreno Y., J. J. Pérez-Alonso, G. Vázquez-Carrillo, F. Aragón-Cuevas y G. A. Velázquez-Cardelas (2012b)** Antocianinas y actividad antioxidante en maíces (*Zea mays* L.) de las razas Chalqueño, Elotes Cónicos y Bolita. *Agrociencia* 46:693-706.
- Salinas M. Y., C. García S., B. Coutiño E. y V. A. Vidal M. (2013)** Variabilidad en contenido y tipos de antocianinas en granos de color azul/ morado de poblaciones mexicanas de maíz. *Revista Fitotecnia Mexicana* 36:285-294.
- Serra D., J. Paixão, C. Nunes, T. C. P. Dinis and L. M. Almeida (2013)** Cyanidin-3-glucoside suppresses cytokine-induced inflammatory response in human intestinal cells: comparison with 5-aminosalicylic acid. *PLoS ONE* 8:e73001, doi:10.1371/journal.pone.0073001.

- SIAP, Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (2017)** Agricultura: Producción Anual: Cierre de la producción agrícola por cultivo. SAGARPA. México. [http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola\\_siap\\_gb/ientidad/index.jsp](http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/ientidad/index.jsp) (Marzo 2017).
- Twumasi-Afriyie S., N. Palacios-Rojas, D. Friesen, A. Teklewold, D. Wegary, H. De Groote and B. M. Prasanna (2016)** Guidelines for the Quality Control of Quality Protein Maize (QPM) Seed and Grain. Technical Bulletin. CIMMYT. Addis Ababa, Ethiopia. 38 p.
- Urias-Lugo D. A., J. B. Heredia, M. D. MuyRangel, J. B. Valdez-Torres, S. O. Serna-Saldívar and J. A. Gutiérrez-Urbe (2015)** Anthocyanins and phenolic acids of hybrid and native blue maize (*Zea mays* L.) extracts and their antiproliferative activity in mammary (MCF7), Liver (HepG2), colon (Caco2 and HT29) and prostate (PC3) cancer cells. *Plant Foods for Human Nutrition* 70:193-199.
- Xiaowei H., Z. Xiaobo, Z. Jiewen, S. Jiyong, Z. Xiaolei and M. Holmes (2014)** Measurement of total anthocyanins content in flowering tea using near infrared spectroscopy combined with ant colony optimization models. *Food Chemistry* 164:536-543.
- Zhang Y., S. K. Vareed and M. G. Nair (2005)** Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables. *Life Sciences* 76:1465-1472.
- Žilić S., A. Serpen, G. Akilloğlu, V. Gökmen and J. Vančetović (2012)** Phenolic compounds, carotenoids, anthocyanins, and antioxidant capacity of colored maize (*Zea mays* L.) kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60:1224-1231.

### **3. Population structure and genetic diversity among accessions of mexican native blue maize**

#### **Estructura poblacional y diversidad genética entre accesiones de maíz azul nativo de México**

**Juan de Dios Hernández-Quintero<sup>1,2</sup>, Sarah Hearne<sup>2\*</sup>, Serafín Cruz-Izquierdo<sup>1</sup>,  
Amalio Santacruz-Varela <sup>1</sup>, Jorge Franco <sup>2</sup>, Juan M. Hernández-Casillas<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad - Genética, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados. km 36.5 Carr. México-Texcoco. 56230, Montecillo, Texcoco, Estado de México. <sup>2</sup>Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. km 45 Carr. México Veracruz. El Batán. 56130, Texcoco, Edo. de México. <sup>3</sup>Programa de Recursos Genéticos, Campo Experimental Valle de México. km 13.5 Carr. Los Reyes-Texcoco. 56250, Coatlinchán, Texcoco, Estado de México, México.

\*Autor para correspondencia: s.hearne@cgiar.org

### 3.1. Summary

Mexico is considered the center of origin and diversity of maize (*Zea mays* L.), with 59 races of maize, 23 of them reported with variants of pigmented grain. Due to the importance of cultural and economic of this crop to study genetic diversity in pigmented maize accessions is of great importance since it would allow us to understand the structure of the Mexican populations of blue corn. A collection of 150 blue maize accessions belonging to 16 races from INIFAP and CIMMYT germplasm banks is used for this study. A total of 235 580 alleles were identified by the DArTseq platform with an average of effective alleles per locus of 1.241. Obtained genetic diversity indices showed a range of *He* 0.0000174 to 0.5 (average 0.1498) and a range of 0.0001587 to 1.0 for *Sh* (half 0.3467). The retrieved average inbreeding coefficient was - 5.1220 and genetic distance matrix had an average of 0.2317, a minimum value of 0.1367 and a maximum of 0.2725 among the accessions in the collection. The cluster analysis presented a coefficient of agglomeration was 0.86, indicating a strong connection from the group showing the integration of four groups ( $k = 4$ ) formed in the following way: Group 1 with 66 accessions, group 2 with three accessions, Group 3 Group 4 with 16 accessions with 65 accessions. The Mantel test presented a low correlation ( $R = 0.1121$ ,  $P = 0.021$ ) between genetic and geographic distances which could indicate the probable existence of a isolation pattern by distance, which suggests that the divergence in the collection is not caused by the geographic isolation of the Collections. Earlier results showed a wide genetic diversity among the 150 pigmented maize accessions studied, as indicated by the estimated genetic parameters. The results indicate a high genetic structure and the presence of accessions with a complex genetic structure, with the races Azul, Cónico, Elotero de Sinaloa, Elotes Cónicos, Tepecintle and Tuxpeño grouped in different clusters.

There was a low correlation between genetic and geographic distance matrices, which implies the lack of isolation by distance, and suggests a continuous flow of genes between the sites where the collections, were producing a complex genetic structure.

**Key words:** *Zea mays*, anthocyanins, pigmented corn, genetic diversity, genetic and geographical distances.

### 3.2. Resumen

México es considerado centro de origen y diversidad del maíz (*Zea mays* L.), contando con 59 razas de maíz, 23 de ellas reportadas con variantes de grano pigmentado. Debido a la importancia cultural y económica de este cultivo estudiar la diversidad genética en accesiones de maíz pigmentado es de gran importancia ya que nos permitiría entender la estructura de las poblaciones mexicanas de maíz azul. Para este estudio se utilizó una colección de 150 accesiones de maíz azul pertenecientes a 16 razas provenientes de los bancos de germoplasma del INIFAP y CIMMYT. Se identificaron mediante la plataforma DArTseq un total de 235 580 alelos con un promedio de alelos efectivos por locus de 1,241. Los índices de diversidad genética obtenidos mostraron un rango de *He* de 0.0000174 a 0.5 (media 0.1498) y un rango de 0.0001587 a 1.0 para *Sh* (media 0.3467). El coeficiente de endogamia promedio obtenido fue de - 5.1220 y la matriz de distancias genéticas tuvo un promedio de 0.2317, un valor mínimo de 0.1367 y un máximo de 0.2725 entre las accesiones de la colección. El análisis de agrupamiento presento un coeficiente de aglomeración de 0.86, lo que indica una fuerte conexión de la agrupación mostrando la integración de cuatro grupos ( $k = 4$ ) formados de la siguiente manera: Grupo 1 con 66 accesiones, Grupo 2 con tres accesiones, Grupo 3 con 16 accesiones y Grupo 4 con 65 accesiones. La prueba de Mantel presento una baja correlación

( $R = 0.1121$ ,  $P = 0.021$ ) entre distancias genéticas y geográficas lo que podría indicar la probable existencia de un patrón de aislamiento por distancia, lo que sugiere que la divergencia en la colección no es causada por el aislamiento geográfico de las colecciones. Los resultados anteriores mostraron una amplia diversidad genética entre las 150 accesiones de maíz pigmentado estudiadas, según lo indicado por los parámetros genéticos estimado. Los resultados indican una alta estructura genética y la presencia de accesiones con una estructura genética compleja, con las razas Azul, Cónico, Elotero de Sinaloa, Elotes Cónicos, Tepecintle y Tuxpeño agrupadas en diferentes conglomerados. Hubo baja correlación entre las matrices de distancia geográfica y genética, lo que implica la falta de aislamiento por la distancia y sugiere un flujo continuo de genes entre los sitios donde se realizaron las colecciones, produciendo una estructura genética compleja.

**Palabras clave:** *Zea mays*, antocianinas, maíz pigmentado, diversidad genética, distancias genéticas y geográficas.

### 3.3 Introduction

There are 59 races of maize (Bellon *et al.*, 2009; Sanchez *et al.*, 2000) in Mexico, the center of origin and diversity of maize (*Zea mays* L.), 23 of those races have variants of pigmented grain. All maize types belong to the same species, and the races are not a formal botanical classification. Different types of maize possess diversity of shapes, sizes, colors, textures and adaptation to different environments, resulting in many traditional landraces. Variations in color of the pigmented maize grains range from white, yellow, red to pale pink; being black and blue the most common colors (Salinas *et al.*, 2013). White color is due to the absence of pigment, yellow is due to content of carotenes and the colors red, pale pink, black and blue are due to anthocyanins (Espinosa *et al.*, 2009). The pigmented maizes are

appreciated by consumers due to the colour, texture and flavour that they impart to the processed product, and are therefore used in the preparation of various dishes such as atole, tortilla, pozol, corn chips, etc. (Fernández *et al.*, 2013). These maize varieties are considered specialty corns, and total production of blue grain in Mexico reached 12 916.1 tons in 2015 with a yield of 1.73 t ha<sup>-1</sup> (SIAP, 2017). Cultivation of pigmented maize constitutes a source of important income for farmers in certain regions of the country (Hellin *et al.*, 2013). Red, blue, purple and black color of these maize varieties is given by the presence of anthocyanins, which accumulate mainly in the pericarp and aleurone layer (Agama-Acevedo *et al.*, 2011). Cyanidin and malvidin types of anthocyanins are present in blue, purple and black maize while more pink or red maize contain malvidin, cyanidin and pelargonidin (Salinas-Moreno *et al.*, 2003).

Morphological and genetic studies have revealed the existence of great diversity in the Mexican maize populations (Bellon *et al.*, 2009) both within and between races. Nevertheless, there are populations that contain low levels of diversity due to the narrow farmer selection and abandonment of the use of native varieties to substitute them for varieties improved.

Studies based on molecular markers to characterize genetic diversity in germplasm of landraces are increasingly common. The estimation of the genetic similarity appears to be effective for assessing genetic diversity among types of maize; but beyond this, there have been studies in breeding programs that intend to group maize germplasm based on their genetic similarity with the purpose of detecting heterotic groups (Peñaranda and Navas,

2005) and also to be more efficient in selecting individuals based on their genotype to mitigate the effects of genotype-environment, which is an inconsistency in the performance of genotypes across different environments. The distribution of genetic diversity in maize often presents a design of isolation by distance which means that nearer populations resemble more to each other than distant populations (Bellon *et al.*, 2009).

Currently, studies of genetic diversity are increasingly being carried out through the application of next-generation sequencing approaches. These methods allow sequencing multiple individuals with larger coverage in each one, which allows researchers to be more efficient in studies applied into cross-pollinated species (Elshire *et al.*, 2011). The use of this strategy in breeding programs takes advantage of the large number of readings and larger coverage through the imputation of genotype to exploit the information of pedigrees and population-wide linkage disequilibrium (Lindner, 2012; Pausch *et al.*, 2013).

In that respect, several studies address the determination of anthocyanins and their stability in pigmented maize, but no reports were found on studies of population structure and genetic diversity with these new tools in maize pigmented in Mexico (Cortéz *et al.*, 2006; Gorriti *et al.*, 2009; López and Baeza, 2010; Salinas *et al.*, 2013; Salinas-Moreno *et al.*, 2012). A study of genetic diversity in pigmented maize accessions is of great importance since it would allow us to understand the structure of Mexican blue maize populations and to use individuals with the largest genetic diversity in breeding programs. Therefore, the objectives of this study were 1) to determine the population structure and genetic diversity of 150 blue maize accessions and 2) to determine genetic and geographical correlations in the collection of pigmented corns.



### **3.4. Materials and Methods**

#### 3.4.1. Genetic material

A collection of 150 pigmented maize accessions (Cuadro 7), belonging to 16 races held at the genebanks of the Centro Internacional de Mejoramiento Maíz y trigo (CIMMYT) and Instituto Nacional de Investigadores Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) was used. The extraction of DNA from the samples was obtained from leaves of plants grown at the experimental field of INIFAP in Celaya (Guanajuato, México) for the accessions taken from INIFAP, while for the accessions from CIMMYT, DNA was extracted from seedlings grown under greenhouse conditions. For each accession, the DNA was extracted from 30 plants taking a 10 cm of plant tissues, and stored at -80 °C prior to lyophilisation. The extraction of DNA was performed by following the protocol described at <http://hdl.handle.net/11529/10034>. Samples of DNA were sent to the laboratory of Analisis Genético para la Agricultura (Genetic Analysis for agriculture) at CIMMYT for DArTseq (<http://www.diversityarrays.com/software.html#dartsoft>) genotyping.

Cuadro 7. A collection of 150 pigmented maize accessions used in the study of genetic diversity. Origin CIMMYT (C), INIFAP (I).

ID	GID	Races	Origin	ID	GID	Races	Origin
X48910	5943	Tuxpeño	C	X49008	300538	Elotes Cónicos	I
X48911	249122	NA	C	X49009	300539	Elotes Cónicos	I
X48919	28366	Elotes Occidentales	C	X49010	300540	Elotes Cónicos	I
X48922	244877	Elotes Occidentales	C	X49011	300541	Elotes Cónicos	I
X48929	258611	Azul	C	X49012	300542	Elotes Cónicos	I
X48931	26020	Elotes Cónicos	C	X49013	300543	Elotes Cónicos	I
X48934	243404	Elotes Occidentales	C	X49014	300544	Elotes Cónicos	I
X48940	255265	Azul	C	X49015	300545	Elotes Cónicos	I
X48943	27234	Elotes Cónicos	C	X49016	300546	Elotes Cónicos	I
X48946	243556	Elotes Cónicos	C	X49017	300547	Elotes Cónicos	I
X48952	258668	Azul	C	X49018	300548	Elotes Cónicos	I
X48965	20579	Azul	C	X49019	300549	Elotes Cónicos	I
X48966	258536	Elotes Cónicos	C	X49020	300550	Elotes Cónicos	I
X48976	258641	Azul	C	X49021	300551	Elotes Cónicos	I
X48978	27295	Elotes Cónicos	C	X49022	300552	Elotes Cónicos	I
X48979	248841	Elotes Cónicos	C	X49023	300553	Elotes Cónicos	I
X48987	500	Vandeño	C	X49024	300554	Elotes Cónicos	I
X48988	258640	Azul	C	X49025	300555	Elotes Cónicos	I
X48989	248146	Cristalino Chihuahua	C	X49026	300556	Elotes Cónicos	I
X48994	261314	Nal-Tel	C	X49027	300557	Elotes Cónicos	I
X49003	258431	Elotes Cónicos	C	X49028	300558	Elotes Cónicos	I
X49065	243671	Elotes Occidentales	C	X49029	300559	Elotes Cónicos	I
X49070	243499	NA	C	X49030	300612	Elotes Occidentales	I
X49076	257886	Bolita	C	X49031	300561	Elotes Cónicos	I
X49358	30081	TEPECINTLE	C	X49032	300613	Elotes Occidentales	I
X48826	300534	Bolita	I	X49033	300563	Elotes Cónicos	I
X48838	300609	Elotes Occidentales	I	X49034	300619	Elotes Cónicos	I
X48850	300610	Elotes Occidentales	I	X49035	300565	Elotes Cónicos	I
X48862	300533	Bolita	I	X49036	300566	Elotes Cónicos	I
X48874	300620	Elotes Cónicos	I	X49037	300567	Elotes Cónicos	I
X48886	300621	Cónico	I	X49038	300568	Elotes Cónicos	I
X48912	300625	Tuxpeño	I	X49039	300569	Elotes Cónicos	I
X48915	300649	Elotes Occidentales	I	X49040	300570	Elotes Cónicos	I
X48916	300655	Coscomatepec	I	X49041	300571	Elotes Cónicos	I

X48921	300527	Azul	I	X49042	300572	Elotes Cónicos	I
X48924	300626	Tepecintle	I	X49043	300573	Elotes Cónicos	I
X48925	300634	Tuxpeño	I	X49044	300574	Elotes Cónicos	I
X48926	300642	Elotes Occidentales	I	X49045	300575	Elotes Cónicos	I
X48927	300650	Pepitilla	I	X49046	300576	Elotes Cónicos	I
X48933	300528	Azul	I	X49047	300577	Elotes Cónicos	I
X48936	300627	Tepecintle	I	X49048	300578	Elotes Cónicos	I
X48937	300635	Tuxpeño	I	X49049	300579	Elotes Cónicos	I
X48938	300643	Elotero de Sinaloa	I	X49050	300580	Elotes Cónicos	I
X48939	300651	Elotes Cónicos	I	X49051	300614	Elotes Occidentales	I
X48945	300529	Azul	I	X49052	300615	Elotes Occidentales	I
X48948	300628	Tepecintle	I	X49053	300581	Elotes Cónicos	I
X48949	300636	Tuxpeño	I	X49054	300582	Elotes Cónicos	I
X48950	300644	Elotero de Sinaloa	I	X49055	300583	Elotes Cónicos	I
X48951	300652	Coscomatepec	I	X49056	300616	Bolita	I
X48957	300530	Azul	I	X49057	300585	Elotes Cónicos	I
X48960	300629	Tepecintle	I	X49058	300586	Elotes Cónicos	I
X48961	300637	Tuxpeño	I	X49059	300587	Elotes Cónicos	I
X48962	300645	Elotero de Sinaloa	I	X49060	300588	Celaya	I
X48963	300653	Coscomatepec	I	X49061	300589	Elotes Occidentales	I
X48968	300523	NA	I	X49067	300617	Bolita	I
X48969	300531	Azul	I	X49080	300590	Elotes Occidentales	I
X48971	300623	Tuxpeño	I	X49081	300618	Elotes Cónicos	I
X48972	300630	Tepecintle	I	X49082	300592	Elotes Occidentales	I
X48973	300638	Tuxpeño Negro	I	X49083	300593	Elotes Occidentales	I
X48974	300646	Elotes Occidentales	I	X49084	300594	Elotes Occidentales	I
X48975	300654	Coscomatepec	I	X49085	300595	Elotes Occidentales	I
X48980	300524	NA	I	X49086	300596	Elotes Occidentales	I
X48981	300532	Azul	I	X49087	300597	Elotes Occidentales	I
X48984	300631	Tepecintle	I	X49088	300598	Elotes Occidentales	I
X48985	300639	Elotero de Sinaloa	I	X49089	300599	Elotes Occidentales	I
X48986	300647	Elotes Occidentales	I	X49090	300600	Elotes Occidentales	I
X48992	300525	NA	I	X49091	300622	Elotes Cónicos	I
X48995	300624	Tepecintle	I	X49092	300602	Elotes Occidentales	I
X48996	300632	Tepecintle	I	X49093	300603	Elotes Occidentales	I
X48997	300640	Elotero de Sinaloa	I	X49094	300604	Elotes Occidentales	I
X48998	300648	Elotes Occidentales	I	X49095	300605	Elotes Occidentales	I
X48999	300611	Elotes Occidentales	I	X49096	300606	Elotes Occidentales	I
X49004	300526	Azul	I	X49097	300607	Elotes Occidentales	I
X49006	300536	Cónico	I	X49098	300608	Elotes Occidentales	I

### 3.4.1. Obtaining of SNP by genotyping

A group of 616 967 SNPs markers were identified by genotyping from the DArTseq platform. After a first filtering of data by eliminating SNPs with missing values and those unable to render allele frequency reduced the group to a total of 461 050 markers; in a second filter not informative markers were removed to a set up final group of 117 790 markers used for the study.

### 3.4.2. Estimation of genetic diversity indices

To estimate the number of alleles per locus and its uniformity, the effective number of alleles ( $A_e$ ) was calculated as the reciprocal of the sum of the squared allelic frequencies as shown in the following equation (Berg and Hamrick, 1997):

$$A_e = \frac{1}{\sum p_i^2} = \frac{1}{1 - H_e}, 1 \leq A_e < \infty$$

To determine genetic variation at the allelic level the expected heterocigosity value per population ( $H_e$ ) was estimated as follows:  $H_e = 1 - \sum p_i^2$ .  $H_e$  is a composite measure that summarizes the genetic variation at the level of allele, the magnitude of  $H_e$  and  $A_e$  is a function of the proportion of polymorphic loci, the number of alleles within a population and the uniformity of the frequencies of the alleles in the population. The observed heterozygosity ( $H_o$ ) was calculated directly from the observed frequencies. Afterwards, the inbreeding coefficient was obtained with the following formula:  $(H_e - H_o)/H_e$  (Arteaga *et al.*, 2016).

The index of Shannon (Sh) was used to establish the relationship between the frequency of an allele and the number of individuals in a population as the wealth and the distribution of its diversity. Sh was determined in the following way:

$$H(x) = - \sum_{all\ x} p(x) \log_2 p(x)$$

Genetic distances were calculated with the formula for modified Rogers' distance as shown below (Reif *et al.*, 2005):

$$dw = \frac{1}{\sqrt{2m}} \sqrt{\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{ni} (p_{ij} - q_{ij})^2}$$

Cluster analysis was carried out using hierarchical grouping (Agglomerative Nesting) with the command AGNES of the library "cluster" of R, which is a source for data analysis software. AGNES proceeds by a series of functions, all objects are initially separated, objects are forming small groups, in such a way, that the two closest objects first fuse to form a group. To select pairs of clusters AGNES used the method of minimum variance of Ward.

The analysis to determine geographical and genetic correlations were performed by using the test of Mantel (Peres-Neto and Jackson, 2001), which consists of the correlation matrix of genetic distances with the array of geographic coordinates calculated from the latitude and

the longitude registered for each accession at the time of its collection ([https://www.dropbox.com/sh/mtmtuerdpiduvpb/AAAAAY0oku-N\\_tupO7OxglcNRa?dl=0](https://www.dropbox.com/sh/mtmtuerdpiduvpb/AAAAAY0oku-N_tupO7OxglcNRa?dl=0)).

### 3.5. Results and Discussion

#### 3.5.1. Study of genetic diversity

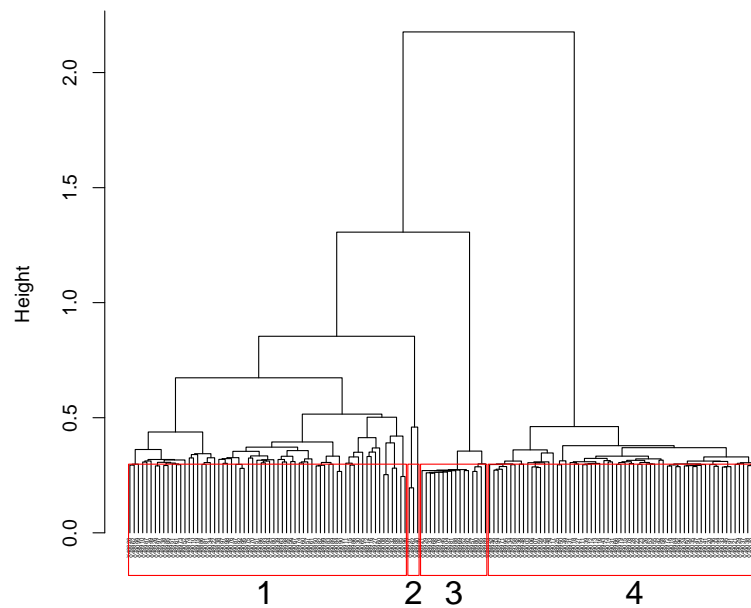
The number of alleles of each locus as reported by the sequencing method used was two alleles per locus. A total of 235 580 alleles were identified in the collection of 150 genotypes, with an average of effective alleles per locus of 1.241. The gene diversity index obtained showed a range of *He* from 0.0000174 to 0.5 (mean 0.1498) and a range from 0.0001587 to 1.0 for *Sh* (mean 0.3467), having a lower mean when compared with previous studies of genetic diversity in maize (Bedoya *et al.*, 2017; González *et al.*, 2013; Rocandio-Rodríguez *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2017; Arteaga *et al.*, 2017; Wen *et al.*, 2012). The largest difference was found with the studies of Zhang *et al.* (2016), Arteaga *et al.* (2016) and Wen *et al.* (2012) who also used SNPs markers. Zhang *et al.* (2016) conducted their study over 362 inbred lines from Southeastern China and they reported a gene diversity of 0.362; Arteaga *et al.* (2016) evaluated 46 races of maize represented by 161 accessions and found an average gene diversity of 0.311, while Wen *et al.* (2012) reported a *He* of 0.2926 for the 321 accessions studied. The difference between those studies and ours is probably due to the type of material used; on the one hand, Arteaga *et al.* (2016) evaluated a similar number of accessions but on the other hand, they used a larger number of races which enabled them to detect a greater diversity than that detected in our study; the study of Zhang *et al.* (2016) was carried out on lines representing various heterotic groups. It is worth to mention that even though diversity studies using SNPs are become more common because of some advantages as they occur

most frequently in the genome, they are easier to automate and have greater repeatability than SSRs (Jones *et al.*, 2007; Van Inghelandt *et al.*, 2010), there is still large amount of studies on diversity of maize races performed with SSRs markers. Bedoya *et al.* (2017) which reported a *He* value of 0.62 using SSRs, which is very high when compared to the previously exposed results due to the multiallelic nature of SSRs markers. The index of Shannon reported in this study is lower than that reported by 0.54 Santos *et al.* (2017). The inbreeding coefficient in this study presented an average of - 5.1220, which is low, but it is consistent with the results of Arteaga *et al.* (2017), where they found that 65% of the population that we analysed presented values either negative or close to zero in a population of 46 races of Mexican maize. Matrix of genetic distances shows an average of 0.2317, a minimum value of 0.1367 and a maximum one of 0.2725 between the accessions of the collection.

### 3.5.2. Cluster analysis

Genetic relationships were determined through the Ward's minimum variance method using modified Rogers's distances. The coefficient of agglomeration was 0.86, indicating strong connection of the grouping. The Ward method was chosen for constructing hierarchical agglomeration with the aim of estimating the number of groups and their phylogenetic relationships, due to the fact that this method is able to find the pair of the closest groups for the formation of a new group in each new step, looking for the smallest increase of intergroup variance, as mentioned by Peñaranda and Navas (2005), this method clearly shows differentiation between groups. The dendrogram (Figure 6) showed the integration of four groups ( $k = 4$ ) formed in the following way: Group 1 with 66 accessions, Group 2 with three accessions, Group 3 with 16 accessions, and Group 4 with 65 accessions.

Races Bolita, Celaya, Cónico, Coscomatepec, Elotero de Sinaloa, Elotes Cónicos, Elotes Occidentales, Pepitilla, Tepecintle, Tuxpeño, Vandeyo, Accessions X48911 and X49070 (with no information on races) associated with Group 1; Group 2 included accessions of races Azul, Elotero de Sinaloa and Tuxpeño; races of Group 3 included Azul, Cristalino de Chihuahua and accessions X48980, X48992 and X48968; finally Group 4 was associated with races Azul, Cónico, Elotero de Sinaloa, Elotes Cónicos, Nal-Tel, Tepecintle and Tuxpeño. The presence of six races in different groups may be due to the mobilization of accessions and exchange of materials among farmers, a very common practice that could explain the low correlation in the Mantel test.



Agglomerative Coefficient = 0.86

Figura 6. Graphical representation of the estimated genetic diversity. Dendrogram generated from the Ward method.



### 3.5.3. Correlation between genetic and geographic distances

The Mantel test showed a low correlation ( $R = 0.1121$ ,  $P = 0.021$ ) between genetic and geographic distances. Significance testing was performed with 999 permutations. Low correlation might indicate the likely existence of a pattern of isolation by distance, suggesting that divergence in the collection is not caused by the geographic isolation of the collections. As concluded by Sosa *et al.* (2009) in their research conducted in tulips (*Hunnemannia fumariifolia*), it is possible to study the isolation by distances as the underlying cause of genetic diversification through the correlation between genetic and geographic distances. They determined that such correlation in that species is high among populations ( $r = 0.511$ ) posing the existence of isolation by distance as a likely cause of the genetic divergence between populations, which is contrary to the results of this study. In addition, a Procluster analysis for the matrix of genetic and geographic distances to analyse the distribution of the data (Figure 7) points out that the overlap of the data showed a greater association of the conical races and Western maize, while Azul and Bolita races have a minor association with its geographical location. Accessions X48911, X49070, X48980, X48992 and X48968 presented a low genetic association with the site where they were collected.

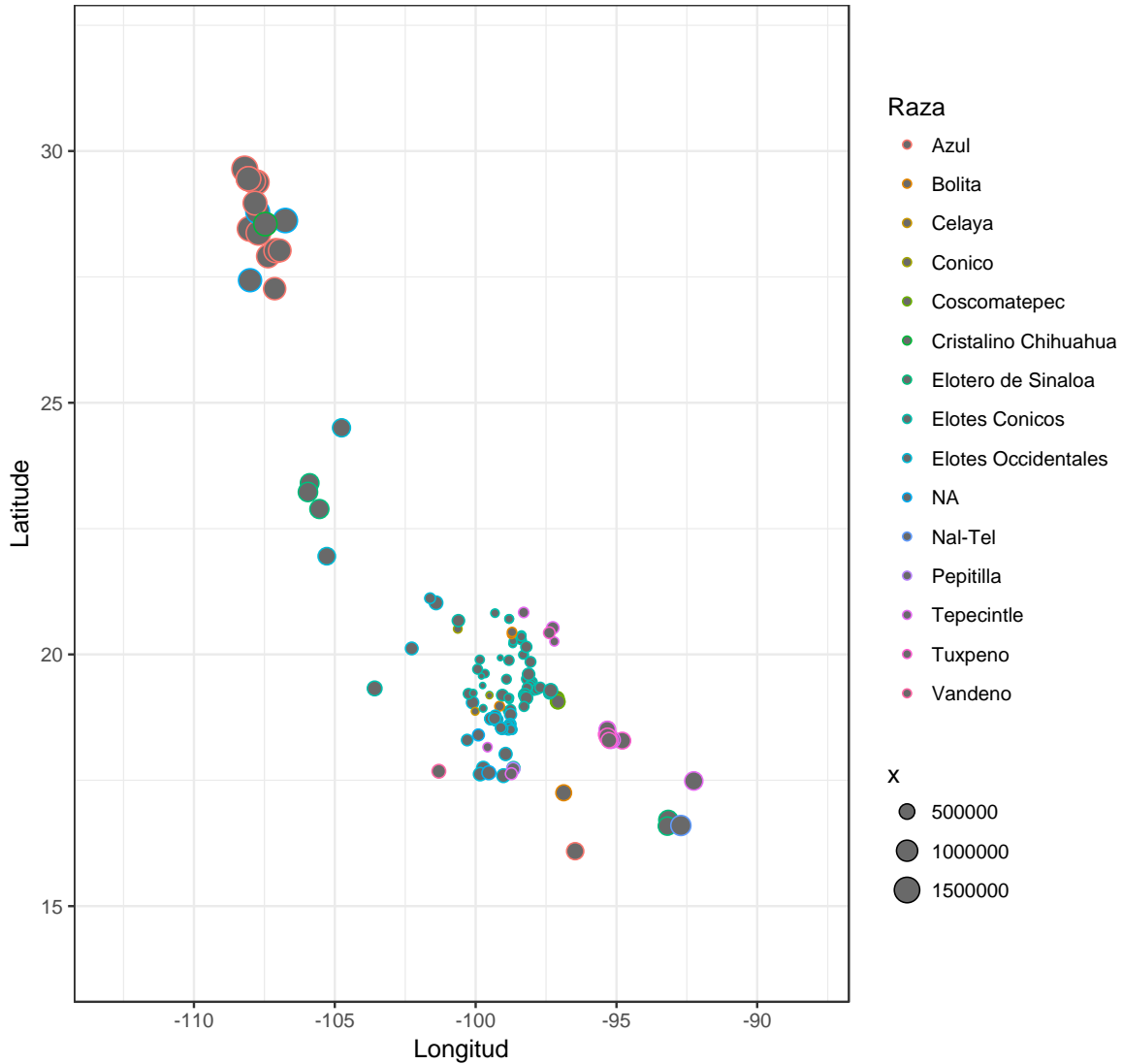


Figura 7. Weighted dispersion diagram. The size of the circumference expresses Association of accession with the collection to smaller more Association site

### 3.6. Conclusions

There is a wide genetic diversity among the 150 accessions of pigmented maize studied, as denoted by the genetic parameters estimated (mean  $He$  0.1498, mean  $Sh$  0.3457, total of 235 800 alleles, 1.241 alleles per locus) with very abundant alleles with low frequency. Results indicate a high genetic structure and the presence of accessions with a complex

genetic structure, with Azul, Cónico, Elotero de Sinaloa, Elotes Cónicos, Tepecintle and Tuxpeño races grouped in different clusters. This diversity could be used in breeding programs that promote the directional selection toward alleles of interest. Cluster analysis revealed the formation of four groups with a strong connection. There was low correlation between genetic and geographic distance matrices, implying lack of isolation by distance and suggesting a continuous gene flow between sites where collections were made, producing a complex genetic structure.

### **3.7. Acknowledgments**

This work has been covered by the program “MASAGRO: Modernización sustentable de la agricultura tradicional”. The first author is supported by a doctoral fellowship from CONACYT. Thanks to Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) and service of genetic analysis to agriculture (SAGA). We thank all the staff of the CIMMYT for their collaboration.

### 3.8. Bibliography

- Agama-Acevedo E., Y. Salinas-Moreno, G. Pacheco-Vargas y L. A. Bello-Pérez (2011)**  
Características físicas y químicas de dos razas de maíz azul: morfología del almidón.  
*Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2:317-329.
- Arteaga M. C., A. Moreno-Letelier, A. Mastretta-Yanes, A. Vázquez-Lobo, A. Breña-Ochoa, A. Moreno-Estrada, L. E. Eguiarte and D. Piñero, (2016)** Genomic variation in recently collected maize landraces from Mexico. *Genomics Data* 7:38-45.
- Bedoya C. A., S. Dreisigacker, S. Hearne, J. Franco, C. Mir, B. M. Prasanna, S. Taba, A. Charcosset and M. L. Warburton (2017)** Genetic diversity and population structure of native maize populations in Latin America and the Caribbean. *PLoS ONE* 12:1-21.
- Bellon M. R., A. F. Barrientos-Priego, P. Colunga-GarcíaMarín and H. Perales (2009)**  
Diversidad y conservación de recursos genéticos en plantas cultivadas. *Capital Natural de México* II:355-382.
- Berg E. E. and J. L. Hamrick (1997)** Quantification of genetic diversity at allozyme loci. *Canadian Journal of Forest Research* 27:415-424. **Cortéz G. A., M. Y. Salinas, E. S. Martín-Martinez and F. M. Bustos (2006)** Stability of anthocyanins of blue maize (*Zea mays* L.) after nixtamalization of separated pericarp-germ tip cap and endosperm fractions. *Journal of Cereal Science* 43:57-62.
- Elshire R. J., J. C. Glaubitz, Q. Sun, J. A. Poland, K. Kawamoto, E. S. Buckler and S. E. Mitchell (2011)** A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PloS One* 6:e19379.

- Espinosa T. E., M. C. Mendoza C., F. Castillo G., J. Ortiz C., A. Delgado A. y 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* 32:303-309.
- Fernández S. R., L. A. Morales C. y A. Gálvez M. (2013)** Importancia de los maíces nativos de México en la dieta nacional. Una revisión indispensable. *Revista Fitotecnia Mexicana* 36:275-283.
- González M. E. C., N. Palacios R., A. Espinoza B. y C. A. Bedoya S. (2013)** Diversidad genética en maíces nativos mexicanos tropicales. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36:329-338.
- Gorriti G. A., F. Quispe J., J. L. Arroyo A., A. Cordova R., B. Jurado T., I Santiago A. y E. Taype E. (2009)** Extracción de antocianinas de las corontas de *Zea mays* L. Maíz Morado. *Ciencia E Investigación* 12:64-74.
- Hellin J., A. Keleman, D. López, L. Donnet y D. Flores (2013)** La importancia de los nichos de mercado. Un estudio de caso del maíz azul y del maíz para pozole en México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 36:315-328.
- Jones E. S., H. Sullivan, D. Bhatramakki and J. S. C. Smith (2007)** A comparison of simple sequence repeat and single nucleotide polymorphism marker technologies for the genotypic analysis of maize (*Zea mays* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 115:361-371
- Lindner, B. L. (2012).** Identificación de SNPs mediante genotipado por secuenciación para el mejoramiento genético de trigo (*Triticum aestivum* l.). Universidad de la República Facultad De Ciencias.
- López M. L. X. y R. Baeza. J. (2010)** Comparación de la Capacidad Antioxidante,

Compuestos Fenólicos y Antocianinas Totales de Diferentes Variedades de Maíz (*Zea mays* L). *INVURNUS* 2:19-22.

**Pausch H., B. Aigner, R. Emmerling, C. Edel, K. U. Götz and R. Fries (2013)** Imputation of high-density genotypes in the Fleckvieh cattle population. *Genetics Selection Evolution* 45:3.

**Peñaranda M. I. y A. A. Navas (2005)** Caracterización molecular y evaluación bioquímica de cultivares colombianos y germoplasma elite de maíz según contenido de aceite. *Agronomía Colombiana* 23:7-16.

**Peres-Neto P. R. and D. A. Jackson (2001)** How well do multivariate data sets match? The advantages of a procrustean superimposition approach over the Mantel test. *Oecologia* 129:169-178.

**Reif J. C., A. E. Melchinger and M. Frisch (2005)** Genetical and mathematical properties of similarity and dissimilarity coefficients applied in plant breeding and seed bank management. *Crop Science* 45:1-7.

**Rocandio-Rodríguez M., A. Santacruz-Varela, L. Córdova-Téllez, H. López-Sánchez, F. Castillo-Gonzalez, R. Lobato-Ortiz and J. García-Zavala (2014)** Detection of genetic diversity of seven maize races from the high Central valleys of Mexico using microsatellites. *Maydica* 59:144-151.

**Salinas-Moreno Y., F. Martínez-Bustos, M. Soto-Hernández, R. Ortega-Paczka y J. L. Arellano-Vázquez (2003)** Efecto de la nixtamalización sobre las antocianinas del grano de maíces pigmentados. *Agrociencia* 37:617-628.

**Salinas-Moreno Y., J. J. Pérez-Alonso, G. Vázquez-Carrillo, F. Aragón-Cuevas y G. A. Velázquez-Cardelas (2012)** Antocianinas y actividad antioxidante en maíces (*Zea mays* L.) de las razas Chalqueño, Elotes Cónicos y Bolita. *Agrociencia* 46:693-706.

- Salinas M. Y., F. Aragón C., C. Ybarra M., J. Aguilar V., B. Altunar L. y E. Sosa M. (2013)** Caracterización física y composición química de las razas de maíz de grano azul/morado de las regiones tropicales y subtropicales de Oaxaca. *Revista Fitotecnia Mexicana* 36:23-31.
- Salinas M. Y., C. García S., B. Coutiño E. y V. A. Vidal M. (2013)** Variabilidad en contenido y tipos de antocianinas en granos de color azul/ morado de poblaciones mexicanas de maíz. *Revista Fitotecnia Mexicana* 36:285-294.
- Sanchez G. J. J., M. M. Goodman and C. W. Stuber (2000).** Isozymatic and Morphological Diversity in the Races of Maize of Mexico. *Economic Botany* 54:43-59.
- Santos F. C. L., R. H. Andueza-Noh, E. S. Ruíz, L. Latournerie-Moreno, R. Garruña, J. O. Mijangos-Cortes and J. Martínez-Castillo (2017)** Characterization of the genetic structure and diversity of maize (*Zea mays* L) landrace populations from Mexico. *Maydica* 62:1-7.
- SIAP (2017)** Cierre de la producción agrícola por cultivo. Retrieved October 3, 2017, from [http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola\\_siap\\_gb/ientidad/index.jsp](http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/ientidad/index.jsp)
- Sosa V., E. Ruiz-Sanchez and F. C. Rodriguez-Gomez (2009)** Hidden phylogeographic complexity in the Sierra Madre Oriental: The case of the Mexican tulip poppy *Hunnemannia fumariifolia* (Papaveraceae). *Journal of Biogeography* 36:18-27.
- Van Inghelandt D., A. E. Melchinger, C. Lebreton and B. Stich, (2010)** Population structure and genetic diversity in a commercial maize breeding program assessed with SSR and SNP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 120:1289-1299.
- Wen W., J. Franco, V. H. Chavez-Tovar, J. Yan and S. Taba (2012)** Genetic characterization of a core set of a tropical maize race Tuxpeño for further use in maize improvement. *PLoS ONE* 7:1-10.

**Zhang X., H. Zhang, L. Li, H. Lan, Z. Ren, D. Liu, L. Wu, H. Liu, J. Jaqueth, B. Li, G. Pan and Shibin Gao (2016)** Characterizing the population structure and genetic diversity of maize breeding germplasm in Southwest China using genome-wide SNP markers. *BMC Genomics* 17:697.



#### 4. CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados obtenidos de los experimentos realizados para este trabajo nos mostraron que el contenido de antocianinas osciló de 2.52 a 1989.97  $\mu\text{g Pel g}^{-1}$  PS, con un promedio de 281.01  $\mu\text{g Pel g}^{-1}$  PS, destacando las accesiones de Tlaxcala C11-IXT, C08-IXT y C10-IXT, con concentraciones de 1989.97, 1952.49 y 1741.89  $\mu\text{g Pel g}^{-1}$  PS, respectivamente. Cianidina 3-glucósido, pelargonidina 3-glucósido y peonidina 3-glucósido fueron las tres antocianinas glicosiladas observadas en el perfil de HPLC, siendo la Cianidina 3-glucósido la antocianina encontrada en mayor cantidad, con una media de 154.6  $\mu\text{g g}^{-1}$  PS destacando la accesión BOZM342 con una concentración de 628.3  $\mu\text{g g}^{-1}$  PS. Los dos modelos propuestos para NIR son robustos dados los valores de SEP, SD<sub>vi</sub>, R<sup>2</sup><sub>vi</sub> y RPD obtenidos. Estos modelos de NIR para antocianinas brindan una alternativa rápida y de bajo costo para la determinación de antocianinas totales. El estudio de diversidad genética mostro una amplia diversidad genética entre la colección (con una media de  $He = 0.1498$  y  $Sh = 0.3467$ ), Esta amplia diversidad es confirmado con la identificación de 235 580 alelos con un promedio de alelos efectivos por locus de 1.24. El análisis de conglomerados reveló la formación de cuatro grupos con una fuerte conexión. Hubo baja correlación entre las matrices de distancia geográfica y genética, lo que implica la falta de aislamiento por la distancia y sugiere un flujo continuo de genes entre los sitios donde se realizaron las colecciones, produciendo una estructura genética compleja. Debido a la variabilidad en el contenido de antocianinas y a la estructura genética de la colección es importante su implementación en un programa de mejoramiento genético de donde sea posible realizar la introgresion de los alelos favorables en un programa de mejoramiento que este enfocado en maíces pigmentados, dado la importancia actual del uso de las antocianinas.