

# CONFIRMATION OF GRAIN AMARANTH (*Amaranthus* spp.) LANDRACES BY CANONICAL DISCRIMINANT ANALYSIS

## CONFIRMACIÓN DE RAZAS GEOGRÁFICAS DE AMARANTO (*Amaranthus* spp.) POR ANÁLISIS DISCRIMINANTE CANÓNICO

Eduardo Espitia-Rangel<sup>1</sup>, Diana Escobedo-López<sup>2</sup>, Carlos A. Núñez-Colín<sup>3</sup>, Miriam J. Aguilar-Delgado<sup>1</sup>, Patricia Rivas-Valencia<sup>1\*</sup>, Luisa F. Sesma-Hernández<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Valle de México. Km.13.5 de la Carretera los Reyes-Texcoco, Coatlinchán, Texcoco, Estado de México, 56250, México. (rivas.patricia07@gmail.com). <sup>2</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Bajío. Km 6.5 Carretera Celaya-San Miguel de Allende, Roque, Celaya, Guanajuato, 38110, México. <sup>3</sup>Universidad de Guanajuato, Programa de Ingeniería en Biotecnología. Mutualismo #303 Esquina Prolongación Río Lerma, Colonia La Suiza, Apartado Postal 91, Celaya, Guanajuato, 38060, México.

### ABSTRACT

Grain amaranth refers to three species of genus *Amaranthus* (*Amaranthus cruentus*, *A. hypochondriacus*, and *A. caudatus*), which show a high morphological diversity, which is why it is treated since the 1990s to differentiate landraces and to contribute to the breeding programs. The aim of this investigation was to evaluate 53 genotypes within the native landraces: Aztec, Mercado, Mixtec, Nepal (*A. hypochondriacus*), African, Guatemalan, Mexican (*A. cruentus*), and South American (*A. caudatus*) using morphological and phenological traits. INIFAP-CEVAMEX accessions were used and planted at Santa Lucía de Prías, México (2013 spring-summer growing cycle) in order to record phenological and morphological data. Seeds were digitalized and analysed on ImageTool. Then, the Mahalanobis distance, a canonical discriminant analysis using landraces as classificatory variable, a MANOVA, and a Tukey mean comparison for canonical roots were performed; all analyses were processed on SAS. The canonical discriminant analysis perfectly distinguished the landraces, which was grouped according to the species. The main traits to distinguish the groups for Canonical Root 1 were traits related to phenology and plant morphology; for Canonical Root 2, traits related to shape of the seed, and for Canonical Root 3, traits related to size of the seed. Classification by landraces of the Mexican species of grain amaranth may be an alternative for systematics, conservation, management, and germplasm ordination for crop improvement.

### RESUMEN

El amaranto comprende tres especies del género *Amaranthus* (*Amaranthus cruentus*, *A. hypochondriacus* y *A. caudatus*), que presentan una diversidad morfológica alta, razón por la cual desde la década de 1990 se ha tratado de clasificarlas en razas para diferenciarlas y contribuir a los programas de mejoramiento genético. El objetivo de esta investigación fue evaluar 53 genotipos de razas nativas: Azteca, Mercado, Mixteca, Nepal (*A. hypochondriacus*), Africana, Guatemalteca, Mexicana (*A. cruentus*) y Sudamericana (*A. caudatus*), utilizando rasgos morfológicos y fenológicos. Las accesiones utilizadas se plantaron en el Campo Experimental Valle de México ubicado en Santa Lucía de Prías, estado de México (ciclo de cultivo primavera-verano 2013) para registrar las variables fenológicas y morfológicas. Las semillas se digitalizaron y analizaron con ImageTool. Después se realizó un análisis discriminante canónico con la distancia de Mahalanobis y las razas como variable clasificatoria; también se realizó un MANOVA y una comparación de medias de Tukey para raíces canónicas; todos los análisis se procesaron en SAS. El análisis discriminante canónico distinguió perfectamente las razas, las cuales se agruparon de acuerdo con su especie. Los rasgos principales para distinguir los grupos de la Raíz Canónica 1 fueron los relacionados con la fenología y la morfología de las plantas; para la Raíz Canónica 2, los rasgos relacionados con la forma de la semilla; y para la Raíz Canónica 3, los rasgos relacionados con el tamaño de la semilla. La clasificación por razas de las especies mexicanas de amaranto dan alternativas para sistemática, conservación, manejo y ordenación del germoplasma para el mejoramiento del cultivo.

\* Author for correspondence ♦ Autor para correspondencia.

Received: December, 2019. Approved: August, 2020.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 54: 927-937. 2020.

**Palabras clave:** razas de *Amaranthus*, morfología, caracterización de germoplasma, análisis discriminante canónico, sistemática.

**Key words:** *Amaranthus* landraces, morphology, germplasm characterization, canonical discriminant analysis, systematics.

## INTRODUCTION

The genus *Amaranthus* consists of approximately 70 species, of which 40 are native to the Americas, 30 are from Australia, Africa, Asia, and Europe (Espitia *et al.*, 2012). However, *A. cruentus* L., *A. hypochondriacus* L., and *A. caudatus* L. are the grain amaranth species of major interest as an agricultural crop in many regions of the world (Kaufmann, 1992), since their seeds have an exceptionally high nutritional value (Espitia *et al.*, 2012). *Amaranthus cruentus* L. and *A. hypochondriacus* L. were domesticated by some pre-hispanic groups within Mexico's territory that used this plant in their diet and for religious rituals (Moran *et al.*, 2012). The cultivation of grain amaranth is concentrated in highland regions such as the Sierra Madre and the Trans-Mexican Volcanic Belt in Mexico, as well as in the Andean highlands and the Himalayan foothills (Escobedo *et al.*, 2014).

The availability of genetic diversity is a fundamental requirement for the crop improvement, which can be concentrated in a germplasm bank that also will help conserve the plant genetic resources (Massawe *et al.*, 2016). In Mexico, the germplasm collection of amaranth grains was used since the arrival of foreign missions from United States to search for this resource in 1982; collection of the available genetic variability of amaranth from Mexico began, together with those foreign groups. Nowadays, cultivated genotypes of the species *A. hypochondriacus* and *A. cruentus* are collected almost exclusively; they are also the most widely distributed in Mexico to produce grain amaranth (Espitia, 2018).

Regarding the wide variability shown by the main three species of amaranth and some other wild relatives, and based on the morphological groups described by Kaufmann (1992), Espitia (2018) described landraces of each amaranth species: *A. hypochondriacus* has five landraces (Aztec, Mercado, Mixtec, Nepal, and Spike), *A. cruentus* has three landraces (African, Guatemalan, and Mexican), and *A. caudatus* has three landraces (South American, Edulis, and Ornamental). Nonetheless, these landraces were classified mainly by their use and where they were commonly grown. There are no

## INTRODUCCIÓN

El género *Amaranthus* consta de aproximadamente 70 especies, de las cuales 40 son nativas de América, 30 son de Australia, África, Asia y Europa (Espitia *et al.*, 2012). Sin embargo, *A. cruentus* L., *A. hypochondriacus* L. y *A. caudatus* L. son las especies de amaranto de mayor interés como cultivo agrícola en muchas regiones del mundo (Kaufmann, 1992), ya que sus semillas tienen un valor nutricional excepcionalmente alto (Espitia *et al.*, 2012). Grupos prehispánicos dentro del territorio de México domesticaron *Amaranthus cruentus* L. y *A. hypochondriacus* L. porque usaban esta planta en su dieta y para rituales religiosos (Moran *et al.*, 2012). El cultivo del amaranto se concentra en regiones de tierras altas como la Sierra Madre y el Cinturón Volcánico Transmexicano en México, así como en la sierra andina y en las faldas del Himalaya (Escobedo *et al.*, 2014).

La disponibilidad de diversidad genética es un requisito fundamental para el mejoramiento de cultivos, que puede concentrarse en un banco de germoplasma que también ayudará a conservar los recursos fitogenéticos (Massawe *et al.*, 2016). En México, la colección de germoplasma de granos de amaranto se utilizó desde la llegada de misiones extranjeras de Estados Unidos que buscaban este recurso en 1982; se inició la recolección de la variabilidad genética disponible del amaranto de México, conjuntamente con esos grupos extranjeros. Actualmente se recolectan casi exclusivamente genotipos cultivados de las especies *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*; también son los más ampliamente distribuidos en México para la producción de grano de amaranto (Espitia, 2018).

Respecto a la variabilidad amplia mostrada por las tres especies principales de amaranto y algunos otros parientes silvestres, y con base en los grupos morfológicos descritos por Kaufmann (1992), Espitia (2018) describió las razas de cada especie de amaranto: *A. hypochondriacus* tiene cinco razas (Azteca, Mercado, Mixteca, Nepal y Espinosa), *A. cruentus* tiene tres razas (Africana, Guatemalteca y Mexicana) y *A. caudatus* tiene tres razas (Sudamericana, Edulis y Ornamental). No obstante, estas razas se clasificaron principalmente por su uso y el lugar donde se cultivaban comúnmente. No existen estudios de caracterización morfológica para distinguir razas, debido a que en México solo se vende grano mezclado y también se mezclan las plantas en parcelas agrícolas,

morphological characterization studies to distinguish these landraces, because only mixture grain for sale and mixture plants in agricultural plots are reported in Mexico, mainly of landraces Mercado and Mexican (Espitia *et al.*, 2010).

The hypothesis of this research is that the knowledge of amaranth variability and the grouping of under species will allow acquiring a better understanding and management of amaranth germplasm. The aim of this investigation was to carry out a characterization of germplasm of the South American (2), Aztec (12), Mercado (8), Mixtec (7), Nepal (10), African (4), Guatemalan (4), and Mexican (4) landraces by means of phenological traits, morphological traits, morphometric and micro-morphological traits of the seed and flower morphology, using canonical discriminant analysis (CDA).

**MATERIALS AND METHODS**

In the study, 53 accessions of the germplasm bank of the Campo Experimental Valle de México of the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Mexico were used (Table 1). Accessions were planted at Santa Lucía de Prías, estado de México, during the spring-summer growing cycle in 2013, under a single series without replicates. Phenological and morphological data were taken from 10 plants in each experimental plot.

Phenological traits such as days to inflorescence emergence, days to first anthesis, and days to maturity of the grain were

en especial de las razas Mercado y Mexicana (Espitia *et al.*, 2010).

La hipótesis de esta investigación es que el conocimiento de la variabilidad del amaranto y la agrupación en subespecies permitirá adquirir un mejor conocimiento y manejo del germoplasma del amaranto. El objetivo de esta investigación fue realizar una caracterización del germoplasma de las variedades Sudamericana (2), Azteca (12), Mercado (8), Mixteca (7), Nepal (10), Africana (4), Guatemalteca (4), y Mexicana (4) por medio de rasgos fenológicos, rasgos morfológicos, rasgos morfométricos y micro-morfológicos de la semilla y flor, y el uso del análisis canónico discriminante (CDA).

**MATERIALES Y MÉTODOS**

Para la investigación se utilizaron 53 accesiones del banco de germoplasma del Campo Experimental Valle de México del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), México (Cuadro 1). Las accesiones se sembraron en Santa Lucía de Prías, estado de México, durante el ciclo de cultivo primavera-verano de 2013, en serie sencilla sin repeticiones. Los datos fenológicos y morfológicos se registraron a partir de 10 plantas en cada parcela experimental.

Los rasgos fenológicos que se evaluaron son los días hasta la emergencia de la inflorescencia, los días hasta la primera antesis y días hasta la madurez del grano. Además, se observaron rasgos morfológicos: altura de la planta (cm), longitud de la inflorescencia (cm), longitud de la panícula (cm), número de panículas por inflorescencia, número de ramas por panícula, proporción

**Table 1. The fifty-three amaranth germplasm accessions used in this study were obtained from Germplasm Bank of INIFAP, Mexico.**

**Cuadro 1. Las 53 accesiones de germoplasma de amaranto utilizadas en este estudio se obtuvieron del Banco de Germoplasma del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), México.**

Species	Landrace	Number of accessions	Name of accessions
<i>A. caudatus</i>	South American	2	A572, A575
<i>A. cruentus</i>	African	4	78S-575, 79S-1038, 80S-409, 80S-624
<i>A. cruentus</i>	Guatemalan	4	80S-538, 80S-618, 80S-627, 81S-K112
<i>A. cruentus</i>	Mexican	6	654, 656, 660, 661, 662, 664
<i>A. hypochondriacus</i>	Aztec	12	146-1, 155, 156, 655, 665, 666, 667, 684, 685, 686, 687, 688
<i>A. hypochondriacus</i>	Mercado	8	81S-1024, 10-2-1, 10-4-2, 28, 137-1, 137-3, 141-7, 153-5-3
<i>A. hypochondriacus</i>	Mixtec	7	Opopeo, AG-73, 121, 122, 123, 124, 125
<i>A. hypochondriacus</i>	Nepal	10	A002, A004, A011, A021, A030, A1297, A1305, A1313, AG-21, AG-225

evaluated. In addition, morphological traits such as plant height (cm), inflorescence length (cm), panicle length (cm), number of panicles per inflorescence, number of branches per panicle, sexual ratio, glomeruli density per cm<sup>2</sup>, and 1000-seeds weight were evaluated. Also, based on Hernández *et al.* (2011), 50 seeds were digitalized using a HP Scanjet G2710 scanner with a ruler scaled to millimetre. Digitalized images were then analysed using the software ImageTool ver. 3.00 (Wilcox *et al.*, 1995). In this software calculated traits were major axis length (MaAL), minor axis length (MiAL, it is the higher perpendicular length of the major axis), area (A), and perimeter (P) of the seed were obtained, as well as the Feret diameter ( $FD=\sqrt{(4\cdot A)/\pi}$ ), roundness index ( $RI=(4\cdot \pi\cdot A)/P^2$ ), elongation index ( $EI=MaAL / MiAL$ ), and compactness index ( $CI=FD / MaAL$ ). Also, the flower morphology traits of bract length (mm), utricule length (mm), inner tepal length (mm), and outer tepal length (mm) were obtained using a digital Vernier Mitutoyo 500 and a stereoscopic Leica model S4.

Descriptive statistics (mean and standard deviation) were calculated per landrace. The Mahalanobis distance was estimated to evaluate the similarity between different landraces. Also, a canonical discriminant analysis was performed using the landraces as classificatory variable; as well as a MANOVA with Tukey mean comparison test for the canonical roots. All statistical analyses were processed using SAS version 9.3 (SAS Institute, 2012).

## RESULTS AND DISCUSSION

Basic statistics for all traits evaluated in eight landraces of grain amaranth are shown (Table 2) as a reference of each landrace and to the better understanding of the results of this research. Values reflect the high variability of amaranth reported before (Josh *et al.*, 2018; Thapa and Blair 2018; Sha *et al.*, 2018). Mixtec, Aztec and South American landraces showed the highest values in morphological traits (plant height, inflorescence length, panicles per inflorescence, panicle length); as well as in phenological traits (inflorescence emergence, anthesis and maturity). The smallest plant size and precociousness are from the Nepal and Mercado grain landraces; similar data for grain landraces were reported before (Espitia, 2018). In floral morphology, it is evident that *A. hypochondriacus* showed greater values in relation to *A. cruentus*; *A. caudatus* stands between them. Regarding seed size and morphology, larger seeds are those of Aztec, Mexican, Mercado, and South American grain landraces, while the smallest

sexual, densidad de glomérulos por cm<sup>2</sup> y peso de 1000 semillas. Además, con base en Hernández *et al.* (2011), se digitalizaron 50 semillas utilizando un escáner HP Scanjet G2710 con una regla milimétrica. Las imágenes digitalizadas se analizaron luego usando el software ImageTool ver. 3.00 (Wilcox *et al.*, 1995). En este software, los rasgos calculados fueron la longitud del eje mayor (MaAL), la longitud del eje menor (MiAL, que es la longitud perpendicular más alta del eje mayor), el área (A) y el perímetro (P) de la semilla. También el diámetro de Feret ( $FD=\sqrt{(4\cdot A)/\pi}$ ), el índice de redondez ( $RI=(4\cdot \pi\cdot A)/P^2$ ), el índice de alargamiento ( $EI=MaAL / MiAL$ ) y el índice de compacidad ( $CI=FD / MaAL$ ). Además, los rasgos de morfología de la flor de longitud de bráctea (mm), la longitud de utriculo (mm), la longitud del tépalo interno (mm) y la longitud del tépalo externo (mm) se obtuvieron utilizando un Vernier Mitutoyo 500 digital y un estereoscopio modelo S4 Leica.

Cálculos de estadística descriptiva (media y desviación estándar) se hicieron por raza local. La distancia de Mahalanobis se estimó para evaluar la similitud entre diferentes razas. Además, se realizó un análisis discriminante canónico con las razas como variable clasificatoria; así como un MANOVA y una prueba de comparación de medias para las raíces canónicas (Tukey=0.05). Todos los análisis estadísticos se procesaron con la versión 9.3 del programa estadístico SAS (SAS Institute, 2012).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los estadísticos básicos de todos los rasgos evaluados en ocho razas de grano de amaranto constan (Cuadro 2) como referencia sobre cada raza y para la mejor comprensión de los resultados de esta investigación. Los valores reflejan la variabilidad alta del amaranto reportada anteriormente (Josh *et al.*, 2018; Thapa y Blair 2018; Sha *et al.*, 2018). Las razas Mixteca, Azteca y Sudamericana mostraron los valores más altos en rasgos morfológicos (altura de la planta, longitud de la inflorescencia, panículas por inflorescencia, longitud de la panícula); como también en los rasgos fenológicos (aparición de inflorescencia, anthesis y madurez). El tamaño y la precocidad de las plantas más pequeñas provienen de las razas Nepal y Mercado; datos similares sobre estas razas se reportaron antes (Espitia, 2018). En morfología floral, es evidente que *A. hypochondriacus* mostró valores más altos que *A. cruentus*; y que *A. caudatus* se ubicó entre ambas. Respecto al tamaño y morfología de las semillas, las más grandes son las de las razas Azteca, Mexicana, Mercado y Sudamericana, mientras que las semillas más pequeñas son las de las razas Afri-

Table 2. Mean ± standard deviation of 23 traits evaluated in eight landraces of grain amaranth (*Amaranthus* spp.).  
Cuadro 2. Media ± desviación estándar de 23 rasgos evaluados en ocho razas de tres especies de amaranto (*Amaranthus* spp.).

Trait	<i>A. cruentus</i>				<i>A. hypochondriacus</i>				<i>A. caudatus</i> South American
	African	Guatemalan	Mexican	Aztec	Mercado	Mixtec	Nepal		
Inflorescence emergence	71.50 ±7.14	66.20 ±6.24	61.33±1.97	76.08±3.78	59.00±3.42	86.00±8.98	52.50±10.09	71.00±1.41	
Anthesis	90.50 ±5.97	80.80 ±5.68	72.33±3.61	95.25±5.46	68.88±1.55	103.86±8.36	65.10±9.70	89.50±0.71	
Maturity	172.00±2.45	174.75±1.50	163.33±2.07	178.00±2.30	142.13±9.80	192.14±2.48	130.30±8.10	173.00±1.41	
1000-seeds weight	0.74 ±0.08	0.78 ±0.15	0.93±0.07	0.98±0.13	0.94±0.02	0.82±0.10	0.90±0.11	0.95±0.04	
Plant height	194.80±27.33	202.73±28.25	185.15±24.38	231.98±9.37	187.96±17.59	268.54±24.55	178.20±10.08	220.00±0.00	
Inflorescence length	62.23±8.03	54.20±13.49	51.89±5.34	66.07±3.65	59.33±4.08	86.06±11.39	60.63±6.46	65.00±0.00	
Panicles per inflorescence	69.20±6.96	60.00±15.77	38.17±5.78	111.25±27.90	53.56±10.47	143.61±23.69	46.66±6.83	95.00±0.00	
Panicles length	12.10±5.55	11.25±2.67	15.57±3.31	17.33±2.89	16.29±1.71	24.16±4.14	16.16±2.87	17.60±0.00	
Branches per panicle	6.48±0.89	7.08±2.43	1.93±0.89	8.22±3.04	6.29±1.39	14.67±6.95	2.20±0.92	8.35±0.07	
Sexual ratio	14.83±5.26	28.65±12.62	54.37±12.81	29.33±8.21	43.00±16.95	17.80±10.26	58.03±37.27	57.35±18.88	
Glomeruli density	6.60±1.66	4.65±1.34	2.53±0.73	5.87±0.82	3.63±1.14	7.71±2.59	2.88±0.56	3.10±0.42	
Pxyis length	3.10±0.61	3.03±0.13	3.77±0.23	3.63±0.33	3.58±0.43	2.97±0.38	3.50±0.51	2.45±0.49	
Bract length	1.98±0.17	2.23±0.39	2.02±0.10	3.59±0.52	2.94±0.17	3.27±0.68	2.86±0.82	2.65±0.64	
External tepal length	2.13±0.13	2.35±0.40	2.47±0.34	3.43±0.41	2.81±0.33	2.44±0.41	3.08±0.48	2.10±0.14	
Inner tepal length	1.93±0.10	1.80±0.29	1.90±0.25	2.32±0.33	2.30±0.29	2.01±0.04	2.46±0.42	2.10±0.14	
Area of the seed	0.94±0.15	0.90±0.22	1.76±0.76	1.39±0.11	1.46±0.08	1.10±0.13	1.27±0.16	1.23±0.01	
Perimeter of the seed	3.80±0.36	3.89±0.62	4.76±1.01	4.19±0.19	4.40±0.18	3.81±0.17	4.16±0.45	4.00±0.02	
Major axis length of the seed	1.17±0.10	1.18±0.15	1.51±0.32	1.36±0.06	1.42±0.05	1.21±0.05	1.32±0.13	1.29±0.00	
Minor axis length of the seed	0.91±0.08	0.87±0.16	1.32±0.27	1.16±0.05	1.19±0.04	1.01±0.09	1.10±0.05	1.07±0.00	
Elongation index of the seed	1.30±0.11	1.40±0.13	1.15±0.01	1.18±0.02	1.20±0.04	1.21±0.11	1.21±0.09	1.21±0.01	
Roundness index of the seed	0.85±0.11	0.77±0.05	0.96±0.03	0.99±0.02	0.96±0.03	0.96±0.10	0.94±0.08	0.96±0.02	
Feret diameter of the seed	1.08±0.08	1.06±0.14	1.47±0.28	1.33±0.05	1.36±0.04	1.18±0.07	1.26±0.08	1.24±0.01	
Compactness index of the seed	0.93±0.04	0.90±0.01	0.98±0.01	0.97±0.01	0.96±0.01	0.97±0.04	0.96±0.04	0.97±0.01	

seeds are from African, Guatemalan, and Mixtec grain landraces, which are the least domesticated.

The landraces showed significant differences among all of them in the Mahalanobis distance test (Table 3). In *A. hypochondriacus* the most distant landraces were Mixtec to Nepal, and Mercado and Aztec to Nepal. The most closely related landraces were Mercado to Nepal; and Aztec to Mixtec, although they showed significant differences. In *A. cruentus* the most distant landraces were Mexican to Guatemalan; while the most closely related were Mexican to African, and Guatemalan to African. Moreover, there are grain landraces from different species that are more closely related than landraces within species, such as South American to Aztec, or Mexican to Mercado, indicating that both landraces and species are genetically related, or that they derived from a common ancestor (Legaria, 2010).

According to the canonical discriminant analysis, the covariance matrix had complete rank and accounted to 93.3% of the variance at three first canonical roots (Table 4). The first canonical root (CR1) was mainly associated with the traits, days from planting to inflorescence emergence, days from planting to first anthesis, days from planting to maturity of the grain (phenology data), plant height and number of panicles per inflorescence (plant morphology data); while CR2 was mainly associated to inner tepal length and the traits and indices related to shape of the seed (roundness, compactness, and elongation); finally CR3 was mainly associated to the weight of 1000 seeds, as well as area, major axis length, minor axis length and Feret diameter of the seed (Table 5).

cana, Guatemalteca y Mixteca, que son las menos domesticadas.

Las razas mostraron diferencias significativas entre todas ellas en la prueba de distancia de Mahalanobis (Cuadro 3). En *A. hypochondriacus*, las razas más distantes fueron la Mixteca de Nepal, y Mercado y Azteca en relación a Nepal. Las razas autóctonas más estrechamente relacionadas fueron Mercado a Nepal; y Azteca a Mixteca, aunque mostraron diferencias significativas entre ellas. En *A. cruentus*, las razas más distantes fueron Mexicana de Guatemalteca; mientras que las más estrechamente relacionadas fueron Mexicana a Africana, y Guatemalteca a Africana. Más aun, hay razas de diferentes especies que se relacionan de manera más estrecha que las razas dentro de especies, como la Sudamericana con la Azteca o la Mexicana con Mercado, lo cual indica que tanto las razas como las especies tienen relación genética o derivan de un ancestro común (Legaria, 2010).

De acuerdo con el análisis discriminante canónico, la matriz de covarianza fue de rango completo y representó el 93.3% de la varianza en las tres primeras raíces canónicas (Cuadro 4). La primera raíz canónica (CR1) se asoció principalmente con los rasgos, días desde plantación hasta emergencia de la inflorescencia, días a primera anthesis, días a madurez del grano (datos fenológicos), altura de la planta, y número de panículas por inflorescencia (datos morfológicos de la planta); mientras que CR2 se asoció principalmente con la longitud del tépalo interno y los rasgos e índices de forma de la semilla (redondez, compactibilidad y elongación); por último CR3 se asoció principalmente con el peso de 1000 semillas, así como al área, longitud del eje mayor, longitud del

**Table 3. Mahalanobis distance of eight grain amaranth (*Amaranthus* spp.) landraces using 23 traits. The distances are shown below the main diagonal and the *P*-values above the main diagonal.**

**Cuadro 3. Distancia de Mahalanobis de ocho razas de amaranto (*Amaranthus* spp.) para al considerar 23 rasgos. Las distancias se muestran debajo de la diagonal principal y los *P*-valores por encima de la diagonal principal.**

Landrace	African	Aztec	Guatemalan	Mercado	Mexican	Mixtec	Nepal	South American
African		<0.0001	0.0023	<0.0001	0.0003	<0.0001	<0.0001	0.0088
Aztec	139.72		<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0182
Guatemalan	76.90	277.32		<.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<.0001
Mercado	156.73	114.66	267.39		0.0001	<.0001	0.0324	0.001
Mexican	84.90	106.71	140.61	65.22		<0.0001	<0.0001	0.006
Mixtec	238.89	84.23	478.64	300.30	281.60		<0.0001	0.0002
Nepal	206.86	194.97	329.84	22.27	120.39	389.62		<0.0001
South American	93.69	64.33	205.58	108.95	88.55	138.90	166.59	

**Table 4. Proper values and explained variance of eight landraces of grain amaranth (*Amaranthus* spp.), as evaluated by 23 traits.**

**Cuadro 4. Valores propios y varianza de ocho razas de amaranto (*Amaranthus* spp.), evaluados con 23 rasgos.**

Canonical root	Propper value	Proportion of variance	Cumulative variance	Verosimilarity ratio	F Value	Significancy
1	48.379	0.547	<b>0.549</b>	0.00000338	5.68	<.0001
2	28.005	0.317	<b>0.863</b>	0.00016667	3.86	<.0001
3	6.138	0.069	<b>0.933</b>	0.00483428	2.39	<.0001
4	3.070	0.035	0.967	0.03450928	1.77	0.0031
5	1.527	0.017	0.985	0.14045941	1.33	0.1185
6	0.749	0.009	0.993	0.35494256	1.06	0.4208
7	0.611	0.007	1	0.62065700	1.04	0.4469

**Table 5. Total canonical structure of eight landraces of grain amaranth (*Amaranthus* spp.), as evaluated by 23 traits.**

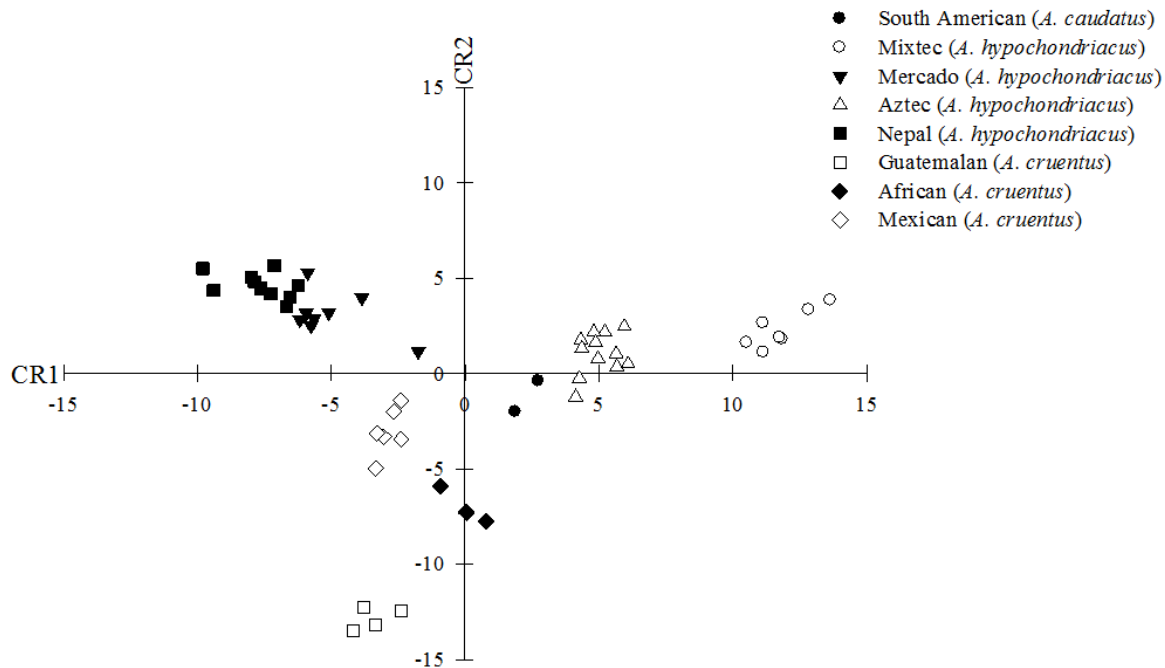
**Cuadro 5. Estructura canónica total de ocho razas de amaranto (*Amaranthus* spp.), evaluada con 23 rasgos.**

Trait	CR1	CR2	CR3
Inflorescence emergence	<b>0.8710</b>	-0.1382	-0.0128
Anthesis	<b>0.8990</b>	-0.1545	-0.0347
Maturity	<b>0.8899</b>	-0.4067	0.0957
1000 seeds weight	-0.0586	0.3614	<b>0.5373</b>
Plant height	<b>0.8611</b>	0.0500	-0.0348
Inflorescence length	0.6945	0.2960	-0.3591
Number of panicles per inflorescence	<b>0.8844</b>	0.1275	-0.0619
Panicles length	0.5378	0.4578	-0.1119
Number of branches per panicle	0.7316	0.0003	-0.1815
Sexual ratio	-0.4954	0.2302	0.1282
Glomeruli density per cm <sup>2</sup>	0.7352	-0.1003	-0.2164
Utricle length	-0.2524	0.2241	0.4961
Bract length	0.3864	0.4808	0.2027
External tepal length	-0.0270	0.4485	0.4434
Inner tepal length	-0.1857	<b>0.5233</b>	0.0751
Area of the seed	-0.1537	0.2543	<b>0.5455</b>
Perimeter of the seed	-0.2575	0.1102	0.4363
Major axis length of the seed	-0.2119	0.2224	<b>0.5326</b>
Minor axis length of the seed	-0.1331	0.3622	<b>0.6015</b>
Elongation index of the seed	-0.0994	<b>-0.5112</b>	-0.3342
Roundness index of the seed	0.2331	<b>0.5719</b>	0.3435
Feret diameter of the seed	-0.1511	0.3410	<b>0.5975</b>
Compactness index of the seed	0.1840	<b>0.5169</b>	0.2387
Proportion of variance (%)	54.68	31.65	6.94
Cumulative variance (%)	54.68	86.33	93.27

The graphic representation of the landraces in a Cartesian plane on the two first canonical roots showed a clear separation among them (Figure 1). Also, the three species were kept clearly separated and were not mixed.

eje menor y diámetro de Feret de la semilla (Cuadro 5).

La representación gráfica de las razas en un plano cartesiano con las dos primeras raíces canónicas mostró una separación clara entre ellas (Figura 1).



**Figure 1.** Graphical representation of the first two canonical roots of eight grain amaranth (*Amaranthus* spp.) landraces using 23 traits.

**Figura 1.** Representación gráfica de las dos primeras raíces canónicas de ocho razas de amaranto (*Amaranthus* spp.), 23 rasgos considerados.

The most important discriminant traits for CR1 were those related to phenology, which were the main criteria of Espitia (2018) for landrace classification, followed by the traits related to shape of seed (CR2) and the size of seed (CR3). Nevertheless, there is no other classification at an intraspecific level (Josh *et al.*, 2018).

The landraces were well defined according to a canonical discriminant analysis. The *A. hypochondriacus* landraces were located in a positive region of the CR2, which mean that all of them showed similar seed shapes, tending to a circular shape, which is a typical feature of domestication for this species (Espitia *et al.*, 2010). However, they were dispersed in the CR1, and therefore they showed a higher diversity mainly in phenological traits. This is due to the fact that each landrace was grown in different eco-geographic region. Along with this, each one has different traditional uses, such as the Mixtec landrace that is mainly utilized as leafy vegetable, thus its crop cycle finishes later and it has taller plants. Whereas the Nepal landrace is grown in

Además, las tres especies se mantuvieron claramente separadas y no se mezclaron.

Los rasgos discriminantes más importantes para CR1 fueron los relacionados con la fenología, los cuales fueron los principales criterios de Espitia (2018) para la clasificación de razas geográficas, seguidos de los rasgos relacionados con la forma de la semilla (CR2) y el tamaño de la semilla (CR3). Sin embargo, no existe otra clasificación a nivel intraespecífico (Josh *et al.*, 2018).

Las razas se definieron bien de acuerdo con el análisis discriminante canónico. Las razas de *A. hypochondriacus* se ubicaron en una región positiva de la CR2, esto significa que todas presentaron semillas de formas similares, tendientes a la forma circular, característica típica de la domesticación de esta especie (Espitia *et al.*, 2010). Sin embargo, se dispersaron en el CR1, y por tanto exhibieron una diversidad mayor en especial en los rasgos fenológicos. Esto se debe al hecho de que cada raza se desarrolló en una región ecogeográfica diferente. Junto a esto, cada una tiene diferentes usos tradicionales, como la raza local

arid regions, its cycle is shorter and produces smaller plants; therefore, this landrace evolves in earlier varieties (Espitia, 2018).

The three *A. cruentus* landraces were mainly differentiated by seed shape. The Guatemalan landrace displayed an elongated seed, while the Mexican landrace showed a rounder seed. The African landrace is later than other landraces of this species and its seed shape is midway between the other two landraces.

A Tukey test of the canonical roots of the MANOVA showed in the CR1 that only Guatemalan and Mexican *A. cruentus* landraces do not have significant differences, while the other landraces had significant differences among them. The South American landrace displayed significant differences with all others landraces (Table 6). In CR2, the *A. hypochondriacus* landraces that do not show significant differences between them were Nepal and Mercado, Mercado and Mixtec, and Mixtec and Aztec. Meanwhile, the three *A. cruentus* landraces displayed significant differences among them, although the Mexican landrace had no differences with the South American landrace (Table 6).

The results of this study agree with Legaria (2010) who showed that *A. hypochondriacus* and *A. caudatus* are more related between them than with *A. cruentus*, which was reported by Gudu and Gupta (1987). But landrace classification is different to that of Legaria (2010), who reported the close relation

mixteca que se utiliza principalmente como vegetal de hoja, por lo que su ciclo de cultivo termina más tarde y sus plantas son más altas. Mientras que la raza Nepal se cultiva en regiones áridas, su ciclo es más corto y produce plantas más pequeñas; por lo tanto, esta raza evoluciona hacia variedades de cosecha temprana (Espitia, 2018).

Las tres razas de *A. cruentus* se diferenciaron principalmente por la forma de las semillas. La raza Guatemalteca presentó una semilla alargada, mientras que la raza Mexicana mostró una semilla más redondeada. La raza Africana es más tardía que las otras razas de esta especie y la forma de su semilla es intermedia respecto a las dos razas anteriores.

Una prueba de Tukey de las raíces canónicas de MANOVA mostró en la CR1 que solo entre las razas de *A. cruentus*, Guatemalteca y Mexicana no hubo diferencia, mientras que las otras razas mostraron diferencias significativas entre ellas. La raza Sudamericana exhibió diferencias significativas con todas las demás razas (Cuadro 6). En la CR2, las razas de *A. hypochondriacus* que no mostraron diferencias significativas entre ellas fueron Nepal y Mercado, Mercado y Mixteca, y Mixteca y Azteca. Mientras que, las tres razas de *A. cruentus* mostraron diferencias significativas entre ellas, aunque la raza Mexicana no tuvo diferencias con la Sudamericana (Cuadro 6).

Los resultados de este estudio coinciden con los de Legaria (2010), quien demostró que *A. hypochondriacus* y *A. caudatus* se relacionan más entre ellas que

**Table 6. Tukey mean comparison test for canonical roots of the canonical discriminant analysis of eight landraces of grain amaranth (*Amaranthus* spp.) using 23 traits.**

**Cuadro 6. Prueba de comparación de medias de Tukey para las raíces canónicas del análisis discriminante canónico de ocho razas geográficas de amaranto (*Amaranthus* spp.), a partir de 23 rasgos.**

Landrace	CR1 <sup>†</sup>	CR 2 <sup>†</sup>	CR 3 <sup>†</sup>
African ( <i>A. cruentus</i> )	-0.0121 D	-7.0537 e	-3.7659 E
Aztec ( <i>A. hypochondriacus</i> )	5.0163 B	1.0644 c	2.6768 A
Guatemalan ( <i>A. cruentus</i> )	-3.4339 ef	-12.8446 f	-0.2394 bc
Mercado ( <i>A. hypochondriacus</i> )	-5.0158 F	3.1277 ab	0.7843 ab
Mexican ( <i>A. cruentus</i> )	-2.8597 E	-3.0375 d	2.7338 A
Mixtec ( <i>A. hypochondriacus</i> )	11.8353 A	2.3178 bc	-2.6296 de
Nepal ( <i>A. hypochondriacus</i> )	-7.6583 G	4.6213 a	-1.7924 cde
South American ( <i>A. caudatus</i> )	2.3049 C	-1.2072 d	-1.2229 bcd

<sup>†</sup>Means in column with a different letter are significantly different (p≤0.05). ♦

<sup>‡</sup>Las letras diferentes en valores medios por columna indican diferencia significativa (p≤0.05).

between the Aztec and Mercado landraces, and that Nepal landrace was the least related. According to our results, Mercado and Nepal were more similar, mainly in the seed traits and they were more closely related than Aztec, which displayed a longer growing cycle and taller plants. Nevertheless, our results agree with the differences in breeds found by Espitia (1992), and Espitia (2018).

Kaufmann (1992) described these landraces as morphological groups; however, the description was done mainly for the uses and the region of origin. Our research showed strong evidence that these groups are well defined as landraces due to the significant differences in the mean comparison test of MANOVA canonical roots (Table 5). These results helped to clearly separate the landraces; that also have specific concordance (Table 6 and Figure 1); agreeing with Espitia (2018) and Legaria (2010).

## CONCLUSIONS

Canonical discriminant analyses depict the separation of landraces and species using phenological, morphological, morphometric and micro-morphological traits of the seed and flower morphology. In *Amaranthus hypochondriacus*, the most distant landraces were Mixtec to Nepal, and Mercado and Aztec to Nepal. The most closely related landraces were Mercado to Nepal and Aztec to Mixtec.

In *A. cruentus* the most distant landraces were Mexican to Guatemalan, while the most closely related were Mexican to African, and Guatemalan to African. This landrace classification is useful in the systematic, conservation and management of germplasm from the grain amaranth species.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was partially supported by CONACYT through the project: Problemas Nacionales 248415 and for National Plant Genetic Resources System of SNICS-SAGARPA.

## LITERATURE CITED

- Escobedo L. D., C. A. Núñez C., and E. Espitia R. 2014. Adaptation of cultivated amaranth (*Amaranthus* spp.) and their wild relatives in Mexico. *J. Crop Improv.* 28: 203-213.
- Espitia R. E., C. Mapes S., D. Escobedo L., M. De la O O., P. Rivas V., L. Cortés E., y J. M. Hernández C. 2010. Conservación y uso de los Recursos genéticos de amaranto

con *A. cruentus*, lo cual consignaron Gudu y Gupta (1987). Pero la clasificación de razas difiere a lo reportado por Legaria (2010), quien informó sobre la relación estrecha que hay entre las razas Azteca y Mercado, y que Nepal era la menos relacionada. De acuerdo con nuestros resultados, Mercado y Nepal fueron más similares entre ellas, principalmente en los rasgos de las semillas, y se relacionaron más estrechamente que con Azteca, la cual mostró un ciclo de crecimiento más largo y plantas más altas. No obstante, nuestros resultados concuerdan con las diferencias de razas encontradas por Espitia (1992) y Espitia (2018).

Kaufmann (1992) describió estas razas como grupos morfológicos; sin embargo, la descripción se hizo principalmente por los usos y la región de origen. Nuestra investigación mostró evidencia sólida de que estos grupos son razas bien definidas, debido a las diferencias significativas en la prueba MANOVA de comparación de medias de las raíces canónicas (Cuadro 5). Estos resultados ayudaron a distinguir claramente las razas; las cuales tienen además, concordancia específica (Cuadro 6 y Figura 1); lo cual coincide con Espitia (2018) y Legaria (2010).

## CONCLUSIONES

Los análisis discriminantes canónicos describieron gráficamente la separación de razas geográficas y especies a partir de los rasgos fenológicos, morfológicos, morfométricos y micro-morfológicos de semillas y flores. En *Amaranthus hypochondriacus*, las razas más distantes fueron la Mixteca de Nepal; y las razas Mercado y Azteca de Nepal. Las razas más estrechamente relacionadas fueron Mercado con Nepal y Azteca con Mixteca.

En *A. cruentus*, las razas más distantes fueron Mexicana de Guatemalteca, mientras que las más cercanas fueron Mexicana con Africana, y Guatemalteca con Africana. Esta clasificación de razas es útil para la sistemática, el manejo y la conservación del germoplasma de las especies de amaranto.

—Fin de la versión en Español—

---\*---

- en México. SAGARPA, SNICS, INIFAP, SINAREFI. 204 p.
- Espitia R. E., D. Escobedo L., C. Mapes S., M. De la O O., M. Aguilar D., J. M. Hernández C., A. Ayala G., P. Rivas V., G. Martínez T., M. L. Ramírez V., y S. H. Moran B. 2012. Conservación de los recursos genéticos de amaranto (*Amaranthus* spp.) en México. *In: Espitia-Rangel, E. (ed). Amaranto: Ciencia y Tecnología. INIFAP-SINAREFI, Celaya, Guanajuato, México. pp: 147-163.*
- Espitia R. E. 1992. Amaranth germplasm development and agronomic studies in México. *Food Rev. Int. 8: 71-86*
- Espitia R. E. 2018. Breeding of grain amaranth. *In: Paredes, L. O. (ed). Amaranth: Biology, Chemistry, and Technology. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL. USA. pp: 23-38.*
- Gudu S., and V. K. Gupta. 1987. Electrophoresis as an aid in the identification of various species and cultivars of grain amaranth. *Acta Horticulturae. 218:231-238.*
- Hernández M. M. Á., C. A. Núñez C., S. H. Guzmán M., E. Espinosa T., y M. G. Herrera H. 2011. Variabilidad morfológica mediante caracteres de semilla de poblaciones de *Amelanchier denticulata* (Kunth) Koch, originarias de Guanajuato, México. *Rev. Chapingo Serie Hortic. 17:161-172.*
- Josh D. C., S. J. Sood, R. Hosajatti, L. Kant, A. Pattanayak, A. Kumar, N. Yadav, and M. G. Stetter. 2018. From zero to hero: the past, present and future of grain amaranth. *Theor. Appl. Genetics 131: 1807-1823.*
- Kaufmann C. S. 1992. The status of grain amaranth for the 1990s. *Food Rev. Int. 8:165-186.*
- Legaria S. J. P. 2010. Diversidad genética en algunas especies de amaranto (*Amaranthus* spp.). *Rev. Fitotec. Mex. 33:89-95.*
- Massawe F, S. Mayes, and A. Cheng. 2016. Crop diversity: An unexploited treasure trove for food security. *Trends in Plant Sci. 5: 655-368.*
- Moran B. S. I., L. Cortés E., E. Espitia R., y D. M. Sangerman J. 2012. *Tzoalli*, de cuerpo de dioses a alegría de mortales. *In: Espitia-Rangel, E. (ed). Amaranto: Ciencia y Tecnología. INIFAP-SINAREFI, Celaya, Guanajuato, México. pp: 15-27.*
- SAS Institute. 2012. SAS/STAT® 12.1 User's Guide. Cary, NC, USA. 732 p.
- Sha L. R., B. Afroza, S. H. Khan, and M. Habib. 2018. Morphological characterization of *Amaranthus* spp. Under temperate environment using NBPGR descriptor. *J. Pharmacog. Phytochem. 7: 2716-2718.*
- Thapa R., and M Blair. 2018. Morphological assessment of cultivated and wild amaranth species diversity. *Agronomy 8: 1-13.*
- Wilcox D., B. Dove, D. McDavid, and D. Greer. 1995. Image tool. Version 3: Users' Guide. University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, USA. 62 p.

