

Acta Botanica Mexicana 105: 59-85 (2013)

LOS FENOLES DEL POLEN DEL GÉNERO *ZEa*

NORMA ALMARAZ-ABARCA^{1,5}, DIANA MARÍA RIVERA-RODRÍGUEZ¹, DAVID ARRÁEZ-ROMÁN^{2,3}, ANTONIO SEGURA-CARRETERO^{2,3}, JOSÉ DE JESÚS SÁNCHEZ-GONZÁLEZ⁴, AMANDA DELGADO-ALVARADO¹, JOSÉ ANTONIO ÁVILA-REYES¹

¹Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Durango, Sigma 119, Fraccionamiento 20 de Noviembre II, 34220 Durango, Durango, México.

²Universidad de Granada, Facultad de Ciencias, Departamento de Química Analítica, Avenida Fuente nueva s/n, 18071 Granada, España.

³Centro de Investigación y Desarrollo del Alimento Funcional, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Avenida del Conocimiento 3, 18100 Granada, España.

⁴Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, km 15.5 Carretera a Nogales, 45101 Zapopan, Jalisco, México.

⁵Autor para la correspondencia: nalmaraz@ip.mx; noralab@yahoo.com

RESUMEN

Se analizó la variabilidad de la composición fenólica del polen de 32 poblaciones de *Zea mays* subsp. *mexicana*, *Zea mays* subsp. *parviglumis*, *Zea mays* subsp. *mays*, *Zea diploperennis*, *Zea perennis* y *Zea luxurians* de México y Guatemala. Los perfiles se obtuvieron por cromatografía líquida de alta presión con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) y cromatografía líquida de ultra resolución acoplada a espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (UPLC-TOF-MS). Se encontró un total de 23 compuestos fenólicos (cuatro ácidos fenólicos, 16 flavonoles y tres dihidroflavonoides). Los derivados glicósidos de quercetina (siete derivados, además de la quercetina aglicona misma) fueron las sustancias predominantes en todos los análisis realizados. El compuesto principal, el más abundante y presente en la totalidad de las muestras, incluido el maíz, se identificó como quercetina-3,3'-*O*-diglucósido. El polen de todas las especies y subespecies de *Zea* analizadas mostraron patrones muy similares de fenoles acumulados; sin embargo, diferencias en los compuestos menores (ácidos fenólicos y dihidroflavonoides) permitieron discernir variaciones inter e intraespecíficas, aunque la división del género en las dos secciones *Luxuriantes* y *Zea* no fue claramente sustentada. La baja variación de los perfiles fenólicos del polen dentro del género *Zea* apoya la propuesta de que el maíz y

algunos teocintles son grupos conespecíficos, e indica que la composición fenólica del polen fue altamente conservada en los diferentes taxa de *Zea* a lo largo del tiempo.

Palabras clave: ácidos fenólicos, flavonoides, género *Zea*, polen, teocintle.

ABSTRACT

The variability of the pollen phenol composition of 32 populations of *Zea mays* subsp. *mexicana*, *Zea mays* subsp. *parviglumis*, *Zea mays* subsp. *mays*, *Zea diploperennis*, *Zea perennis*, and *Zea luxurians* from Mexico and Guatemala were analyzed. The phenol profiles were assessed by HPLC-DAD, and UPLC-TOF-MS. A total of 23 phenolics (four phenolic acids, 16 flavonols, and three dihydroflavonoids) were found. Quercetin glycosides (seven derivatives besides the quercetin aglycone itself) were the predominant compounds in the pollen of all analyzed species and subspecies. The major compound in all the samples, including the pollen of maize, was identified as quercetin-3,3'-*O*-diglucoside. The pollen of all the species and subspecies of *Zea* examined showed very similar patterns of accumulated phenols; however, variation in the minor compounds (phenolic acids and dihydroflavonoids) allowed to discern some inter- and intraspecific variations, although the split of *Zea* in the sections *Luxuriantes* and *Zea* was not clearly supported. The low level of variability of the pollen phenol profiles throughout the genus *Zea* supports the proposal that maize and some teosintes are conspecific groups, and indicates that the pollen phenol composition is highly conserved in the different taxa of *Zea*.

Key words: flavonoids, genus *Zea*, phenolic acids, pollen, teosinte.

INTRODUCCIÓN

El género *Zea* es nativo de México (Sánchez et al., 2000). De acuerdo con Sánchez et al. (2011), el mismo está formado por ocho taxa agrupados en dos secciones, cinco especies y cuatro subspecies. La sección *Luxuriantes* Doebley & Iltis incluye a *Zea perennis* (Hitchc.) Reeves & Mangelsdorf, *Zea diploperennis* Iltis, Doebley & Guzmán, *Zea luxurians* (Durieu & Ascherson) Bird y *Zea nicaraguensis* Iltis & Benz). La sección *Zea* la forman *Zea mays* subsp. *mexicana* (Schradler) Iltis, *Zea mays* subsp. *parviglumis* Iltis & Doebley, *Zea mays* subsp. *huehuetenangensis* (Iltis & Doebley) Doebley y *Zea mays* subsp. *mays*.

El único componente cultivado del género, *Zea mays* subsp. *mays*, incluye todas las razas y variedades de maíz; todos los demás taxa son colectivamente llamados teocintles (Fig. 1). Dentro de *Zea mays* subsp. *mexicana* se reconocen cuatro razas: Chalco, Mesa Central, Durango y Nobogame. La raza Balsas es la única considerada dentro de *Zea mays* subsp. *parviglumis* (Doebley, 1990). Nuevas poblaciones de teocintles, que requieren ser ubicadas taxonómicamente, se siguen descubriendo en México y Centro América (Iltis y Benz, 2000; Sánchez et al., 2011).

Los teocintles han tenido una importante influencia en el origen y variabilidad del maíz en la República Mexicana (Wilkes, 2004), y contienen germoplasma valioso para el desarrollo de nuevas variedades de ese cereal, principalmente aquellas tolerantes a enfermedades y estrés ambiental (Nault y Findley, 1981; Cohen y Galinat, 1984). En algunas regiones del país son importantes como forraje, debido a su calidad nutricional, su potencial de producción y sus mecanismos de dispersión y establecimiento (Sánchez-González et al., 1998).

Los flavonoides y los ácidos fenólicos son compuestos sintetizados en prácticamente todos los tejidos de las plantas. El polen es una fuente importante de flavonoles glicosidos y de ácidos fenólicos (Wiermann y Vieth, 1983; Campos, 1997; Almaraz-Abarca et al., 2007). Los perfiles de esas dos clases de compuestos varían entre diferentes grupos de plantas con una tendencia de ser característicos para cada

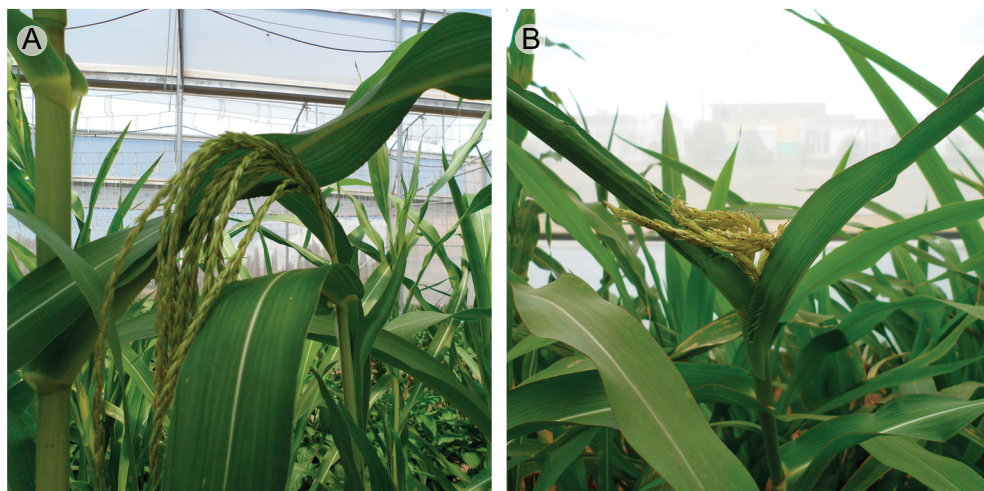


Fig. 1. Dos especies de teocintles, A: *Zea mays* subsp. *parviglumis* y B: *Zea diploperennis*, mostrando las inflorescencias masculinas.

especie (Campos et al., 1997; Fiasson et al., 1997; Campos et al., 2002; Almaraz-Abarca et al., 2004, 2006, 2008).

Los flavonoides y los ácidos fenólicos desempeñan importantes y diversas funciones en las plantas, tales como la protección de los tejidos vegetales contra el daño potencial de la radiación UV (Casati y Walbot, 2003) y contra herbívoros (Lee et al., 1998). Muchos de esos compuestos tienen valiosas propiedades biológicas con implicaciones médicas (Zhang y Cui, 2005).

Los esfuerzos enfocados en determinar la composición fenólica del polen de las especies de *Zea* han sido escasos, solamente algunos tipos de maíz (*Zea mays* subsp. *mays*) han sido estudiados en ese sentido. Redemann y sus colaboradores en 1950 (Larson y Lonergan, 1972) y más tarde Ceska y Styles (1984) determinaron la composición fenólica del polen de maíz y mencionaron la presencia de quercitrina. Ceska y Styles (1984) además reportaron otros ocho derivados glicósidos de quercetina e isoramnetina, sólo un derivado glicósido de canferol (canferol 3-*O*-glucósido), este último presente en trazas, y resaltaron la ausencia de flavonas en el polen de maíz. En el presente trabajo se determinó, por cromatografía líquida de alta presión, con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) y cromatografía líquida de ultra presión acoplada a espectrometría de masas de tiempo de vuelo (UPLC-TOF-MS), la variabilidad de la composición de flavonoides y ácidos fenólicos del polen de *Zea mays* subsp. *mexicana*, *Zea mays* subsp. *parviglumis*, *Zea mays* subsp. *mays*, *Zea diploperennis*, *Zea perennis* y *Zea luxurians* de México y Guatemala. Se presentan las implicaciones taxonómicas de la variación de los perfiles fenólicos y la importancia del polen de las especies de *Zea* como fuente de flavonoides.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El material genético incluido en el presente estudio consistió de 32 poblaciones de *Zea mays* subsp. *mexicana*, *Zea mays* subsp. *parviglumis*, *Zea mays* subsp. *mays*, *Zea diploperennis*, *Zea perennis* y *Zea luxurians* de México y Guatemala. En el año 2011 se cultivaron diez plantas de cada población bajo condiciones de invernadero en el Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Durango (CIIDIR IPN Durango), en Durango, México. Las semillas, excepto las de *Zea mays* subsp. *mays* (de una variedad criolla, proporcionadas por un productor de Durango, México), fueron donadas por el Banco de Germoplasma de la Universidad de Guada-

lajara, Jalisco. La información geográfica de todas las poblaciones estudiadas se presenta en el Cuadro 1.

Preparación de las muestras

Las muestras de polen se colectaron directamente de las anteras de 10 plantas adultas de cada una de las 32 poblaciones. El polen de las 10 plantas de una misma población se combinó y se analizó de manera independiente. El polen colectado se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Reactivos químicos

El acetonitrilo (grado HPLC), agua (grado HPLC), etanol (grado HPLC) y acetato de etilo (grado analítico) se compraron a J. T. Baker (Xalostoc, México). El ácido acético, hidróxido de sodio, 2-propanol, quercetina, quercitrina (quercetin-3-ramnosido), canferol-3-glucósido, y ácido caféico se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, USA). El canferol-3,7-*O*-diglucósido, quercetina-3-*O*-[ramnosil-(1-6) galactósido], canferol-3-*O*-[ramnosil (1-6) glucósido] se consiguieron en Apin Chemicals Limited (UK).

Preparación de extractos fenólicos

Los extractos fenólicos de polen se prepararon de acuerdo con la técnica de Markham y Campos (1996), combinando 100 mg de polen con 1 mL de una solución de etanol a 50% (v/v) y sonicando durante 60 min. Las mezclas resultantes se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min. Las alícuotas de los sobrenadantes se usaron para los análisis de HPLC-DAD y UPLC-TOF-MS.

Análisis de HPLC-DAD

Los perfiles de HPLC-DAD de flavonoides y ácidos fenólicos se determinaron de acuerdo al protocolo descrito por Campos y Markham (2007). Las alícuotas (100 µL) de cada muestra se analizaron en un equipo HPLC Perkin Elmer Series 200 HPLC y una columna Perkin Elmer Brownlee Validated C18 (4.6 x 250 mm, 5 µm). El solvente A fue agua acidificada (ajustada a pH 2.5 con ácido ortofosfórico) y el solvente B fue acetonitrilo, mezclados de acuerdo con el siguiente gradiente lineal: iniciando con 100% de A, disminuyendo a 91% a los 12 min, a 87% a los 20, a 67% a los 32 y a 57% a los 42 min, y manteniendo ese nivel hasta completar 60 min de análisis. La velocidad de flujo fue de 0.8 mL/min, a temperatura ambiente. Los cromatogramas se registraron a 260 y 340 nm. Los datos espectrales para todos los picos se registraron en el intervalo de 220 a 400 nm, usando un detector de arreglo de diodos (Perkin Elmer Series 200). La

información estructural se obtuvo por comparación directa de los tiempos de retención y los espectros UV, de cada compuesto resuelto en los cromatogramas con los correspondientes a los compuestos de referencia, y por comparación de esos parámetros con la información compilada por Mabry et al. (1970) y Campos y Markham (2007).

Análisis de UPLC-TOF-MS

Estos análisis se realizaron en un sistema Waters Acquity UPLC (Waters, Millford, MA). Se usó una columna Zorbax Eclipse Plus C18 (1.8 μm , 150 \times 4.6 mm) UPLC. La separación de los compuestos se realizó a 25 $^{\circ}\text{C}$, con un programa de elución en gradiente, y una velocidad de flujo de 0.8 mL/min. El volumen de inyección fue de 10 μL . La fase móvil consistió de agua y ácido acético (15%) como solvente A, y acetonitrilo como solvente B. Se aplicó el siguiente gradiente lineal: 0 min, 5% de B; 10 min, 30% de B; 12 min, 33% de B; 17 min, 38% de B; 20 min, 50% de B; 23 min, 95% de B; y 25 min, 5% de B. Las condiciones iniciales se mantuvieron durante 10 min más.

El sistema UPLC estuvo acoplado a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (microTOFTM, Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Alemania), equipado con una interfase ESI modelo G1607A (Agilent Technologies), operando en modo ión negativo. En ese estado se requirió un “splitter” tipo T (split = 1:3) para el acoplamiento con el detector de masas cuando el flujo en el detector TOF fue de 0.2 mL/min para lograr resultados reproducibles y aspersión estable. Así, en el presente estudio el flujo que llegó al detector ESI-TOF-MS fue de 0.2 mL/min. Los valores óptimos de los parámetros de fuente fueron los siguientes: voltaje capilar, +4 kV; temperatura de secado de gas, 210 $^{\circ}\text{C}$; flujo de gas, 8 L/min; presión de gas nebulizante, 2 bar; “end-plate offset”, -0.5 kV. Las condiciones de transferencia fueron: salida capilar, -120 V; “skimmer” 1, -40 V; hexapolo 1, -23 V; RF hexapolo, 50 Vpp; “skimmer” 2, -22.5 V. Los parámetros de fuente y transferencia se optimizaron para asegurar buena sensibilidad, alcanzar una resolución razonable en el intervalo de masas de los compuestos blanco (50-1100 m/z) y mejorar el comportamiento de la ionización.

La calibración externa del espectrómetro de masas se llevó a cabo con una solución conteniendo hidróxido de sodio 5 mM en agua/2-propanol (1/1, v/v), con ácido acético a 0.2%, en modo de regresión cuadrática de calibración de alta precisión (HPC). Con este método se logró una curva de calibración exacta basada en diversos grupos (clusters) de masas, cada una difiriendo en 82 Da ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$). La solución de calibración se inyectó al inicio del análisis usando una bomba Cole Palmer (Vernon Hills, Illinois, USA) y todos los espectros se calibraron antes de la caracterización de fenoles. Los datos de masa exacta para los iones moleculares

se procesaron con el programa Data Analysis 4.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania), el cual proporcionó una lista de fórmulas elementales posibles, usando el editor Generate Molecular Formula™. Ese editor se basa en un algoritmo CHNO que proporciona funcionalidades estándares tales como intervalo elemental mínimo/máximo, equivalentes anillo y doble enlace, y una comparación sofisticada de patrón teórico y medido de isótopos (valor mSigma) para incrementar la confianza en la fórmula molecular sugerida. De acuerdo con la literatura, el nivel aceptado de umbral de exactitud para confirmar la composición elemental se estableció en 5 ppm para la mayoría de los compuestos (Gross, 2010).

Análisis de datos

Los perfiles fenólicos individuales se construyeron con todos los compuestos presentes en los cromatogramas HPLC-DAD y UPLC-TOF-MS; cada uno se consideró como un carácter químico individual y con ellos se construyó una matriz binaria de presencia (1)-ausencia (0). Se generó una matriz de distancias entre poblaciones, basada en el coeficiente de disimilitud de Jaccard, y un análisis de agrupamiento, usando el método de incremento en la suma de cuadrados (Clustan Graphics 8). El número óptimo de grupos (clusters) se estimó usando el procedimiento de validación de árbol, por medio de permutación aleatoria de datos originales, que compara un árbol obtenido por un juego de datos con la familia de árboles generados por permutación aleatoria del mismo juego de datos (Wishart, 2006).

Cuadro 1. Información geográfica de las especies, subespecies y poblaciones de *Zea* analizadas en el presente estudio, todas originarias de México, excepto *Z. luxurians*, que fue de Guatemala.

| Especie | Localidad | Latitud (N) | Longitud (O) | Altitud (m) | Número de población | Año de colecta |
|---|--|----------------|-----------------|----------------|------------------------|-------------------|
| <i>Z. mays</i> subsp. <i>mexicana</i> , raza Chalco | Chapultepec, Estado de México | 19°12'12" | 99°34' 3" | 2602 | 615 | 2007 |
| <i>Z. mays</i> subsp. <i>mexicana</i> , raza Chalco | km 1 Aljojuca- Santa María Coatepec, Aljojuca, Puebla | 19°5'51" | 97°33'6" | 2437 | 623 | 2007 |
| <i>Z. mays</i> subsp. <i>mexicana</i> , raza Chalco | San Antonio Zoyatzingo, Amecameca, Estado de México | 19°4'54" | 98°46'35" | 2468 | 635 | 2007 |

Cuadro 1. Continuación.

| Especie | Localidad | Latitud (N) | Longitud (O) | Altitud (m) | Número de población | Año de colecta |
|--|--|-------------|--------------|-------------|---------------------|----------------|
| <i>Z. mays</i> subsp. <i>mexicana</i> , raza Chalco | Miraflores-La Candelaria Tlapala, Chalco, Estado de México | 19°13'57" | 98°50'3" | 2280 | 638 | 2007 |
| <i>Z. mays</i> subsp. <i>mexicana</i> , raza Central Plateau | Cerro Churintzio, Churintzio, Michoacán | 20°9'25" | 102°3'35" | 1949 | 426 | 2002 |
| <i>Z. mays</i> subsp. <i>mexicana</i> , raza Central Plateau | Uriangato, Uriangato, Guanajuato | 20°10'8" | 101°9'22" | 1880 | 447 | 2002 |
| <i>Z. mays</i> subsp. <i>mexicana</i> , raza Central Plateau | San Agustín del Maíz, Copándaro, Michoacán | 19°53'27" | 101°10'46" | 1855 | 450 | 2002 |
| <i>Z. mays</i> subsp. <i>mexicana</i> , raza Central Plateau | Potrero El Tepalcate, Nombre de Dios, Durango | 24°2'32" | 104°16'47" | 1870 | 705 | 2009 |
| <i>Z. mays</i> subsp. <i>mexicana</i> , raza Central Plateau | Puente Gavilanes, Durango, Durango | 24°1'12" | 104°29'16" | 1868 | 710 | 2009 |
| <i>Z. mays</i> subsp. <i>mexicana</i> , raza Nobogame | Arroyo Tarahumares, Guadalupe y Calvo, Chihuahua | 26°12'58" | 106°56'33" | 1928 | 607 | 2007 |
| <i>Z. mays</i> subsp. <i>parviglumis</i> , raza Balsas | San Lorenzo, Ejutla, Jalisco | 19°57'6" | 103°59'3" | 1000 | 201 | 2007 |
| <i>Z. mays</i> subsp. <i>parviglumis</i> , raza Balsas | El Rodeo, Tolimán, Jalisco | 19°33'0" | 104°3'0" | 1462 | 232 | 2007 |
| <i>Z. mays</i> subsp. <i>parviglumis</i> , raza Balsas | Amatlán de Quetzalcoatl, Tepoztlán, Morelos | 18°58'30" | 99°1'49" | 1654 | 474 | 2003 |
| <i>Z. mays</i> subsp. <i>parviglumis</i> , raza Balsas | San Cristobal Honduras, Oaxaca | 16°19'26" | 97°1'57" | 590 | 483 | 2003 |
| <i>Z. mays</i> subsp. <i>parviglumis</i> , raza Balsas | Puerto de La Cruz, Carácuaro, Michoacán | 18°57'47" | 101°3'27" | 870 | 517 | 2003 |

Cuadro 1. Continuación.

| Especie | Localidad | Latitud (N) | Longitud (O) | Altitud (m) | Número de población | Año de colecta |
|--|--|-------------|--------------|-------------|---------------------|----------------|
| <i>Z. mays</i> subsp. <i>parviglumis</i> , raza Balsas | Los Cimientos, Villa Purificación, Jalisco | 19°42'15" | 104°49'8" | 552 | 546 | 2003 |
| <i>Z. mays</i> subsp. <i>parviglumis</i> , raza Balsas | Plan de los Timbres, Huitzuc de los Figueroa, Guerrero | 18°15'9" | 99°14'1" | 1183 | 643 | 2007 |
| <i>Z. mays</i> subsp. <i>parviglumis</i> , raza Balsas | Vista Hermosa, Olinalá, Guerrero | 17°45'37" | 98°46'28" | 1580 | 646 | 2007 |
| <i>Z. mays</i> subsp. <i>parviglumis</i> , raza Balsas | Camino Vista Hermosa-Colotlipa, Quechultenango, Guerrero | 17°26'16" | 99°12'5" | 945 | 650 | 2007 |
| <i>Z. mays</i> subsp. <i>parviglumis</i> , raza Balsas | El Rincón, Chilpancingo de los Bravo, Guerrero | 17°17'13" | 99°28'59" | 740 | 654 | 2007 |
| <i>Z. mays</i> subsp. <i>parviglumis</i> , raza Balsas | El Salado, Mochitlán, Guerrero | 17°23'48" | 99°26'12" | 1150 | 657 | 2007 |
| <i>Z. mays</i> subsp. <i>parviglumis</i> , raza Balsas | Zacatlancillo, Teloloapan, Guerrero | 18°25'0" | 99°58'3" | 1746 | 661 | 2007 |
| <i>Z. mays</i> subsp. <i>parviglumis</i> , raza Balsas | Ixcateopan, Guerrero | 18°30'16" | 99°47'4" | 1891 | 666 | 2007 |
| <i>Z. mays</i> subsp. <i>parviglumis</i> , raza Balsas | Oxtotitlán, Teloloapan, Guerrero | 18°10'41" | 99°56'00" | 1098 | 669 | 2007 |
| <i>Z. mays</i> subsp. <i>parviglumis</i> , raza Balsas | Huixtitla, Amatepec, Estado de México | 18°38'26" | 100°21'24" | 1008 | 674 | 2007 |
| <i>Z. mays</i> subsp. <i>parviglumis</i> , raza Balsas | km 109 Tejupilco-Altamirano, Michoacán | 18°53'41" | 100°12'32" | 1357 | 679 | 2007 |

Cuadro 1. Continuación.

| Especie | Localidad | Latitud (N) | Longitud (O) | Altitud (m) | Número de población | Año de colecta |
|--|--|-------------|--------------|-------------|---------------------|----------------|
| <i>Z. mays</i> subsp. <i>parviglumis</i> , raza Balsas | Quechendio, Huetamo, Michoacán | 18°48'18" | 100°56'46" | 631 | 684 | 2007 |
| <i>Zea diploperennis</i> | Las Joyas, Cuautitlán de García B., Jalisco | 19°35'26" | 104°16'41" | 1870 | 551 | 2003 |
| <i>Zea diploperennis</i> | San Andrés Milpillas, Huajicori, Nayarit | 22°51'26" | 105°6'57" | 1400 | 692 | 2008 |
| <i>Zea luxurians</i> | km 162 Agua Blanca-Ipala, Agua Blanca, Jutiapa | 14°31'32" | 89°39'45" | 895 | G3 | 2004 |
| <i>Zea perennis</i> | Piedra Ancha, San Gabriel, Jalisco | 19°38'7" | 103°34'47" | 2140 | 694 | 2008 |

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición fenólica del polen

Un total de 23 compuestos se resolvieron por los análisis de HPLC-DAD y UPLC-TOF-MS, de acuerdo con sus tiempos de retención (TR), las características de sus espectros UV, los datos de sus espectros de masas, y los datos proporcionados por las compilaciones de Mabry et al. (1970) y Campos y Markham (2007). En el Cuadro 2 se muestran los TR₁ y datos espectrales UV del análisis de HPLC-DAD, y en el Cuadro 3 los TR₂ y datos de los espectros de masas obtenidos del análisis de UPLC-TOF-MS.

Las estructuras propuestas de los compuestos resueltos por UPLC-TOF-MS se muestran en las Figs. 2 y 3. El análisis reveló cuatro ácidos fenólicos, saflomina A (**9**) (Iswaldi et al., 2011), ácido ferúlico (**14**) (Gardana et al., 2007), y dos compuestos no identificados (**22** y **23**); 16 flavonoles, determinados como quercetina-3,7-*O*-diglucósido (**1**) (Vallejo et al., 2004), quercetina-3-*O*-arabinosilglucósido (**2**), quercetina-3-soforósido-7-glucósido (**3**) (Rochfort et al., 2006), quercetina-3,3'-*O*-diglucósido (**4**) (Morikawa et al., 2009), isoramnetina-3-*O*-gentobiósido (**5**) (Dahia et al., 2009), un flavonol glicósido no identificado (**6**), quercetina-3-*O*-ramnoglucósido (**7**), canferol-3-*O*-β-ramnoglucósido (**8**), isoramnetina-3-*O*-β-ramnoglucósido (**10**),

Cuadro 2. Descripción de los compuestos fenólicos encontrados por el análisis de HPLC-DAD en los extractos de polen de 32 poblaciones de *Zea*.

| Número de compuesto | TR ₁ (X±SD) | λmax (nm) | Tipo de compuesto | Presencia |
|---------------------|------------------------|--------------------------|--------------------|---|
| 1 | 27.800±0.273 | 256, 268sh, 355 | Flavonol glicósido | Todos los taxa |
| 2 | 28.176±0.250 | 255, 268sh, 354 | Flavonol glicósido | Subsp. <i>parviglumis</i> , subsp. <i>mexicana</i> , <i>Z. luxurians</i> , maíz |
| 3 | 31.465±0.250 | 250sh, 266, 345 | Flavonol glicósido | Todos los taxa |
| 4 | 33.353±0.200 | 253sh, 267, 345 | Flavonol glicósido | Todos los taxa |
| 5 | 34.142±0.170 | 253, 266, 346 | Flavonol glicósido | Todos los taxa |
| 6 | 34.412±0.171 | 254, 267, 349 | Flavonol glicósido | Algunas poblaciones de subsp. <i>parviglumis</i> y subsp. <i>mexicana</i> |
| 7 | 35.259±0.174 | 255, 266sh, 296sh, 354 | Flavonol glicósido | Todos los taxa |
| 8 | 37.102±0.102 | 266, 300sh, 350 | Flavonol glicósido | <i>Z. luxurians</i> , maíz, algunas poblaciones de subsp. <i>mexicana</i> y subsp. <i>parviglumis</i> |
| 9 | 36.025±0.000 | 243sh, 268sh, 290sh, 322 | Ácido fenólico | <i>Z. perennis</i> |
| 10 | 37.246±0.125 | 254, 269sh, 298sh, 354 | Flavonol glicósido | Todos los taxa |
| 11 | 37.369±0.083 | 254, 268sh, 295sh, 354 | Flavonol glicósido | <i>Z. diploperennis</i> |
| 12 | 37.876±0.195 | 255, 266sh, 297sh, 355 | Flavonol glicósido | Todos los taxa |
| 13 | 38.756±0.000 | 254, 269sh, 294sh, 355 | Flavonol glicósido | <i>Z. diploperennis</i> |
| 14 | 39.34±0.000 | 243sh, 268sh, 293sh, 325 | Ácido fenólico | <i>Z. perennis</i> |
| 15 | 40.19±0.000 | 254, 264sh, 293sh, 348 | Flavonol glicósido | <i>Z. diploperennis</i> y <i>Z. luxurians</i> |
| 16 | 40.704±0.000 | 255, 267sh, 296sh, 355 | Flavonol glicósido | <i>Z. perennis</i> , una población de subsp. <i>parviglumis</i> |

Cuadro 2. Continuación.

| Número de compuesto | TR ₁ (X±SD) | λmax (nm) | Tipo de compuesto | Presencia |
|---------------------|------------------------|------------------------|--------------------|--|
| 17 | 45.356±0.274 | 255sh, 272, 340 | Flavonol glicósido | Algunas poblaciones de subsp. <i>parviglumis</i> , subsp. <i>mexicana</i> , <i>Z. diploperennis</i> |
| 18 | 48.785±0.000 | 255, 270sh, 300sh, 372 | Flavonol | <i>Z. diploperennis</i> <i>Z. perennis</i> |
| 19 | 54.558±0.273 | 288, 330sh | Dihidroflavonoide | <i>Z. diploperennis</i> |
| 20 | 56.082±0.022 | 286, 353sh | Dihidroflavonoide | Una población de subsp. <i>parviglumis</i> |
| 21 | 56.621±0.103 | 287, 338sh | Dihidroflavonoide | Algunas poblaciones de subsp. <i>parviglumis</i> , algunas poblaciones de subsp. <i>mexicana</i> , <i>Z. luxurians</i> |
| 22 | 56.818±0.106 | 249sh, 296sh, 328 | Ácido fenólico | Algunas poblaciones de subsp. <i>parviglumis</i> , algunas poblaciones de subsp. <i>mexicana</i> |
| 23 | 61.436±0.173 | 246sh, 295sh, 327 | Ácido fenólico | Algunas poblaciones de subsp. <i>parviglumis</i> , algunas poblaciones de subsp. <i>mexicana</i> |

6-metoxiquercetina (**11**) (Zhang et al., 2007), quercetina-3-*O*-galactósido (**12**) (Hiroaka et al., 1987), quercetina-3- α -L-arabinofuranósido (**13**) (Schieber et al., 2003), quercetina-ramnósido (**15**) (Ferracane et al., 2010), isoramnetina-3-*O*-D-glucósido (**16**) (Dahia et al., 2009), un flavonol glicósido no identificado (**17**), y quercetina (**18**) (Tao et al., 2011); y tres dihidroflavonoides, naringenina (**19**) (Tao et al., 2011), y dos no determinados (**20 y 21**). Entre los flavonoles, los derivados glicósidos de quercetina fueron los compuestos fenólicos más comunes y abundantes en el polen de todas las especies y subespecies analizadas de *Zea*. El compuesto principal (el encontrado a mayor concentración) en todas las muestras fue **4** (quercetina-3,3'-*O*-diglucósido). El único derivado de canferol (**8**) (canferol-3-*O*- β -ramnoglucósido) se encontró en 25 de las 32 muestras de polen (201, 232, 426, 447, 474, 450, 483, 517, 623, 635, 638, 646, 650, 654, 657, 661, 666, 669, 679, 684, 694, 705, 710, G3, y maíz). Estos resultados están parcialmente de acuerdo con los de Ceska y Styles (1984), quienes reportaron a la quercetina-3,3'-*O*-diglucósido como el flavonoide principal en el po-

Cuadro 3. Descripción de los compuestos fenólicos encontrados por el análisis de UPLC-TOF-MS en los extractos del polen de 32 poblaciones de *Zea*.

| Número de compuesto | TR ₂ (X±SD) | m/z experimental | m/z calculada | Fórmula | Error (ppm) | Valor mSigma | Compuesto propuesto |
|---------------------|------------------------|------------------|---------------|---|-------------|--------------|------------------------------------|
| 1 | 6.042±0.083 | 625.1413 | 625.1410 | C ₂₇ H ₂₉ O ₁₇ | -1.7 | 3.7 | Quercetina-3,7-O-diglucoído |
| 2 | 6.179±0.084 | 595.1312 | 595.1305 | C ₂₆ H ₂₇ O ₁₆ | -2.0 | 2.6 | Quercetina-3-O-arabinosil-glucoído |
| 3 | 7.122±0.078 | 787.1929 | 787.1939 | C ₃₃ H ₃₉ O ₂₂ | 1.2 | 8.8 | Quercetina-3-soforosido-7-glucoído |
| 4 | 7.873±0.076 | 625.1418 | 625.1410 | C ₂₇ H ₂₉ O ₁₇ | -2.2 | 3.2 | Quercetina-3,3'-O-diglucoído |
| 5 | 8.173±0.065 | 639.1579 | 639.1567 | C ₂₈ H ₃₁ O ₁₇ | -1.8 | 0.6 | Isoramnetina-3-O-gentobioído |
| 7 | 8.553±0.156 | 609.1468 | 609.1461 | C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆ | -2.8 | 3.4 | Quercetina-3-O-rannoglucoído |
| 8 | 9.293±0.060 | 593.1509 | 593.1511 | C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅ | 0.2 | 13.5 | Canferol-3-O-β-rannoglucoído |
| 9 | 9.801±0.039 | 611.1594 | 611.1618 | C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆ | 3.9 | 32.0 | Saflomina A |
| 10 | 9.376±0.063 | 623.1624 | 623.1618 | C ₂₈ H ₃₁ O ₁₆ | -1.0 | 6.1 | Isoramnetina-3-O-β-rannoglucoído |
| 11 | 9.611±0.000 | 331.0466 | 331.0459 | C ₁₆ H ₁₁ O ₈ | 0.3 | 2.8 | 6-metoxiquercetina |
| 12 | 9.617±0.102 | 463.0886 | 463.0882 | C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂ | -0.6 | 3.4 | Quercetina-3-O-galactosido |
| 13 | 10.089±0.072 | 433.0768 | 433.0776 | C ₂₀ H ₁₇ O ₁₁ | 4.0 | 8.9 | Quercetina-3-α-L-arabinofuranosido |
| 14 | 10.273±0.077 | 193.0511 | 193.0506 | C ₁₀ H ₉ O ₄ | -2.6 | 8.3 | Ácido ferúlico |
| 15 | 10.537±0.461 | 447.0920 | 447.0932 | C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁ | 2.7 | 22.5 | Quercetina-rannosido |
| 16 | 10.669±0.053 | 477.1036 | 477.1038 | C ₂₂ H ₂₁ O ₁₂ | 3.2 | 3.5 | Isoramnetina-3-O-D-glucoído |
| 18 | 14.499±0.033 | 301.0367 | 301.0353 | C ₁₅ H ₉ O ₇ | -0.8 | 0.9 | Quercetina |
| 19 | 17.307±0.127 | 271.0609 | 271.0612 | C ₁₅ H ₁₁ O ₅ | 1.2 | 6.3 | Naringenina |

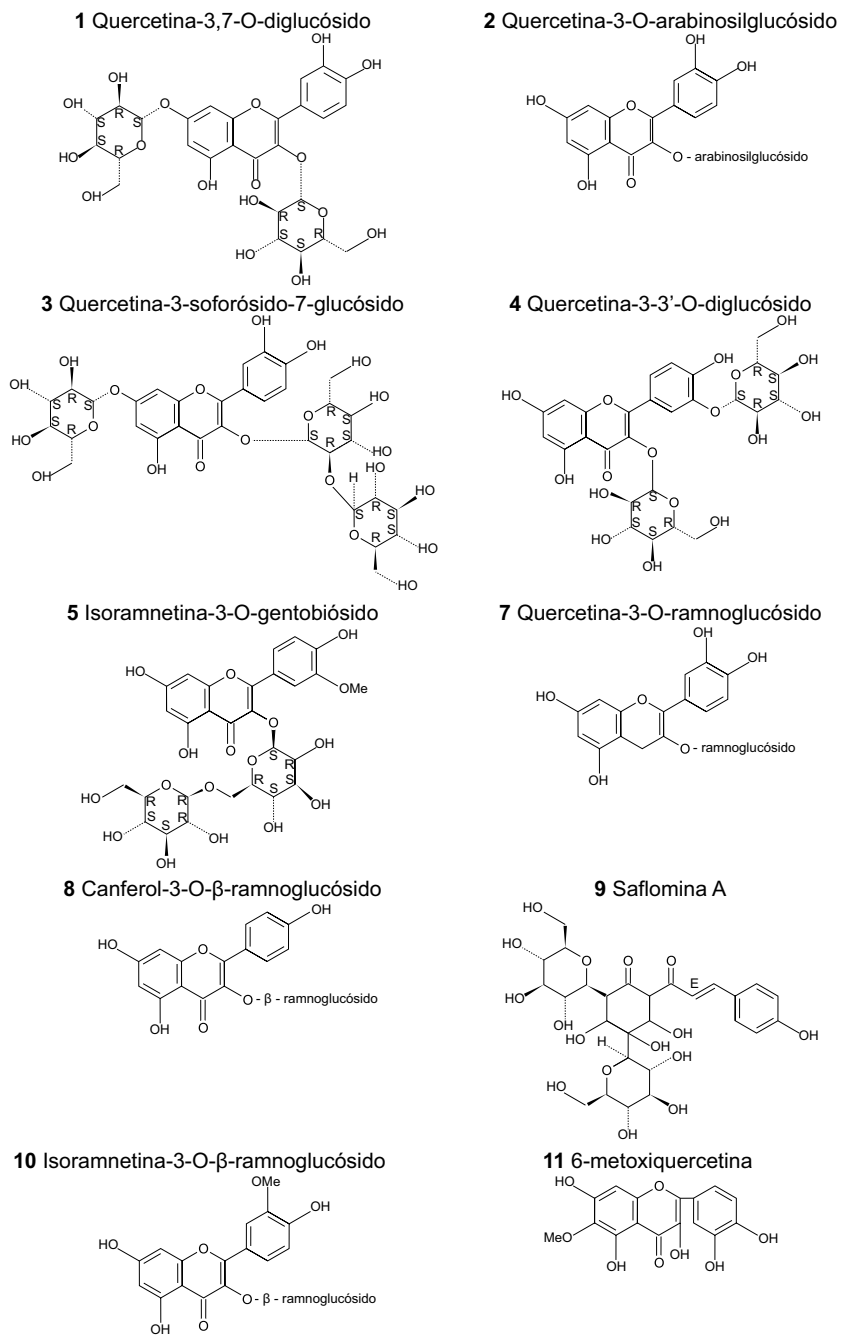
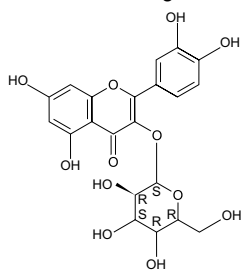
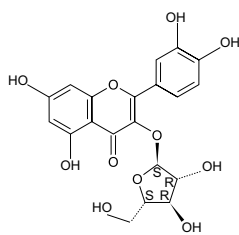
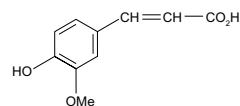
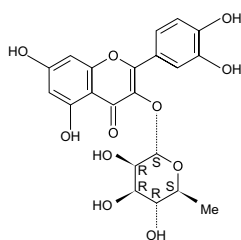
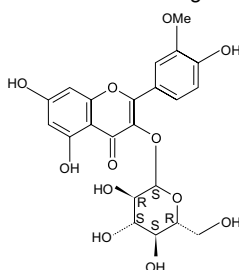
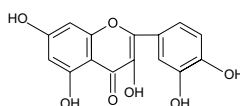
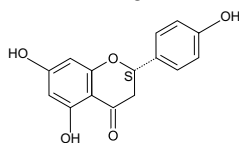


Fig. 2. Estructura de los compuestos 1 a 5 y 7 a 11 encontrados en el polen de *Zea*.

12 Quercetina-3-O-galactósido**13 Quercetina-3- α -L-arabinofuranósido****14 Ácido ferúlico****15 Quercetina-ramnósido****16 Isoramnetina-3-O-D-glucósido****18 Quercetina****19 Naringenina**Fig. 3. Estructura de los compuestos **12** a **16**, y **18** a **19** encontrados en el polen de *Zea*.

len de maíz, pero esos autores mencionaron que el canferol-3-*O*-glucósido (fórmula: $C_{21}H_{20}O_{11}$, peso molecular: 448.38, λ_{max} : 266, 297sh, 349) (Sakakibara et al., 2003; hoja de información técnica de Sigma Aldrich para ese compuesto) como el único derivado de canferol en el polen de esa especie, y de acuerdo con nuestros resultados, el único derivado de canferol encontrado fue el canferol-3-*O*- β -ramnoglucósido (**8**, fórmula: $C_{27}H_{29}O_{15}$, m/z : 593.15, λ_{max} : 266, 300sh, 350, Cuadros 2 y 3, Fig. 2).

Recientemente, Chantarudee et al. (2012) reportaron la presencia de hidroquinona y 7-*O*-*R*-apigenina en las microsporas de maíz. En nuestro estudio, esos dos compuestos no fueron encontrados en el polen de ninguna de las especies ni subespecies de *Zea* analizadas. Nuestros resultados están de acuerdo con los de Ceska y Styles (1984), quienes resaltaron la ausencia de flavonas en el polen de *Zea*

mays. Sin embargo, otras clases de fenoles, previamente no reportadas para tales microsporas, como ácidos fenólicos (9, 22, y 23) y dihidroflavonoides (19, 20, y 21) se detectaron en el presente estudio como compuestos menores en algunos de los parientes silvestres del maíz (Cuadros 2 y 3). La presencia de dihidroflavonoides fue previamente reportada en el polen de pinos (Strohl y Seikel, 1965).

Contrariamente a lo reportado por Ceska y Styles (1984), quienes mencionaron cuatro isoramnetinas glucósidos en el polen de maíz, y en contraste con Pollak et al. (1995), quienes no detectaron isoramnetina en el polen de ese mismo cereal, nosotros encontramos tres glicósidos de isoramnetina, la isoramnetina-3-*O*-gentobiósido (5) en todos los taxa de *Zea*, isoramnetina-3-*O*- β -ramnoglucósido (10) también en todos los taxa del género, e isoramnetina-3-*O*-D-glucósido (16) solamente en el polen de *Z. perennis* de Jalisco (694) y una población de *Z. mays* subsp. *parviglumis* (694).

Los flavonol-3-*O*-diglicósidos son los flavonoides más comúnmente acumulados en el polen, mientras que las agliconas se encuentran menos frecuentemente (Campos et al., 2002). Entre los pocos reportes que mencionan la presencia de flavonoides aglicona en el polen están el de Campos et al. (1997) en *Eucalyptus globulus*, y el de Campos et al. (2002) en Myrtaceae, subfamilia Leptospermoideae. Pollak et al. (1995) y previamente Larson y Lonergan (1972) registraron la acumulación de flavonoles agliconas además de flavonoles glicósidos en el polen de maíz. Sin embargo, con excepción de la quercetina aglicona (18), únicamente en el polen de *Zea diploperennis* de Nayarit (692), nosotros no encontramos flavonoles agliconas en los perfiles fenólicos del polen de *Zea*. Los flavonoides llevan a cabo diversas e importantes funciones en las plantas (Winkel-Shirley, 2001). Aunque no universalmente requeridos para la fertilidad del polen (Burbulis et al., 1996), en varias especies, incluyendo *Zea mays*, los flavonoles están involucrados en su germinación (Mo et al., 1992; Pollak et al., 1995). Esa función ha sido asociada a la quercetina, el canferol y a la miricetina (Ylstra et al., 1992; Vogt et al., 1995), pero particularmente en maíz se ha reportado la participación de la quercetina (Pollak et al., 1995). La predominancia de glicósidos de quercetina en el polen de todas las especies y subespecies de *Zea* analizadas en el presente estudio (Fig. 4) sugiere que, como en el maíz, la quercetina puede desempeñar una función similar en la germinación del polen y crecimiento del tubo polínico en las diferentes especies de teocintle.

Los perfiles fenólicos del polen de los diferentes taxa de *Zea* analizados fueron relativamente complejos (desde nueve compuestos en *Zea mays* susp. *mays*, a 14 en *Zea mays* subsp. *mexicana* raza Mesa Central de Michoacán, muestra 426, y de Durango, muestras 705 y 710), comparados con el número de compuestos en-

contrados en el polen de otras especies, como *Agave durangensis* (Agavaceae), que varió entre seis y siete, todos los compuestos siendo derivados glicósidos de canferol (Almaraz-Abarca et al., 2009); cinco especies de Myrtaceae, que variaron de dos a cuatro flavonas agliconas (Campos et al., 2002); *Bidens odorata* (Compositae), que fue de tres, dos canferol glicósidos y un ácido cinámico (Almaraz-Abarca et al., 2004); y *Salix atrocinerea*, que fue de dos, el canferol-3-*O*-neo-hesperidósido y un derivado de ácido caféico (Campos, 1997). Sin embargo, también se han reportado perfiles fenólicos de polen más complejos que los encontrados para el polen de las especies y subespecies de *Zea*, como el de *Stenocactus multicosatus* subsp. *zacatecasensis* (Cactaceae), formado por 14 a 19 compuestos, y el de *Echinocereus pectinatus* (Cactaceae), compuesto por 12 a 17 (Almaraz-Abarca et al., 2007).

Pocos compuestos, todos ellos menores, se encontraron de manera exclusiva en alguno de los taxa de *Zea* analizados. La saflomina A (**9**) y el ácido ferúlico (**14**) fueron privativos del polen de *Z. perennis* de Jalisco (muestra 694). La quercetina-3- α -L-arabinofuranósido (**13**) estuvo presente solamente en *Z. diploperennis* (muestras 551 y 692). La quercetina aglicona (**18**) fue peculiar del polen de *Z. diploperennis* de Nayarit (muestra 692), y el compuesto **20**, un dihidroflavonoide, se detectó únicamente en el de *Z. mays* subsp. *parviglumis* del sur de Guerrero (muestra 654). Aparte de esas diferencias, las microsporas de las especies y subespecies de *Zea* analizadas mostraron patrones muy similares de fenoles principales (Fig. 4). Los seis primordiales compuestos (**1**, **3**, **4**, **5**, **7** y **12**) tuvieron la misma tendencia de acumulación en todas las muestras de polen de *Zea* analizadas (Fig. 4). El perfil formado por esos seis fenoles se podría considerar como un marcador químico para el género.

De acuerdo con Rice-Evans (1999), la estructura *O*-dihidroxi en el anillo B, el anillo C insaturado, y la estructura 5,7-dihidroxi en el anillo A de la quercetina confieren un alto potencial antioxidante, mientras que el anillo B, con un solo grupo 4'-hidroxil del canferol y la isoramnetina les da a esos compuestos menores niveles de tal propiedad. La predominancia de glicósidos de quercetina sobre los de canferol e isoramnetina en el polen de los teocintles sugiere que tales microsporas representan una fuente importante de antioxidantes naturales, que pueden encontrarse formando parte de las mezclas polínicas de origen apícola, como ha sido corroborado por Almaraz-Abarca et al. (2004).

Variación interspecífica e intraspecífica

Los flavonoides son los principales marcadores quimiotaxonómicos (Markham, 1982; Campos et al., 2002; Almaraz-Abarca et al., 2004), pero los ácidos fenólicos también poseen cierto valor como indicadores químicos (Van Sume-

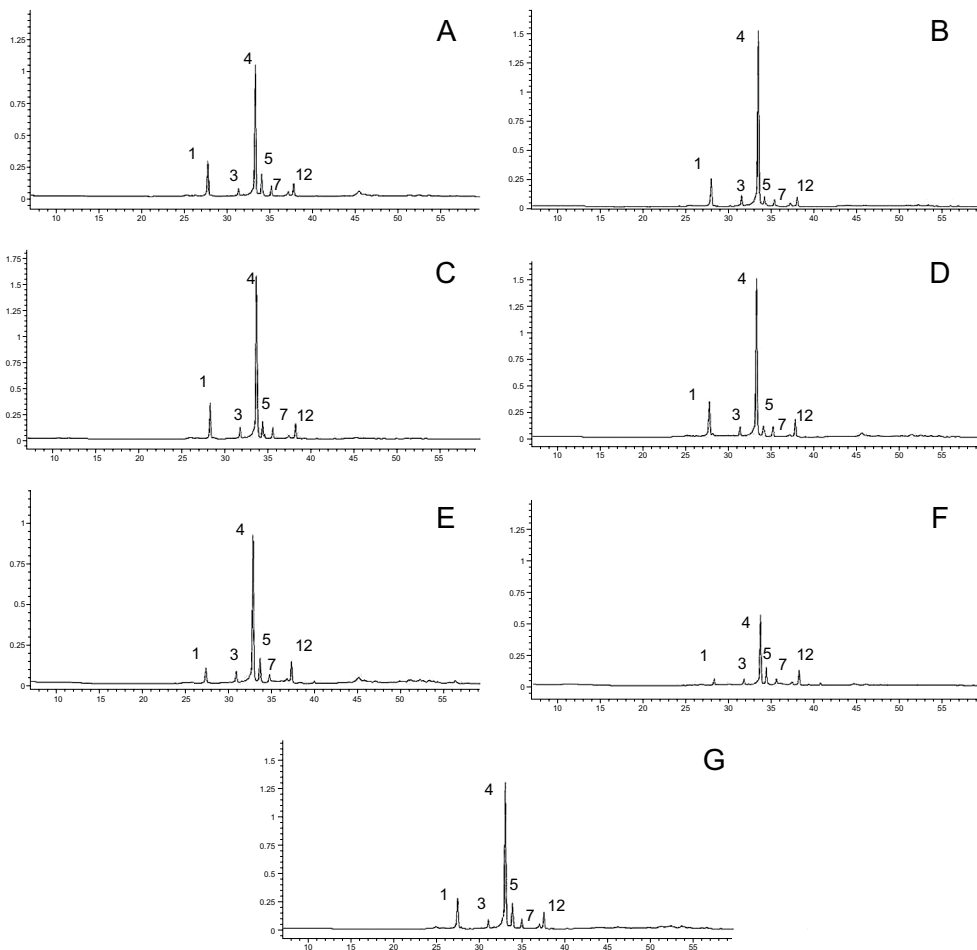


Fig. 4. Cromatogramas de HPLC de los polen de A: *Zea mays* subsp. *parviglumis* (muestra 201), B: *Z. mays* subsp. *mexicana* raza Mesa Central (muestra 426), C: *Z. mays* subsp. *mexicana* raza Nobogame (muestra 607), D: *Z. mays* subsp. *mexicana* raza Chalco (muestra 615), E: *Z. diploperennis* (muestra 551), F: *Z. perennis* (muestra 694), G: *Z. luxurians* (muestra G3). Los números de los picos corresponden al del compuesto como aparece en el Cuadro 2.

re, 1989), y pueden ser acumulados de manera ubicua a niveles importantes en los tejidos vegetales (Tamagnone et al., 1998). El polen de algunas especies de plantas es particularmente rico en ácidos fenólicos (Campos, 1997; Almaraz-Abarca et al., 2004, 2007), pero éstos pueden estar completamente ausentes en las microsporas de otras (Almaraz-Abarca et al., 2009). Con base en los perfiles completos de los fe-

noles del polen, incluyendo los tres ácidos fenólicos encontrados, los resultados del presente estudio permitieron discernir algunas variaciones inter e intraespecíficas en *Zea* (Fig. 5).

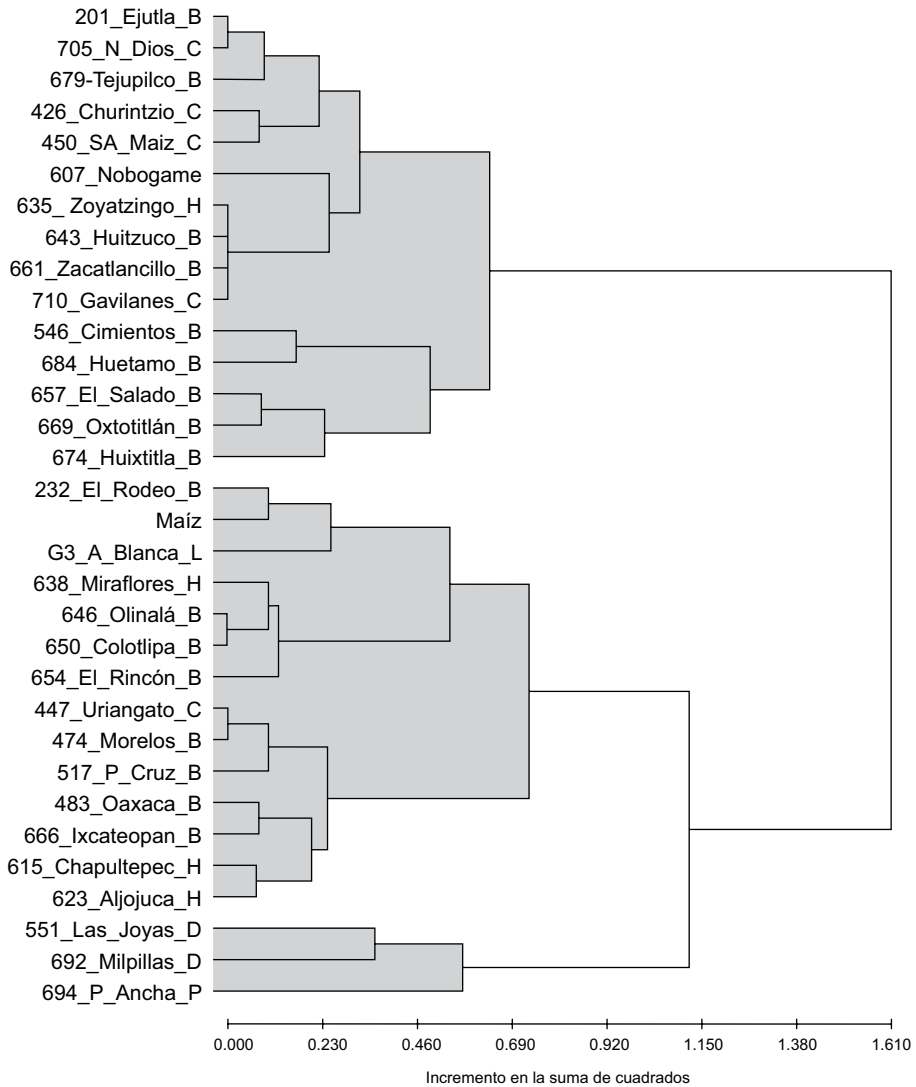


Fig. 5. Agrupamiento de los taxa de *Zea* enlistados en el Cuadro 1, con base en el método de Ward (B = Raza Balsas, H = Raza Chalco, C = Raza Mesa Central, L = *Z. luxurians*, D = *Z. diploperennis*, P = *Z. perennis*).

El hecho de que todas las muestras del presente estudio fueron colectadas de plantas que crecieron bajo las mismas condiciones ambientales permite inferir que las diferencias encontradas en los perfiles fenólicos son el resultado de variaciones genéticas que dirigen un orden secuencial definido en la ruta de la biosíntesis. Esto es, de acuerdo con Heller y Forkmann (1994), propio y peculiar para cada especie de planta, y muchos de los pasos individuales de las modificaciones de los flavonoides están controlados por genes individuales (Forkmann, 1994).

El procedimiento de validación de árbol del método Clustan Graphics (Wishart, 2006), basado en 5000 pruebas aleatorias, encontró el número óptimo de grupos (clusters) y dividió a las muestras de teocintle en tres grupos. Este análisis, basado en una matriz binaria, reveló que los perfiles fenólicos del polen, difiriendo principalmente en compuestos menores, acomodan a *Z. perennis* y *Z. diploperennis* en uno de los tres conjuntos (Fig. 5). Estos resultados apoyan parcialmente la actual división del género *Zea* aceptada por varios autores (Doebley y Iltis, 1980; Iltis y Doebley, 1980; Doebley, 1990; Iltis y Benz, 2000; Sánchez et al., 2011). Sin embargo, la separación de las secciones *Luxuriantes* y *Zea* propuesta por Doebly e Iltis (1980) no fue claramente encontrada, ya que *Z. luxurians* (G3) se situó fuera del grupo de *Z. perennis* y *Z. diploperennis* (Fig. 5), las otras dos especies de la sección *Luxuriantes*. El perfil fenólico del polen de *Z. luxurians* estuvo más cercanamente relacionado con los de *Z. mays* subsp. *parviglumis* y de maíz, que con cualquiera de las otras dos especies de *Zea* de la sección *Luxuriantes*. Una relación más cercana entre *Z. luxurians* y *Z. mays* subsp. *parviglumis* que entre *Z. luxurians* y *Z. perennis* o *Z. diploperennis* fue también encontrada por Tiffin y Gaut (2001), con base en la variabilidad de secuencia de cuatro loci nucleares. Zimmer et al. (1988), Purugganan y Wesler (1994), Buckler y Holtsford (1996), y Tiffin y Gaut (2001), basándose en varias clases de datos moleculares, opinaron que la sección *Luxuriantes* no es un grupo natural. Nuestros resultados representan evidencia química que apoya la propuesta de esos autores.

Tiffin y Gaut (2001) reportaron que *Zea perennis* es un autotetraploide derivado de *Z. diploperennis*. Nuestros datos químicos revelaron una relación cercana entre las dos muestras de teocintles perennes diploides (población 551 y población 692), y entre éstas y la especie perenne tetraploide (población 694), las tres formando un solo grupo (Fig. 5), lo cual da evidencia para apoyar el dictamen de Tiffin y Gaut (2001). Sin embargo, la baja variabilidad encontrada en los perfiles fenólicos del polen no permite inferir acerca del origen autotetraploide de *Z. perennis* a partir de *Z. diploperennis*.

La cercana relación entre *Zea mays* subsp. *mays* con *Z. mays* subsp. *parviglumis* y *Z. mays* subsp. *mexicana* propuesta por algunos autores (Doebley et al., 1987) es sustentada por la similitud de sus patrones fenólicos polínicos. En dos de los tres grupos formados por el análisis de cluster (Fig. 5), poblaciones de la subsp. *mexicana* y la subsp. *parviglumis* se mezclan unas con otras, y algunas de las dos subespecies tienen perfiles fenólicos del polen muy similares, como la 474 de la subsp. *parviglumis* y la 447 de la subsp. *mexicana*; la 201 de la subsp. *parviglumis* y la 705 de la subsp. *mexicana*; y las 643 y 661 de la subsp. *parviglumis* y las 710 y 635 de la subsp. *mexicana* (Fig. 5). De manera similar a los resultados basados en el análisis de restricción de cpDNA (Doebley et al., 1987), los perfiles fenólicos del polen no discriminan entre *Z. mays* subsp. *mexicana* y *Z. mays* subsp. *parviglumis* (Fig. 5), diferenciación que sí ha podido realizarse usando datos de isozimas, morfológicos (Doebley, 1983; Goodman y Stuber, 1983; Doebley et al., 1984), y moleculares de genoma nuclear (Fukunga et al., 2005). Nuestros resultados sugieren que en el género *Zea* la tasa de evolución de los patrones fenólicos del polen ha estado desacoplada de la evolución de caracteres moleculares nucleares, bioquímicos y morfológicos. Un desacoplamiento similar de la evolución de caracteres ha sido reportada para el género *Plagiomnium* de musgos (Harris, 2009). Esa incongruencia entre diferentes clases de atributos ha sido explicada como una evolución asincrónica de marcadores (Hörandl, 2010).

La hibridación y la introgresión son eventos frecuentemente encontrados en muchas poblaciones naturales de plantas (Harborne y Turner, 1984), y su importancia en promover cambios evolutivos es tal que varios autores han estimado que alrededor de 70% de todas las especies de angiospermas se han originado por hibridación (Arnold, 1994; Whitham et al., 1999). La hibridación origina variación cualitativa y cuantitativa en los patrones de metabolitos secundarios (Orians et al., 2000), generando más variabilidad en las generaciones de híbridos posteriores a F1 (Rieseberg y Ellstrand, 1993). La baja diversidad encontrada en los perfiles fenólicos del polen de las especies y subespecies analizadas de *Zea* apoya lo reportado por Ross-Ibarra et al. (2009) acerca de que la hibridación y la introgresión, que de haber ocurrido entre varias taxa de *Zea*, no han sido eventos comunes. Los patrones actuales de distribución geográfica, en los que muchas poblaciones no se encuentran en forma simpátrica (Sánchez et al., 2011), sustenta también la afirmación de Ross-Ibarra et al. (2009).

La baja variabilidad encontrada en el presente trabajo en los patrones fenólicos del polen de *Zea* sugiere que esos perfiles han estado muy conservados durante el surgimiento de las diferentes especies del género, lo cual ocurrió casi de manera contemporánea hace 100,000 a 300,000 años (Gaut y Clegg, 1993; Ross-Ibarra et al.,

2009), lo que podría estar asociado al importante papel que los flavonoides llevan a cabo en el funcionamiento normal del polen (Coe et al., 1981), como ha sido corroborado en maíz (Pollak et al., 1995).

Nuestros resultados se suman a la propuesta de algunos autores (Doebley et al., 1984; Doebley et al., 1987) de considerar al maíz y algunos teocintles como grupos conespecíficos, los cuales comparten procesos celulares esenciales del desarrollo (Dermastia et al., 2009) pues también comparten procesos cruciales de la síntesis y acumulación de fenoles en las estructuras reproductivas masculinas, como lo revela la semejanza encontrada de los perfiles fenólicos.

El perfil fenólico del polen de maíz y el de algunas poblaciones de *Zea mays* subsp. *parviglumis*, particularmente la 232 de Jalisco, son muy similares (Fig. 5). Esa semejanza brinda evidencia química que apoya la propuesta de Doebley et al. (1987) de que esa subespecie fue la progenitora del maíz.

CONCLUSIONES

El polen de *Zea mays* subsp. *mexicana*, *Z. mays* subsp. *parviglumis*, *Z. mays* subsp. *mays*, *Z. diploperennis*, *Z. perennis*, y *Z. luxurians* tienen patrones similares de acumulación de compuestos fenólicos, principalmente derivados glicósidos de quercetina, lo que lo hace una fuente importante de flavonoides antioxidantes. Los perfiles fenólicos de las especies y subespecies de *Zea* son muy semejantes, lo que es una evidencia química que apoya los hallazgos que han hecho diversos autores de que el maíz y algunos teocintles son grupos conespecíficos. La separación, con base en los perfiles fenólicos del polen, de *Z. luxurians* del grupo de *Z. perennis* y *Z. diploperennis* sustentan la propuesta de que la sección *Luxuriantes* no es un grupo natural.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Comisión de Operación y Fomento a las Actividades Académicas (COFAA) por los estímulos a la investigación, al Instituto Politécnico Nacional por el financiamiento de la investigación a través del proyecto SIP 20110499, y a Patricia García Salas y Celia Rodríguez del Centro de Investigación y Desarrollo del Alimento Funcional de Granada, España por su ayuda en los análisis de UPLC.

LITERATURA CITADA

- Almaraz-Abarca, N., M. G. Campos, J. A. Ávila-Reyes, N. Naranjo-Jiménez, J. Herrera-Corral y L. S. González-Valdez. 2004. Variability of antioxidant activity among honeybee-collected pollen of different botanical origin. *Interciencia* 29: 574-578.
- Almaraz-Abarca, N., M. S. González-Elizondo, J. A. Tena-Flores, J. A. Ávila-Reyes, J. Herrera-Corral y N. Naranjo-Jiménez. 2006. Foliar flavonoids distinguish *Pinus leiophylla* and *Pinus chihuahuana* (Coniferales: Pinaceae). *Proc. Biol. Soc. Wash.* 119: 426-436.
- Almaraz-Abarca, N., M. G. Campos, A. Delgado-Alvarado, J. A. Ávila-Reyes, N. Naranjo-Jiménez, J. Herrera-Corral, A. F. Tomatas, A. J. Almeida y A. Vieira. 2007. Fenoles del polen de *Stenocactus*, *Echinocereus* y *Mammillaria* (Cactaceae). *Polibotánica* 23: 37-55.
- Almaraz-Abarca, N., M. G. Campos, E. A. Delgado-Alvarado, J. A. Ávila-Reyes, J. Herrera-Corral, L. S. González-Valdez, N. Naranjo-Jiménez, C. Frigerio, A. F. Tomatas, A. J. Almeida, A. Vieira y J. N. Uribe-Soto. 2008. Pollen flavonoid/phenolic acid composition of four species of Cactaceae and its taxonomic significance. *Am. J. Agr. Biol. Sci.* 3: 534-543.
- Almaraz-Abarca, N., E. A. Delgado-Alvarado, V. Hernández-Vargas, M. Ortega-Chávez, G. Orea-Lara, A. Cifuentes-Díaz de León, J. A. Ávila-Reyes y R. Muñiz-Martínez. 2009. Profiling of phenolic compounds of somatic and reproductive tissues of *Agave durangensis* Gentry (Agavaceae). *Am. J. Appl. Sci.* 6: 1076-1085.
- Arnold, M. L. 1994. Natural hybridization and Louisiana irises. *BioScience* 44: 141-147.
- Buckler, E. S. y T. P. Holtsford. 1996. *Zea* systematics: ribosomal ITS evidence. *Mol. Biol. Evol.* 13: 612-622.
- Burbullis, I. E., M. Iacobucci y B. E. Shirley. 1996. A null mutation in the first enzyme of flavonoid biosynthesis does not affect male fertility in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 8: 1013-1025.
- Campos, R. M. G. 1997. Caracterização do polen apícola pelo seu perfil em compostos fenólicos e pesquisa de algumas actividades biológicas. Dissertação de candidatura ao grado de Doutor. Universidade de Coimbra. Coimbra, Portugal. 318 pp.
- Campos, M. G. y K. M. Markham. 2007. Structure information from HPLC and on-line measured absorption spectra-flavone, flavonols and phenolic acids. Coimbra University Press. Coimbra, Portugal. 118 pp.
- Campos, M., K. R. Markham, K. A. Mitchell y A. Proença da Cunha. 1997. An approach to the characterization of bee pollens via their flavonoid/phenolic profiles. *Phytochem. Anal.* 8: 181-185.
- Campos, M. G., R. F. Webby y K. R. Markham. 2002. The unique occurrence of the flavone aglycone triclin in Myrtaceae pollen. *Z. Naturforsch C* 57c: 944-946.
- Casati, P. y V. Walbot. 2003. Gene expression profiling in response to ultraviolet radiation in maize genotypes with varying flavonoid content. *Plant Physiol.* 132: 1739-1754.
- Ceska, O. y E. D. Styles. 1984. Flavonoids from *Zea mays* pollen. *Phytochemistry* 23: 1822-1823.

- Chantarudee, A., P. Phuwapraisirisan, K. Kimura, M. Okuyama, H. Mori, A. Kimura y C. Chanchao. 2012. Chemical constituents and free radical scavenging activity of corn pollen collected from *Apis mellifera* hives compared to floral corn pollen at Nam, Thailand. *BMC Complement. Altern. Med.* 12: 45.
- Coe, E. H., S. M. McCormick y S. A. Modena. 1981. White pollen in maize. *J. Hered.* 72: 318-320.
- Cohen, J. I. y W. C. Galinat. 1984. Potential use of alien germoplasm for maize improvement. *Crop Sci.* 24: 1011-1015.
- Dahia, M., L. Siracusa, H. Laouer y G. Ruberto. 2009. Constituents of the polar extracts from Algerian *Pituranthos scoparius*. *Nat. Prod. Commun.* 4: 1691-1692.
- Dermastia, M., A. Kladnik, J. D. Koce y P. S. Chourey. 2009. A cellular study of Teosinte *Zea mays* subsp. *parviglumis* (Poaceae) caryopsis development showing several processes conserved in maize. *Am. J. Bot.* 96: 1798-1807.
- Doebley, J. 1990. Molecular systematics of *Zea* (Gramineae). *Maydica* 35: 143-150.
- Doebley, J. 1983. The maize and teosinte male inflorescence: a numerical taxonomic study. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 70: 32-70.
- Doebley, J., M. M. Goodman y C. W. Stuber. 1984. Isoenzymatic variation in *Zea* (Gramineae). *Syst. Bot.* 9: 203-218.
- Doebley, J. y H. H. Iltis. 1980. Taxonomy of *Zea* (Gramineae) I. A subgeneric classification with key to taxa. *Am. J. Bot.* 67: 982-993.
- Doebley, J., W. Renfroe y A. Blanton. 1987. Restriction site variation in the *Zea* chloroplast genome. *Genetics* 117: 139-147.
- Ferracane, R., G. Graziani, M. Gallo, V. Fogliano y A. Ritieni. 2010. Metabolic profile of the bioactive compounds of burdock (*Arctium lappa*) seeds, roots and leaves. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51: 399-404.
- Fiasson, J., L. K. Gluchoff-Fiasson y G. Dahlgren. 1997. Flavonoid patterns in European *Ranunculus* L. subgenus *Batrachium* (Ranunculaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 25: 327-333.
- Forkmann, G., 1994. Genetics of flavonoids. In: Harborne, J. B. (ed.). *The Flavonoids. Advances in Research since 1986*. Chapman & Hall. London, UK. pp. 537-564.
- Fukunga, K., J. Hill, Y. Vigouroux, Y. Matsuoka, G. J. Sánchez, K. Liu, E. S. Buckler y J. Doebley. 2005. Genetic diversity and population structure of teosinte. *Genetics* 169: 2241-2254.
- Gardana, C., M. Scaglianti, P. Pietta y P. Simonetti. 2007. Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 45: 390-399.
- Gaut, B. S. y M. T. Clegg. 1993. Molecular evolution of the *Adh1* locus in the genus *Zea*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90: 5095-5099.
- Goodman, M. M. y C. W. Stuber. 1983. Races of maize VI. Isozyme variation among races of maize in Bolivia. *Maydica* 28: 169-187.
- Gross, J. H. 2010. *Mass spectrometry. A textbook*. 2nd ed. Springer. Berlin, Germany. 753 pp.
- Harborne, J. B. y B. L. Turner. 1984. *Plant chemosystematics*. Academic Press. London, UK. 562 pp.

- Harris, E. S. J. 2009. Phylogenetic and environmental lability of flavonoids in a medicinal moss. *Biochem. Syst. Ecol.* 37: 180-192.
- Heller, W. y G. Forkmann. 1994. Biosynthesis of flavonoids. In: Harborne, J. B. (ed.). *The flavonoids. Advances in research since 1986.* Chapman & Hall. London, UK. pp. 499-535.
- Hiraoka, A., K. Yoshitama, T. Hine, T. Tayeoka y T. N. Tateoka. 1987. Isotachopheresis of flavonoids. *Chem. Pharm. Bull.* 35: 4317-4320.
- Hörandl, E. 2010. Beyond cladistics: extending evolutionary classification into deeper time levels. *Taxon* 59: 345-350.
- Iltis, H. H. y B. F. Benz. 2000. *Zea nicaraguensis* (Poaceae), a new teosinte from Pacific Coastal Nicaragua. *Novon* 10: 382-390.
- Iltis, H. H. y J. F. Doebley. 1980. Taxonomy of *Zea* (Graminae) II. Subspecific categories in the *Zea mays* complex and a generic synopsis. *Am. J. Bot.* 67: 994-1004.
- Iswaldi, I., D. Arráez-Román, I. Rodríguez-Medina, J. Beltrán-Debón, J. Joven, A. Segura-Carretero y A. Fernández-Gutiérrez. 2011. Identification of phenolic compounds in aqueous and ethanolic rooibos extracts (*Aspalathus linearis*) by HPLC-ESI-MS (TOF/IT). *Anal. Bioanal. Chem.* 400: 3643-3654.
- Larson R. L. y C. M. Lonergan. 1972. Glucosyltransferase activity in a water extract of maize pollen. *Planta* 103: 361-364.
- Lee, E. A., P. F. Byrne, M. D. McMullen, M. E. Snook, B. R. Wiseman, N. W. Widstrom y E. H. Coe. 1998. Genetic mechanisms underlying apimaysin and maysin synthesis and cornantibiosis in maize (*Zea mays* L.). *Genetics* 149: 1997-2006.
- Mabry, T. J., K. M. Markham y M. B. Thomas. 1970. *The systematic identification of flavonoids.* Springer-Verlag. New York, USA. 354 pp.
- Markham, K. R. 1982. *Techniques of flavonoid identification.* Academic Press. London, UK. 113 pp.
- Markham, K. R. y M. Campos. 1996. 7- and 8-O-methylherbacetin-3-O-sophorosides from bee pollens and some structure/activity observations. *Phytochemistry* 43: 763-767.
- Mo, Y., C. Nagel y L. P. Taylor. 1992. Biochemical complementation of chalcone synthase mutants defines a role for flavonols in functional pollen. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 89: 7213-7217.
- Morikawa, T., L. Wang, S. Nakamura, K. Ninomiya, E. Yokoyama, H. Matsuda, O. Muraoka, L. Wu y M. Yoshikawa. 2009. Medicinal flowers. XXVII. New flavanone and chalcone glycosides, arenariumosides I, II, and IV, and tumor necrosis factor- α inhibitors from everlasting, flowers of *Helichrysum arenarium*. *Chem. Pharm. Bull.* 57: 361-367.
- Nault, L. R. y W. R. Findley. 1981. *Zea diploperennis*: a primitive relative offers new traits to improve corn. *Ohio Rep. Res. Dev.* 66: 90-92.
- Orians, C. M., M. Griffiths, B. M. Roche y R. S. Fritz. 2000. Phenolic glycosides and condensed tannins in *Salix sericea*, *S. eriocephala* and their F1 hybrids: not all hybrids are created equal. *Biochem. Syst. Ecol.* 28: 619-632.
- Pollak, P. E., K. Hansen, J. D. Astwood y L. P. Taylor. 1995. Conditional male fertility in maize. *Sex Plant Reprod.* 8: 231-241.
- Purugganan, M. D. y S. R. Wessler. 1994. Molecular evolution of *megallan*, a maize Ty3/*gypsy* like retrotransposon. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91: 11674-11678.

- Rice-Evans, C. 1999. Screening of phenolics and flavonoids for antioxidant activity. In: Packer, L., M. Hiramatsu y T. Yoshikawa (eds.). *Antioxidant food supplements in human health*. Academic Press. California, USA. pp. 239-253.
- Rieseberg, L. H. y N. C. Ellstrand. 1993. What can molecular and morphological markers tell us about plant hybridization? *Crit. Rev. Plant Sci.* 12: 213-241.
- Rochfort, S. J., M. Imsic, R. Jones, V. C. Trenerry y B. Tomkins. 2006. Characterization of flavonol conjugates in immature leaves of pak choi [*Brassica rapa* L. ssp. *chinensis* L. (Hanelt)] by HPLC-DAD and LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* 54: 4855-4860.
- Ross-Ibarra, J., M. Tenaillon y B. S. Gaut. 2009. Historical divergence and gene flow in the genus *Zea*. *Genetics* 181: 1399-1413.
- Sakakibara, H., Y. Honda, S. Nakagawa, H. Ashida y K. Kanasawa. 2003. Simultaneous determination of all phenolics in vegetables, fruits, and teas. *J. Agric. Food Chem.* 51: 571-581.
- Sánchez-González, J. J., Y. T. A. Kato, S. M. Aguilar, C. J. M. Hernández, R. A. López y C. J. A. Ruiz. 1998. Distribución y caracterización del teocintle. INIFAP. Guadalajara, México. 149 pp.
- Sánchez, J. J., M. M. Goodman y C. W. Stuber. 2000. Isozymatic and morphological diversity in the races of maize of Mexico. *Econ. Bot.* 54: 43-59.
- Sánchez G., J. J., L. De la Cruz L., V. A. Vidal M., J. Ron P., S. Taba, F. Santacruz-Ruvalcaba, S. Sood, J. B. Holland, J. A. Ruiz C., S. Carvajal, F. Aragón C., V. H. Chávez T., M. M. Morales R. y R. Barba-González. 2011. Three new teosintes (*Zea* spp., Poaceae) from Mexico. *Am. J. Bot.* 98: 1537-1548.
- Schieber, A., N. Berardini y R. Carle. 2003. Identification of flavonol and xanthone glycosides from mango (*Mangifera indica* L. Cv. "Tommy Atkins") peels by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 51: 5006-5011.
- Strohl, M. J. y M. K. Seikel. 1965. Polyphenols of pine pollen: a survey. *Phytochemistry* 4: 383-399.
- Tamagnone, L., A. Merida, N. Stacy, K. Plaskitt, A. Parr, C. F. Chang, D. Lynn, J. Maxwell, K. Roberts y C. Martin. 1998. Inhibition of phenolic acid metabolism results in precocious cell death and altered cell morphology in leaves of transgenic tobacco plants. *Plant Cell* 10: 1801-1816.
- Tao, W., N. Yang, J. Duan, D. Wu, J. Gou, Y. Tang, D. Qian y Z. Zhu. 2011. Simultaneous determination of eleven major flavonoids in the pollen of *Typha angustifolia* by HPLC-PDA-MS. *Phytochem. Anal.* 22: 455-461.
- Tiffin, P. y B. S. Gaut. 2001. Sequence diversity in the tetraploid *Zea perennis* and the closely related diploid *Z. diploperennis*: insights from four nuclear loci. *Genetics* 158: 401-412.
- Vallejo, F., F. A. Tomás-Barberán y F. Ferreres. 2004. Characterization of flavonols in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) by liquid chromatography-UV diode-array detection-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1054: 181-193.
- Van Sumere, C. F. 1989. Phenols and phenolic acids. In: Harborne, J. B. (ed.). *Methods in plant biochemistry*. Vol 1. Academic Press. London, UK. pp. 29-73.

- Wiermann, R. y K. Vieth. 1983. Outer pollen wall, an important accumulation site for flavonoids. *Protoplasma* 118: 230-233.
- Vogt, T., E. Wollenweber y L. P. Taylor. 1995. The structural requirements of flavonols that induce pollen germination of conditionally male fertility petunia. *Phytochemistry* 38: 589-592.
- Whitham, T. G., G. D. Martinsen, K. D. Floate, H. S. Dungey, B. M. Potts y P. Keim. 1999. Plant hybrid zones affect biodiversity: tools for a genetic-based understanding of community structure. *Ecology* 80: 416-428.
- Wilkes, G. 2004. Corn, strange and marvelous: but is a definitive origin known? In: Smith, C. W. (ed.). *Corn: origin, history, technology, and production*. John Wiley & Sons. New York, USA. pp. 3-63.
- Winkel-Shirley, B. 2001. It takes a garden. How work on diverse plant species has contributed to an understanding of flavonoid metabolism. *Plant Physiol.* 127: 1399-1404.
- Wishart, D. 2006. *Clustan graphics primer: A guide to cluster analysis*. Clustan Limited. Edinburgh, Scotland. 64 pp.
- Ylstra, B., T. Alisher, M. R. M. Benito, E. Stöger, A. J. van Tunen, O. Vicente, J. N. M. Mol y E. Heberle-Bors. 1992. Flavonols stimulate development, germination, and tube growth of tobacco pollen. *Plant Physiol.* 100: 902-907.
- Zhang, X., R. Boytner, J. L. Cabrera y L. Richard. 2007. Identification of yellow dye types in pre-columbian Andean textiles. *Anal. Chem* 79: 1575-1582.
- Zhang, Q. y H. Cui. 2005. Simultaneous determination of quercetin, kaempferol, and isorhamnetin in phytopharmaceuticals of *Hippophae rhamnoides* L. by high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. *J. Sep. Sci.* 28: 1171-1178.
- Zimmer, E. A. y E. R. Jupe, V. Walbot. 1988. Ribosomal gene structure, variation and inheritance in maize and its ancestors. *Genetics* 120: 1125-1136.

Recibido en enero de 2013.

Aceptado en junio de 2013.