



40
20j
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CULTIVO in vitro DE ALGUNAS ESPECIES VEGETALES
PARA LA OBTENCION DE COLORANTES NATURALES
(BETALAINAS)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A :

MARTHA PATRICIA CHAVEZ MOCTEZUMA



México, D. F.

FALLA DE ORIGEN

1991



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

Abreviaturas

Lista de Tablas y Figuras

Resumen

	PAG
I.-INTRODUCCION.....	1
II.-OBJETIVOS.....	2
III.-HIPOTESIS.....	3
IV.-ANTECEDENTES.....	4
4.1.-Metabolitos Secundarios.....	4
4.2.-Cultivo de Tejidos Vegetales para la Producción de Pigmentos.....	5
4.3.-Manipulación de Nutrientes en el Medio de Cultivo....	7
4.3.1.-Reguladores del Crecimiento.....	7
4.3.2.-Fuente de Carbono.....	8
4.3.3.-Macronutrientes.....	8
4.3.4.-Efecto Osmótico en Cultivo.....	9
4.4.-Aditivos Colorantes para Alimentos.....	9
4.4.1.-Usos e Importancia.....	10
4.4.2.-Clasificación.....	10
4.4.3.-Legislación.....	11
4.5.-Desarrollo en la Producción de Colorantes Alimentarios.....	12
4.6.-Betalainas.....	13
4.6.1.-Estructura.....	13
4.6.2.-Factores que Regulan la Biosíntesis de Betalainas.....	18
4.6.2.1.-Luz.....	18
4.6.2.2.-Inducción Química.....	19
4.6.2.3.-Control Genético.....	19
4.7.-Estabilidad de las Betacianinas.....	20
4.8.-Betalainas como Colorantes en Alimentos.....	20

V.-MATERIALES Y METODOS.....	22
5.1.-Material Biológico.....	22
5.2.-Medio de Cultivo.....	22
5.3.-Desinfestación y Siembra de Tejidos.....	22
5.4.-Incubación.....	23
5.5.-Inducción de Callo.....	23
5.6.-Optimización de la Concentración de Auxina/ Citocinina.....	24
5.7.-Análisis Químico del Pigmento.....	24
5.8.-Efecto de la Longitud de onda sobre la Síntesis de Pigmento.....	30
5.9.-Manipulaciones del Medio de Cultivo.....	33
5.9.1.-Variaciones de Fosfato (KH_2PO_4) y Calcio ($CaCl_2$).....	35
5.9.2.-Variaciones de la Relación Carbono/Nitrógeno...	35
5.9.3.-Variaciones en la concentración de Agentes Osmóticos.....	39
VI.-RESULTADOS Y DISCUSION.....	40
VII.-CONCLUSIONES.....	80
BIBLIOGRAFIA.....	82
Apéndices.	

ABREVIATURAS

AIA	Acido Indolacético.
ANA	Acido Naftalenacético.
2,4-D	Acido 2,4-Diclorofenoxiacético.
AIB	Acido Indolbutírico.
PIC	Picloram.
KIN	Cinetina.
BAP	Bencilaminopurina.
MS	Murashige y Skoog.
nm	Nanómetros.
λ	Longitud de onda.

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

TABLA		PAG
IV.1	Metabolitos secundarios y su aplicación industrial (Jaramillo, 1990).	5
V.2	Combinaciones de auxinas/citocinina probadas en medio MS para inducir la formación de callo en <u>Iresine lindenii</u> .	26
V.3	Combinaciones de auxinas/citocininas probadas en medio MS para inducir la formación de callo en <u>Amaranthus</u> sp. y <u>Bougainvillea glabra</u> .	27
V.4	Combinaciones probadas para optimizar concentraciones de 2,4-D/KIN en medio MS para <u>Iresine lindenii</u> .	28
V.5	Combinaciones probadas para optimizar concentraciones de 2,4-D/BAP en medio MS para <u>Amaranthus</u> sp. y <u>Bougainvillea glabra</u> .	29
V.6	Variaciones en la concentración de la fuente de fósforo (KH ₂ PO ₄) y Calcio (CaCl ₂) probadas en medio MS con callos de <u>Amaranthus</u> sp.	37
V.7	Variaciones en la concentración de la fuente de carbono (sacarosa) y nitrógeno (NH ₄ NO ₃) probadas en medio MS con callos de <u>Amaranthus</u> sp.	38
V.8	Variaciones en la concentración de agentes osmóticos como cloruro de sodio (NaCl) y manitol probados en medio MS con callos de <u>Amaranthus</u> sp.	39
VI.9	Efecto de las combinaciones de auxinas/citocinina probadas en medio MS en inóculos de hoja de <u>Iresine lindenii</u> .	42
VI.10	Efecto de las combinaciones de auxinas / citocininas probadas en medio MS en inóculos de hoja de <u>Amaranthus</u> sp.	44
VI.11	Efecto de las combinaciones de auxinas/citocininas probadas en medio MS en inóculos de brácteas de <u>Bougainvillea glabra</u> .	45

VI.12	Optimización de la concentración de auxina/citocinina en medio MS para inóculos de hoja de <u>Iresine lindenii</u> .	48
VI.13	Optimización de la concentración de auxina/citocinina en medio MS para inóculos de hoja de <u>Amaranthus</u> sp.	49
VI.14	Optimización de la concentración de auxina/citocinina en medio MS para inóculos de brácteas de <u>Bougainvillea glabra</u> .	50
VI.15	Efecto de la longitud de onda en la inducción de callo y producción de biomasa en <u>Amaranthus</u> sp.	57

LISTA DE FIGURAS

FIG		PAG
IV.1	Fórmula general de las Betalainas y Betacianinas (Piattelli, 1981).	15
IV.2	Fórmula general de las Betaxantinas representada por Indicaxantina (Piattelli, 1964).	15
IV.3	Estructura de (a) Betanidina y (b) Isobetamidina (Piattelli, 1976).	16
IV.4	Estructura general del Acido betalámico y de Ciclodopa (Mabry, 1980 citado por Velázquez, 1990).	16
IV.5	Biosíntesis de Betanidina (Chang, et.al., 1974)	17
V.6	Metodología general.	25
V.7	Metodología de extracción para betalainas de material <u>in-vivo</u> .	31
V.8	Metodología de extracción para betalainas de material <u>in-vitro</u> .	32
V.9	Efecto de la longitud de onda sobre la síntesis de pigmento.	34
V.10	Manipulaciones del medio de cultivo.	36
VI.11	Espectro de absorción de betacianinas obtenido de material <u>in-vivo</u> de <u>Iresine lindenii</u> .	52
VI.12	Espectro de absorción de betacianinas obtenido de material <u>in-vivo</u> de <u>Bougainvillea glabra</u> para el fenotipo púrpura.	53

VI.13	Espectro de absorción de betacianinas obtenido de material <u>in-vivo</u> de <u>Bougainvillea glabra</u> para el fenotipo rojo.	54
VI.14	Espectro de absorción de betaxantinas obtenido de material <u>in-vivo</u> de <u>Bougainvillea glabra</u> para el fenotipo amarillo.	55
VI.15	Efecto de las variaciones en la concentración de fosfato en el medio sobre la síntesis de pigmento y producción de biomasa, incubando callos de <u>Amaranthus</u> sp. en luz blanca.	60
VI.16	Efecto de las variaciones en la concentración de fosfato en el medio sobre la síntesis de pigmento y producción de biomasa, incubando callos de <u>Amaranthus</u> sp. en luz roja.	61
VI.17	Efecto de las variaciones en la concentración de fosfato en el medio sobre la síntesis de pigmento y producción de biomasa, incubando callos de <u>Amaranthus</u> sp. en oscuridad.	62
VI.18	Efecto de las variaciones en la concentración de calcio en el medio sobre la síntesis de pigmento y producción de biomasa, incubando callos de <u>Amaranthus</u> sp. en luz blanca.	64
VI.19	Efecto de las variaciones en la concentración de calcio en el medio sobre la síntesis de pigmento y producción de biomasa, incubando callos de <u>Amaranthus</u> sp. en luz roja.	65
VI.20	Efecto de las variaciones en la concentración de calcio en el medio sobre la síntesis de pigmento y producción de biomasa, incubando callos de <u>Amaranthus</u> sp. en oscuridad.	66
VI.21	Efecto de las variaciones en la relación carbono/nitrógeno en el medio sobre la síntesis de pigmento y producción de biomasa, incubando callos de <u>Amaranthus</u> sp. en luz blanca.	68
VI.22	Efecto de las variaciones en la relación carbono/nitrógeno en el medio sobre la síntesis de pigmento y	69

	producción de biomasa, incubando callos de <u>Amaranthus</u> sp. en luz roja.	
VI.23	Efecto de las variaciones en la relación carbono/nitrógeno en el medio sobre la síntesis de pigmento y producción de biomasa, incubando callos de <u>Amaranthus</u> sp. en oscuridad.	71
VI.24	Efecto de las variaciones en la concentración de NaCl en el medio sobre la síntesis de pigmento y producción de biomasa, incubando callos de <u>Amaranthus</u> sp. en luz blanca.	73
VI.25	Efecto de las variaciones en la concentración de NaCl en el medio sobre la síntesis de pigmento y producción de biomasa, incubando callos de <u>Amaranthus</u> sp. en luz roja.	74
VI.26	Efecto de las variaciones en la concentración de NaCl en el medio sobre la síntesis de pigmento y producción de biomasa, incubando callos de <u>Amaranthus</u> sp. en oscuridad.	75
VI.27	Efecto de las variaciones en la concentración de manitol en el medio sobre la síntesis de pigmento y producción de biomasa, incubando callos de <u>Amaranthus</u> sp. en luz blanca.	77
VI.28	Efecto de las variaciones en la concentración de manitol en el medio sobre la síntesis de pigmento y producción de biomasa, incubando callos de <u>Amaranthus</u> sp. en luz roja.	78
VI.29	Efecto de las variaciones en la concentración de manitol en el medio sobre la síntesis de pigmento y producción de biomasa, incubando callos de <u>Amaranthus</u> sp. en oscuridad.	79

RESUMEN

Las betalainas, son un grupo de pigmentos vegetales, los cuales se han obtenido principalmente de betabel (Beta-vulgaris), para uso en alimentos. Sin embargo, otras familias del orden Centrospermae también los producen.

En este estudio se utilizó al cultivo de tejidos vegetales como una alternativa para la obtención de éstos pigmentos, trabajando con Iresine lindenii y Amaranthus sp. de la familia Amaranthaceae y con Bougainvillea glabra de la familia Nyctaginaceae.

Para determinar las condiciones de cultivo en cada especie se probó trabajar con diferentes tejidos (hojas, peciolo y brácteas) como fuentes de inóculos, además se probaron 5 tipos de auxinas (AIA, ANA, 2,4-D, AIB y Pic) a una concentración de 2.0 mg/l y 2 tipos de citocininas (KIN y BAP) en concentración de 0.2 mg/l, en medio MS (Murashige y Skoog, 1962).

Para cada una, se establecieron cultivos asépticos y se logró obtener la formación de tejido calloso adicionando 0.5 y 0.1 mg/l de 2,4-D y KIN en el caso de Iresine lindenii y con 2.0 y 0.2 mg/l de 2,4-D y BAP para Amaranthus sp. y Bougainvillea glabra.

También se estudió el efecto de diferentes longitudes de onda observándose inhibición, aumento o disminución en la producción de biomasa y síntesis de pigmento, dependiendo de la longitud de onda a la cual se incubaron los tejidos.

La manipulación de los nutrientes del medio de cultivo se hizo variando la fuente de fósforo (K_2HPO_4), la fuente de calcio ($CaCl_2$), y la relación carbono/nitrogeno (sacarosa/ NH_4NO_3).

Además se evaluó el efecto de agentes osmóticos como NaCl y Manitol.

Los resultados indicaron que cada uno de estos compuestos afecta de manera diferente y específica la producción de biomasa y la síntesis de pigmento en cultivo.

I INTRODUCCION

La riqueza biológica de México, por la diversidad y abundancia de recursos de flora y fauna es realmente muy grande, pero al mismo tiempo es muy frágil, debido a que no es una reserva territorial capaz de producir sin límites. De ahí la importancia de llevar a cabo la explotación racional de nuestros recursos para aprovecharlos de la mejor manera sin agotarlos.

Dentro de la riqueza vegetal, las angiospermas, que dominan la mayor parte de la vegetación terrestre, nos proporcionan una gran variedad de recursos, principalmente alimentarios. Sin embargo, también es posible obtener metabolitos secundarios de interés comercial. La obtención de estos compuestos se realiza mediante la extracción de la planta completa. El aislamiento de tales compuestos tiene asociados, sin embargo, numerosos problemas. Los suministros de la materia prima pueden ser erráticos debido a calamidades naturales, tales como variaciones del clima o a la pérdida de los cultivos debido a plagas. También es importante mantener la materia prima en estado de máxima actividad fisiológica, para asegurar buenos rendimientos de los metabolitos secundarios. Otro problema es la domesticación de plantas silvestres o la pérdida de capacidad biosintética de los metabolitos por la sobre explotación de recursos.

Debido a esto, se ha pensado en el cultivo de tejidos vegetales como una opción para la obtención de estos compuestos. La mayor parte de la investigación y desarrollo sobre la formación de productos secundarios mediante la técnica de cultivo se ha concentrado en compuestos tales como los farmacéuticos, los cuales son clasificados como compuestos de alto costo, poco volumen y gran demanda. También se encuentran en esta categoría los aceites esenciales, saborizantes, colorantes y gomas, los cuales, son ampliamente utilizados en la industria alimentaria. En este caso, uno de los mayores problemas es asegurar la producción

constante de una fuente vegetal de colorantes. Además, las nuevas regulaciones sobre el uso de aditivos colorantes sintéticos para alimentos han estimulado el interés por reemplazar las fuentes sintéticas con fuentes vegetales naturales.

Los estudios realizados para la obtención de pigmentos vegetales en cultivo, están encaminados a la selección continua de líneas celulares productoras y la optimización de las condiciones de cultivo, tanto de los nutrientes del medio como de los requerimientos de luz.

Considerando la problemática técnica y económica sobre la producción de metabolitos secundarios, el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la E.N.C.B. ha tomado como una de sus líneas de investigación, la obtención de colorantes de origen vegetal, aprovechando la riqueza biológica del país, para establecer las bases preliminares de sistemas que sean capaces de sintetizar y acumular metabolitos secundarios de interés.

II.-OBJETIVOS.

2.1.-OBJETIVO GENERAL.

Seleccionar líneas celulares productoras de pigmentos, de especies de la familia Amaranthaceae y Nyctaginaceae, con base a la respuesta en cultivo de diferentes germoplasmas.

2.2.-OBJETIVOS PARTICULARES.

2.2.1.-Conocer la combinación y concentración de reguladores del crecimiento que den origen a la formación de tejido calloso.

2.2.2.-Establecer una metodología de extracción y cuantificación de betalainas, tanto para el material in-vivo como para el material en cultivo.

2.2.3.-Determinar el efecto de las variaciones en la longitud de onda, nutrientes del medio y agentes osmóticos, sobre la síntesis de betalainas y la producción de biomasa en el callo.

III.-HIPOTESIS.

3.1.-Se sabe que moléculas diferentes con estructuras químicas semejantes muestran tener efectos similares. Si la combinación de auxina y citocinina induce formación de tejido calloso, entonces probando diferentes moléculas y concentraciones de reguladores se obtendrá respuesta a la inducción de callo.

3.2.-Si la síntesis de pigmento en cultivo es inducida o incrementada por factores físicos, como el luminoso o químicos como la concentración de nutrientes en el medio, entonces haciendo variaciones de estos se podría inducir la síntesis del metabolito.

IV ANTECEDENTES

4.1.-METABOLITOS SECUNDARIOS.

El Reino Vegetal es fuente de numerosos recursos para el hombre. Las plantas acumulan sustancias orgánicas en cantidades suficientes para ser económicamente útiles en nutrición animal, como fuentes de aceites industriales, resinas, taninos, saponinas, hules, gomas, ceras, colorantes, saborizantes, productos farmacéuticos y muchos otros compuestos de uso definido (Paredes, 1986).

Por conveniencia, los productos provenientes de las plantas se clasifican como metabolitos primarios y secundarios (Balandrin, et.al. citado por Paredes, 1986).

Los primarios, tales como, proteínas, carbohidratos y lípidos indispensables en el metabolismo básico celular, están ampliamente distribuidos en la naturaleza y se encuentran en todos los organismos.

Dentro de los metabolitos secundarios se encuentran varios alcaloides, flavonoides, furanocumarinas y otros compuestos aromáticos, los cuales son sintetizados a partir de fenilalanina, tirosina y triptofano (Whitaker y Evans, 1987). Su distribución en el Reino Vegetal es más limitada, no tienen función aparente en el metabolismo primario, sin embargo, con frecuencia se les atribuyen funciones de tipo ecológico: los colores brillantes de las flores atraen diversos polinizadores, intervienen en la adaptación de la planta a inclemencias del medio externo y actúan como defensas químicas contra microorganismos, insectos, predadores y aún para imponerse a otras plantas (Mann, 1978; Rice, 1984 citados por Paredes, 1986).

Dentro de los metabolitos secundarios existen tres categorías, en base a su aplicación comercial: aceites esenciales que se emplean como saborizantes y en perfumería; los glucósidos, algunos de los cuales se utilizan como tinturas, colorantes para

alimentos y en la industria farmacéutica; y por último los alcaloides que han tenido aplicación en la producción de medicamentos (Jaramillo, 1990).

Los sectores industriales que utilizan metabolitos secundarios en una forma u otra son bastante amplios e incluyen industrias como la farmacéutica, la de alimentos y bebidas, la de cosméticos, perfumería y la de agroquímicos (Tabla IV.1).

Tabla IV.1.-Metabolitos Secundarios y su Aplicación Industrial.

Industria	Producto	Especie Vegetal	Uso Industrial
Farmacéutica	Codeína	<i>Papaver somniferum</i>	Analgésico
	Diosgenina	<i>Dioscorea deltoidea</i>	Anticonceptivo
	Quinina	<i>Chinchona ledgeriana</i>	Antimalárico
	Digoxina	<i>Digitalis lanata</i>	Cardiotónico
	Escopolamina	<i>Datura stramonium</i>	Antihipertens.
	Vincristina	<i>Catharanthus roseus</i>	Antileucémico
Agroquímicos	Piretrina	<i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i>	Insecticida
Alimentos y Bebidas	Quinina	<i>Chinchona ledgeriana</i>	Amargante
	Taumatina	<i>Thaumatococcus danielli</i>	Edulcorante
Cosméticos	Jazmín	<i>Jasminum sp.</i>	Perfume

(Shuler, 1981 citado por Jaramillo, 1990).

4.2.-CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES PARA LA PRODUCCION DE PIGMENTOS

Esta técnica tiene particularmente importantes aplicaciones para el sector industrial donde se requieren sustancias específicas y con un alto grado de pureza (Mantell et.al., 1985).

A través del Cultivo de Tejidos, las células aisladas de plantas que se han desarrollado en condiciones de campo y que después son cultivadas *in-vitro*, tienen el potencial para producir y acumular compuestos químicos similares o idénticos a aquellos producidos por la planta de la cual son originados (Zenk y Deus, 1982).

El proceso involucra la selección del inóculo apropiado (generalmente un segmento de hoja, tallo o peciolo) como el portador de información genética. Posteriormente se sigue con la siembra en un medio nutritivo en condiciones asépticas, y después de un tiempo el inóculo prolifera como una masa de células llamado callo. Cuando un callo friable se agita en un medio líquido, este se separa en pequeñas masas celulares, llamado cultivo en suspensión. Las células del cultivo en suspensión se colocan en un medio que promueve la formación de los compuestos químicos deseados. Este medio, antes se debe optimizar previamente para que sea útil en la producción de estos compuestos (Ilker, 1987).

La información existente acerca de la posibilidad de cultivar células vegetales en medios líquidos, dió la pauta para pensar en la posibilidad de que estas podían ser inducidas a sintetizar una amplia variedad de compuestos químicos, del mismo modo como los cultivos microbianos se han utilizado comercialmente en la industria de la fermentación (Whitaker y Evans, 1987).

Ejemplo de ello es el éxito comercial obtenido por la empresa japonesa Mitsui Petrochemical Industries, Ltd. que comercializó el proceso basado en cultivo de células de Lithospermum erythrorhizon para producir chiconina, una naftaquinona, utilizada como colorante y como agente antibacteriano y anti-inflamatorio (Knorr, 1985; Shuler et.al., 1984 citados por Paredes, 1986).

Se ha reconocido en la práctica, que el cultivo de células como productor de compuestos químicos valiosos, tiene implicados numerosos problemas bioquímicos, genéticos y de ingeniería. Sin embargo, la riqueza del potencial bioquímico propio de las células vegetales, representa un estímulo para continuar con las investigaciones en este campo (Whitaker y Evans, 1987).

4.3.-MANIPULACION DE NUTRIENTES EN EL MEDIO DE CULTIVO.

Los metabolitos secundarios se producen en la planta como consecuencia del grado de diferenciación celular, tisular u orgánica ya que tienden a sintetizarse en células especializadas y en etapas específicas del desarrollo (Mantell et.al., 1985).

En general, se ha observado que las células *in-vitro* de rápido crecimiento y que no presentan algún tipo de organización, acumulan los productos secundarios en bajas concentraciones por lo que se ha determinado que existe una relación inversa entre el crecimiento, la diferenciación y la acumulación de estos compuestos (Lindsey y Yeoman, 1983 citados por Jaramillo, 1990).

La manipulación de los componentes del medio de cultivo supone que, bajo determinadas concentraciones se activa la maquinaria celular que favorece la síntesis de metabolitos secundarios. La formulación del medio afecta no solo la iniciación del cultivo sino también la velocidad del crecimiento y formación de biomasa, así como la síntesis del producto, de tal forma, que se tiene que considerar que los metabolitos secundarios son compuestos que pueden o no estar asociados al crecimiento. En tal caso, las condiciones que favorecen el crecimiento, no necesariamente aumentan la síntesis de estos (Fowler, 1984; Yeoman, 1986 citados por Jaramillo, 1990).

El efecto de los componentes del medio que más se han estudiado son:

4.3.1.-REGULADORES DEL CRECIMIENTO.

Estos son los compuestos que presentan los efectos más notorios tanto en el crecimiento celular como en la producción de metabolitos secundarios y en el grado de diferenciación celular ya que condicionan las rutas morfogenéticas.

Como una generalización, solo dos tipos de reguladores del crecimiento, auxinas y citocininas, son necesarias para el desarrollo y producción de productos secundarios. Otras hormonas han sido evaluadas y muestran no tener efecto o ser inhibitorias

(Zenk et.al., 1975 citado por Ilker, 1987). La cantidad exacta de citocinina requerida para la producción del metabolito es dependiente de la concentración de auxina (Yamakawa et.al., 1983). Comúnmente se requiere una baja concentración de auxina, las cuales son altamente específicas. Sin embargo, como no han sido caracterizados con certeza los receptores de auxina, no se puede decir qué tipo de auxina es más efectivo (Ilker, 1987).

4.3.2.-FUENTE DE CARBONO.

Entre los factores nutricionales, los carbohidratos, tienen especial importancia, tanto en la síntesis de constituyentes celulares, como en la producción de metabolitos secundarios.

Sacarosa es la mejor fuente de carbono y juega un papel especial en el desarrollo celular y en la producción de pigmento en cultivo. En varios estudios, las altas concentraciones de sacarosa de cerca del 10% , dan la más alta producción de antocianinas (Yamakawa et.al., 1983; Ozeki y Komamine, 1985).

La producción de chiconina en cultivos de Lithospermum erythrorhizon aumentó cuando se incrementó la sacarosa de 1 a 5% . Es importante señalar que, la relación carbono/nitrógeno es aún más importante que la fuente de carbono sola (Dougall, 1980).

4.3.3.-MACRONUTRIENTES.

Se ha observado, que las bajas concentraciones de fósforo y nitrógeno, generan incremento en la síntesis de metabolitos secundarios acompañado de disminución en la velocidad de crecimiento (Fowler, 1983).

De acuerdo con Yamakawa et.al. (1983) la máxima producción de antocianinas en cultivos celulares de uva ocurre a proporciones equimolares de NO_3^- : NH_4^+ ; sin embargo, el fosfato y la sacarosa ejercen un efecto contrario.

Alta concentración de sacarosa, acompañada de alta concentración de nitrógeno y baja concentración de fosfato

originan la mayor producción de antocianinas pero también menor masa celular.

4.3.4.-EFECTO OSMOTICO EN CULTIVO.

El efecto osmótico de los componentes del medio sobre células vegetales en cultivo se ha estudiado suplementando el medio de cultivo con compuestos no metabolizables, tales como, manitol, Carbowax ® -1000 y NaCl. Withers y Street 1977, (citados por Dougall, 1980), observaron cambios en el tamaño celular e incremento en la resistencia a lesión celular en cultivos en suspensión de Acer pseudoplatanus y Capsicum annum después de haber desarrollado estas células en medio suplementado con manitol. Sin embargo, el efecto osmótico de la composición del medio de cultivo sobre el funcionamiento celular se ha estudiado poco.

4.4.-ADITIVOS COLORANTES PARA ALIMENTOS.

Los aditivos alimentarios se han utilizado por el hombre desde tiempos remotos. Los primeros aditivos incluían sal, miel, vino y especias, todos ampliamente utilizados con propósitos de preservación o saborización. Algunos métodos posteriores de preservación de alimentos incluían el salado o ahumado de carnes para asegurar el suministro durante todo el año. En tiempos recientes ha habido un aumento considerable en el número y naturaleza de aditivos disponibles, lo que permite mejorar la producción, distribución y aceptación de alimentos en todo el mundo. La reglamentación del uso de aditivos alimentarios señala que deben ser inócuos, no deben ser utilizados en cantidades más grandes que las necesarias, no deben ser utilizados con la intención de enmascarar la naturaleza o calidad del alimento y el uso de aditivos no nutritivos se mantendrá al mínimo (Fairweather, 1981).

Los colorantes son aditivos que representan una categoría especial dentro de los aditivos alimentarios (Meggos, 1984). La característica más importante por la que se juzga la calidad de un

alimento, es su apariencia, y el atributo de apariencia más importante es el color (Mc Laren, 1980).

El color de los alimentos es un atributo sensorial muy importante. Clydesdale (1977), define el color como "una sensación experimentada por un individuo cuando energía en forma de radiación dentro del espectro visible, llega a la retina del ojo". Aunque se consideran los matices del color como un fenómeno puramente subjetivo, las sensaciones del observador son gobernadas solamente por la composición de la luz que llega al ojo desde el objeto.

Así, los consumidores son frecuentemente estimulados por el color de los productos que compra durante su vida diaria, automáticamente se evitan los productos con color pardo o manchado, en general, seleccionan el más brillante o más uniformemente coloreado.

4.4.1.-USOS E IMPORTANCIA.

El uso de colorantes como aditivos en alimentos es de suma importancia para el fabricante y para el consumidor ya que es uno de los factores que determinan la aceptación que tenga un producto.

Para el fabricante, la adición de colorantes ayuda a garantizar la uniformidad del color entre lote y lote y ayuda a reforzar el color presente pero que es menos intenso de lo que se pudiera esperar. Para el consumidor, la adición de colorantes ayuda a restaurar la apariencia de los alimentos cuyo contenido original de colorante ha sido reducido por tratamientos de procesamiento y también para hacer más atractivo y fácilmente identificable un producto (Spears, 1988).

4.4.2.-CLASIFICACION.

Los colorantes alimentarios se pueden dividir en tres categorías principales:

a) Colorantes Naturales Orgánicos de origen vegetal o animal.
b) Colorantes de Origen Inorgánico obtenidos de la naturaleza o reproducidos sintéticamente.

c) Colorantes Artificiales o compuestos idénticos que son reproducidos por síntesis química. Estos pueden ser, los derivados isoprenoides (carotenos), los derivados tetrapirrol (clorofila), los derivados benzopirano (antocianinas y flavonoides), las flavinas (tales como riboflavina) y los pigmentos inorgánicos (Bauernfeind, 1981).

Los colorantes artificiales han sido por muchos años, ideales para reemplazar la coloración natural destruida durante los procesos alimentarios, reduciendo las variaciones de coloración entre lotes de productos, haciéndolos apetecibles para los consumidores. Sin embargo, actualmente, el número de colorantes artificiales para uso alimentario, ha sido drásticamente reducido como resultado de estudios toxicológicos (Spears, 1988).

4.4.3.-LEGISLACION.

La obtención de colorantes de origen natural ha cobrado gran interés para la industria alimentaria debido a que la Food and Drug Administration (FDA), ha suspendido el uso de diversos colorantes artificiales.

Entre los productos suspendidos por este organismo están los colorantes sintéticos FD&C (colorantes propios para la industria alimentaria), rojos números 1, 2, 4 y 40 (Villegas, 1979).

En los Estados Unidos, el uso de colorantes en alimentos es controlado por el Color Additives Amendments de 1960 para la Federal Food, Drug and Cosmetic Act de 1938 (Spears, 1988).

En México, la legislación de alimentos está a cargo de la sección de Asesoría de Alimentos, Bebidas y Medicamentos de la Secretaría de Salubridad y Asistencia.

Las regulaciones para los aditivos alimentarios permitidos en México, se encuentran en el Reglamento de Aditivos para Alimentos, emitido por el Sector Salud del Gobierno Federal (López, 1985).

Aunque las razones para el uso de colorantes en alimentos han permanecido inalteradas desde antes de que existiera un control legislativo, los fabricantes de alimentos han tenido que reconocer que la tendencia hacia el uso de aditivos naturales se ha incrementado en los últimos años.

Desde el punto de vista legal, los colorantes para alimentos pueden ser divididos en dos grupos: a) aquellos listados para uso y b) los que se encuentran provisionalmente listados.

Los aditivos colorantes listados para uso, han sido evaluados por la FDA para comprobar que son inocuos y poder intentar su aplicación.

Los colorantes listados provisionalmente, son tintas y pigmentos que no son considerados como tóxicos pero que no han sido sometidos a todas las pruebas requeridas por el Color Additives Amendments, para establecer su elegibilidad para el listado permanente.

Los listados son revisados aproximadamente una vez al año, si existen suficientes razones y si los fabricantes o consumidores de estos colorantes lo demandan, el listado provisional es extendido hasta la terminación de las investigaciones requeridas.

Para desarrollar y evaluar un colorante y para que pueda obtener un lugar en el listado permanente, puede tomar de 5 a 7 años, dependiendo del propósito de uso que tenga (Marmion, 1979).

4.5.-DESARROLLO EN LA PRODUCCION DE COLORANTES ALIMENTARIOS.

La síntesis comercial de pigmentos "idénticos a los naturales", proporciona una vía útil de producción de colorantes químicamente puros, de calidad uniforme y con especificaciones precisas. Los carotenoides, fueron los primeros pigmentos exitosamente sintetizados comercialmente (Isler et.al., 1958 citado por Spears, 1988).

Un pigmento sintéticamente puro puede modificarse para aumentar su estabilidad y ampliar la variedad de aplicaciones, de acuerdo a los requerimientos de los fabricantes de alimentos.

Un logro en este campo ha sido la producción de formas de β -caroteno que son estables a diferentes pH, resistentes a reducción química y dispersables en agua. Otros compuestos que también han sido sintetizados, son: Betanina, el principal pigmento de betabel (Herrmann y Dreiding, 1975), antocianinas (Jurd, 1964) y clorofilas (Humphrey, 1980) (citados por Spears, 1988).

Sin embargo, la explotación comercial de estos procedimientos es difícil, debido al bajo rendimiento de los productos, que da como resultado el alto costo de los aditivos.

Estos colorantes "idénticos a los naturales" tienen también que ser sometidos a pruebas toxicológicas para confirmar su inocuidad, después ser aprobados por las autoridades que regulan su uso y entonces podrían ser utilizados.

Además, la carencia de uniformidad internacional en los criterios de pruebas alimentarias entre el gobierno y la industria, que son los organismos responsables de evaluar estas sustancias, limita aún más que exista mayor desarrollo en los pigmentos sintéticos (Spears, 1988).

4.6.-BETALAINAS.

4.6.1.-ESTRUCTURA.

El término Betalaina (Mabry y Dreiding, 1968) abarca a todos aquellos compuestos cuya estructura está basada en el esqueleto general (1), (Fig. IV.1) y se utiliza para denominar 2 grupos de pigmentos vegetales, hidrosolubles, que se acumulan en vacuola, de distribución restringida a plantas que pertenecen al orden Centrospermae, con una estrecha relación química y biogenética: las betacianinas, (Fig. IV.1) (Piattelli, 1964), que dan coloraciones de rojo a violeta y las betaxantinas, que originan coloración amarilla.

El compuesto característico, que representa a las betaxantinas encontradas en la naturaleza, es la indicaxantina,

aislada de Opuntia ficus-indica (Fig. IV.2) (Piattelli, 1964).

La estructura general de todas las betacianinas está basada en dos agliconas isoméricas, (a) betanidina y (b) isobetanidina (Fig. IV.3) (Piattelli, 1976).

Las betacianinas son compuestos nitrogenados cuya constitución química está integrada por 2 residuos : un azúcar y una aglicona, originando así un glucósido (Velázquez, 1990).

La aglicona está compuesta por dos derivados de la tirosina : el ácido betalámico (a) y la ciclodopa (b) (Fig. IV.4) (Mabry, 1980 citado por Velázquez, 1990) . Ambos se unen formando una base de Schiff, en una reacción reversible que puede ser espontánea o llevarse a cabo enzimáticamente (en el laboratorio) . El producto de ésta reacción es la betanidina (aglicona) (Fig. IV.5) (Chang, 1974).

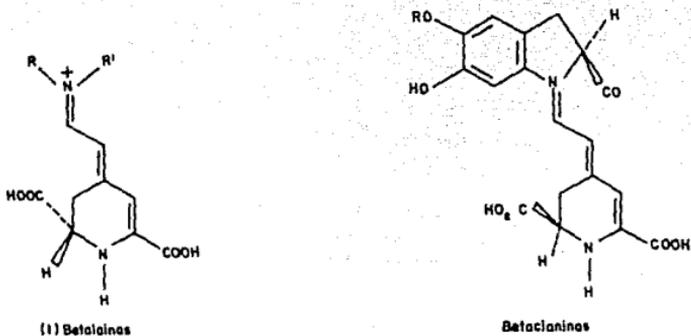


FIG. IV. 1.- Fórmula General de los Betalainins(I) y Betacianins. (Piattelli, 1981)

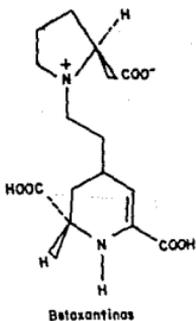
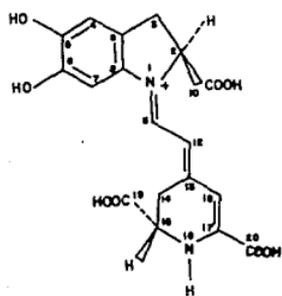
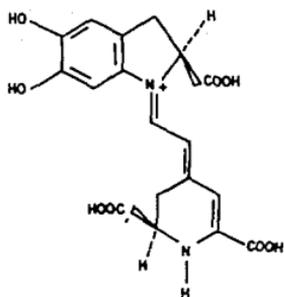


FIG. IV. 2.- Fórmula general de las betaxantins representada por indicaxantins (Piattelli, 1964)

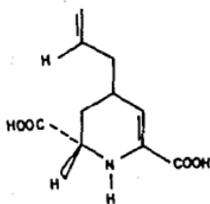


(a) Betanidina

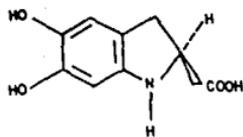


(b) Isobetainidina

FIG. IV. 3- Estructura de (a) Betanidina y (b) isobetainidina, (Piaffelli, 1976)



(a) Acido Betalámico



(b) Ciclodopa

FIG. IV. 4- Estructura del (a) Acido Betalámico y de (b) Ciclodopa, (Mabry, 1980, citado por Velázquez, 1990)

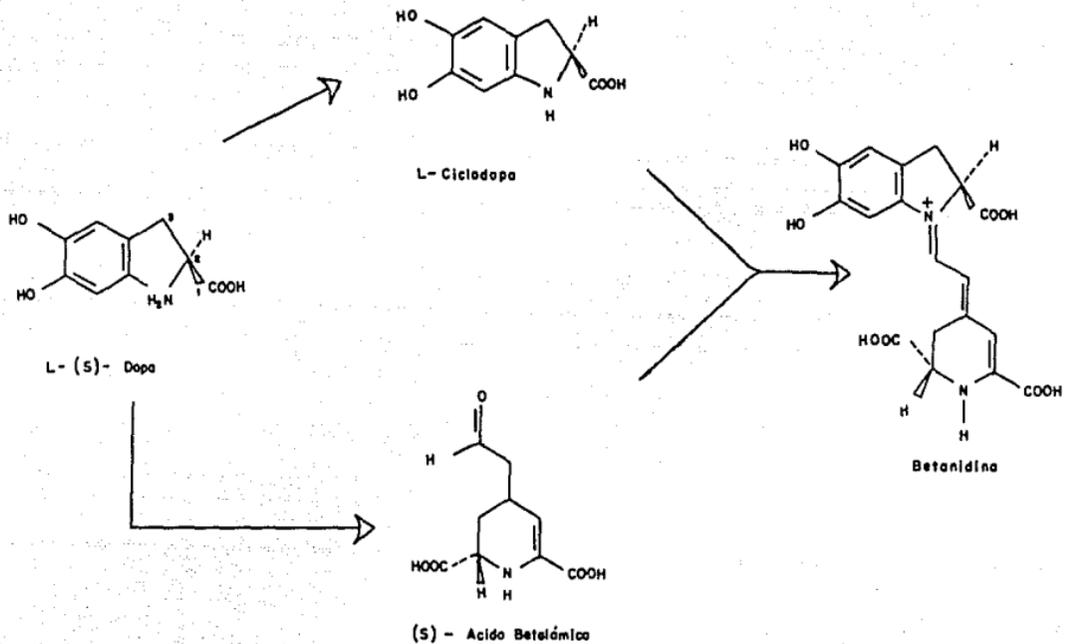


FIG. IV. 5.-Biosíntesis de Betanidina (Chang, Ch. et al, 1974)

4.6.2.-FACTORES QUE REGULAN LA BIOSINTESIS DE BETALAINAS.

En el control de la síntesis de las betalainas, se involucran una serie de factores, tales como, luz, temperatura, condiciones hídricas de la planta, fitorreguladores, etc., elementos decisivos para aumentar o disminuir la síntesis de estos productos secundarios.

4.6.2.1.-LUZ.

El factor ambiental más investigado que controla la síntesis de betalainas es la luz. Este es un requerimiento necesario para la síntesis de pigmento en ciertas especies, mientras en otras la acumulación de betalainas también ocurre en la oscuridad (Wohlpart y Mabry, 1968 citados por Piattelli, 1976).

La reversibilidad rojo-lejano, (control a nivel de fitocromo) de la inducción luminosa de la síntesis de betalainas, ha sido demostrada en plántulas de Amaranthus tricolor (Ala de perico) (Piattelli, et.al., 1969 ; Colomas y Bulard, 1975), A. caudatus (Flor de seda) (Kohler, 1972b ; French et.al., 1973), Chenopodium rubrum (Wagner y Cumming, 1970), Celosia plumosa (Giudici de Nicola et.al., 1973a) y C. cristata (Cinco de mayo) (Giudici de Nicola et.al., 1974) (Citados por Piattelli, 1981).

El fotocontrol de la síntesis de betalainas, probablemente ocurre vía activación de genes. Esta suposición se basa en la acción de inhibidores de ácidos nucleicos y biosíntesis de proteínas sobre la síntesis de pigmento (Birnbaum y Kohler, 1970 Kohler y Birnbaum, 1970b ; Stobart et.al., 1970 ; Piattelli et.al. 1970a, b ; Giudici de Nicola et.al., 1972a ; Kohler, 1972a, 1975 citados por Piattelli, 1981).

El efecto de la luz sobre la síntesis de betalainas se puede examinar a dos diferentes niveles, involucrando la activación de genes (directa o indirecta) y la disponibilidad de compuestos ricos en energía. El efecto de la luz sobre el sistema genético parece ser mediado por fotoreceptores, como el fitocromo, mientras que en la disponibilidad de compuestos ricos en energía parece ser

regulado por fitocromo en las primeras horas de irradiación y sucesivamente por el sistema fotosintético (Piattelli, 1976).

4.6.2.2.-INDUCCION QUIMICA.

La biosíntesis de betalainas también puede llevarse a cabo mediante inducción química. La cinetina es capaz de reemplazar el requerimiento luminoso para producción de betalainas (Bamberger y Mayer, 1960 ; Kohler, 1967, 1972b ; Piattelli et.al., 1971 ; Giuduci de Nicola et.al., 1973a ; Mazin et.al., 1976 citados por Piattelli, 1981). Sin embargo, los experimentos con cinetina son difíciles de interpretar, debido a los efectos que tiene sobre una serie muy amplia de procesos de desarrollo de la planta. No obstante es evidente que el efecto de la cinetina sobre la acumulación de pigmento, es grande en plantas con requerimiento luminoso y moderado en especies capaces de sintetizar en la oscuridad.

El efecto de la cinetina ha sido atribuido a la activación de los mismos genes regulados por los efectos de luz y a la acción represora de inhibidores de ácidos nucleicos y biosíntesis de proteínas.

En general, estos resultados sugieren que cinetina, así como luz, actúan a dos diferentes niveles, tanto activación de genes como el control de la disponibilidad de compuestos ricos en energía.

4.6.2.3.-CONTROL GENETICO.

La regulación de la biosíntesis de betalainas se ha estudiado también a nivel genético. Se han realizado investigaciones sobre herencia en betalainas con Portulaca grandiflora (Yasui, 1920; Ikeno, 1921, 1922, 1924 y 1928; Enamoto, 1923 y 1927 citados por Piattelli, 1981), donde se establece que los fenotipos blancos, son recesivos para los fenotipos coloreados.

Se han realizado estudios más recientes para betalainas con flores de varios colores y sus híbridos F₁ (Ootani y Hagiwara,

1969 citados por Piattelli, 1981), donde se determinó que las flores púrpuras contienen principalmente betacianinas y en cantidades traza, betaxantinas, mientras que lo opuesto se aplica para flores amarillas. Los colores rojo, naranja e intermedios, presentan proporciones variables de betacianinas y betaxantinas. Las betacianinas, son dominantes para betaxantinas y, en híbridos F₁, el contenido más alto de betacianina en fenotipos color púrpura es dominante para el contenido más bajo en fenotipos color rosa, mientras que, el contenido más alto de betaxantina en fenotipos color amarillo es recesivo para el contenido más bajo en fenotipos color rosa.

4.7.-ESTABILIDAD DE LAS BETACIANINAS.

Existen diversos factores que afectan la estabilidad del color, tales como temperatura, pH, luz y oxígeno (von Elbe, et.al., 1974).

Así mismo, Soboleva et.al., (1976) (citado por Velázquez, 1990) reportó la presencia de una enzima que decolora las betacianinas, la cual se ha encontrado asociada a componentes subcelulares de tejido del betabel. Los estudios realizados sugieren que la enzima tiene mayor actividad en el tejido que conforma la porción epidérmica, que en aquellos que constituyen la porción central del betabel (Shing y Wiley, 1981 citados por Velázquez, 1990).

Esto sugiere que la localización de la enzima que degrada el color, puede asociarse con el sitio donde es mayor la acumulación del pigmento y que en general es la porción epidérmica .

4.8.-BETALAINAS COMO COLORANTES EN ALIMENTOS.

Debido a los estudios realizados sobre la toxicidad de colorantes artificiales y al interés cada vez mayor en el consumo de alimentos naturales se ha estimulado la investigación con pigmentos vegetales, como aditivos colorantes para alimentos

(Pasch y von Elbe, 1975).

El betabel Beta vulgaris es la especie vegetal más común que sintetiza betalainas. El uso de estos pigmentos en alimentos ha cobrado gran interés desde que el polvo y el jugo concentrados de betabel son permanentemente listados como aditivos colorantes por el Color Additive Amendment de 1960 (von Elbe, et.al., 1974).

El pigmento rojo-violeta, betanina, fue aislado originalmente de betabel y su importancia para la industria alimentaria aumentó cuando la FDA suspendió el uso de pigmentos rojos FD&C (Riboh, 1977 citado por Weller y Lasure, 1981). Además, se ha cuestionado el uso de nitritos y nitratos, los cuales imparten coloración roja, debido a que producen nitrosaminas carcinogénicas en el estómago (Fiddler et. al., 1972 citado por Weller y Lasure, 1981)

El uso de betalainas como colorantes en alimentos no es nuevo. Existen reportes que en el siglo pasado, eran utilizadas como colorantes en vinos, para proporcionar una coloración roja deseada. Sin embargo, esta práctica se prohibió por considerarla adulteración (Wyler y Dreiding, 1961 citados por Pasch y von Elbe, 1975).

Las propiedades físicas y químicas de las betalainas limitan su aplicación a alimentos que tienen vida corta de anaquel, donde el color permanece inalterado. Los tratamientos térmicos elevados o prolongados, destruyen las betalainas, pero el color es retenido en alimentos sujetos a tratamientos térmicos mínimos. En otros productos alimentarios el colorante puede añadirse después de que el producto se haya calentado (Pasch y von Elbe, 1975).

Estos pigmentos naturales pueden utilizarse en productos alimentarios, tales como, embutidos (von Elbe et.al., 1974) ; productos lácteos, principalmente yoghurt y helados (Pasch y von Elbe, 1975).

V MATERIALES Y METODOS

5.1.-MATERIAL BIOLÓGICO.

Para el presente estudio se trabajó con 3 especies vegetales ampliamente utilizadas como ornamentales en nuestro país, y para las que se ha reportado la presencia de betalainas (Piattelli y Minale, 1964 ; Minale, et.al., 1966 ; Piattelli e Imperato, 1970a y 1970b). Dos de ellas pertenecen a la familia Amaranthaceae: Iresine lindenii y Amaranthus sp. y la otra a la familia Nyctaginaceae : Bougainvillea glabra, de la cual se trabajaron 3 diferentes fenotipos con brácteas de color rojo, amarillo y blanco.

5.2.-MEDIO DE CULTIVO.

La composición de los medios se basó en el propuesto por Murashige y Skoog, MS, (1962), (consultar el apéndice), en el que se incluyeron compuestos orgánicos de grado analítico como nutrientes, vitaminas y reguladores del crecimiento. Se agregaron 30g/l de sacarosa, el pH se ajustó a 5.8 ± 0.1 con NaOH ó HCl, 1.0 N y 8g/l de agar. La esterilización se realizó en autoclave a 119 °C de temperatura y 1.5 Kg/cm² de presión durante 30 minutos.

5.3.-DESINFESTACION Y SIEMBRA DE TEJIDOS.

Para cada especie se utilizaron las hojas o brácteas más jóvenes como fuentes de inóculos, las cuales se agitaron con etanol al 70% durante 1 minuto en el caso de Iresine lindenii y Amaranthus sp. y durante 30 segundos para Bougainvillea glabra para reducir la tensión superficial. Transcurrido este tiempo se desinfectaron primero por medio de la transferencia a una solución de hipoclorito de calcio al 4% (consultar el apéndice), durante 8

minutos con agitación constante y posteriormente se pasaron a hipoclorito de sodio al 30% durante 2 minutos y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Una vez terminada la desinfección se hicieron cortes utilizando pinzas y bisturí previamente flameados, obteniendo inóculos de aprox. 1 cm². Estos se sembraron en frascos de vidrio que contenían el medio de cultivo, procurando que la porción del envés estuviera en contacto con el medio. La desinfección, cortes y siembra, se realizaron en condiciones asépticas en una campana de flujo laminar marca VECD mod. GHFL-A12.

5.4.-INCUBACION.

Los cultivos se incubaron a una temperatura de 27 ± 3°C. En una primera fase, la mitad de los cultivos se incubaron en luz blanca (con un fotoperiodo de 16/8), proporcionada por lámparas fluorescentes, marca Phillips, de 39 watts, colocadas a 25 cm de distancia de los cultivos, mientras que, la otra mitad se incubó en condiciones de oscuridad total.

5.5.-INDUCCION DE CALLO

Como primera etapa se buscó la formación de tejido calloso de acuerdo a los reportes de Zenk y Deus (1982); Ilker (1987) y Yamakawa (1983), en estudios realizados para metabolitos secundarios. Para el caso de Iresine lindenii se probaron primero 3 diferentes tratamientos, resultantes de la combinación de 3 auxinas, AIA, ANA y 2,4-D, en concentración de 1.5 mg/l, con una citocinina, KIN, en concentración de 0.2 mg/l (Tabla V.2). Se sembraron 6 inóculos por frasco y 4 frascos por tratamiento, incubando 2 frascos en luz y 2 en oscuridad. Se evaluó la formación y grado de desarrollo de tejido calloso realizándose el registro de resultados del experimento a las 4 semanas.

Posteriormente, en el caso de Amaranthus sp. y para cada uno de los fenotipos antes mencionados de Bougainvillea glabra, se probaron 10 tratamientos diferentes resultantes de la combinación

de 5 auxinas, AIA, ANA, 2,4-D, AIB y Picloram en concentración de 2.0 mg/l, y 2 citocininas, KIN y BAP, en concentración de 0.2 mg/l (Tabla V.3). Se sembraron 6 inóculos por frasco y 4 frascos por tratamiento, incubando 2 frascos en luz y 2 frascos en oscuridad. Se evaluó la formación y grado de desarrollo de tejido calloso, realizándose el registro de resultados del experimento a las 4 semanas.

5.6.-OPTIMIZACION EN LA CONCENTRACION DE AUXINA/CITOCININA.

Una vez que se determinó la combinación de auxina y citocinina que originaba tejido calloso, se procedió a buscar la concentración óptima de reguladores. Para Iresine lindenii se probaron 25 diferentes tratamientos como resultado de la combinación de 5 concentraciones de 2,4-D de 0.0, 0.5, 1.0, 2.0 y 5.0 mg/l, y 5 concentraciones de KIN de 0.0, 0.05, 0.2, 0.5 y 1.0 mg/l. Se sembraron 6 inóculos por frasco y 2 frascos por tratamiento, incubando en luz y oscuridad. Se evaluó el mayor desarrollo de callo y la presencia de coloración en el mismo. La evaluación del experimento se realizó a las 4 semanas (Tabla V.4).

En el caso de Amaranthus sp. y Bougainvillea glabra, para los 3 fenotipos mencionados se probaron 9 diferentes tratamientos como resultado de la combinación de 3 concentraciones de 2,4-D de 0.5, 1.5 y 3.0 mg/l, y 3 concentraciones de BAP de 0.05, 0.2 y 0.5 mg/l. Se sembraron 6 inóculos por frasco y 2 frascos por tratamiento, incubando en luz y oscuridad. Se evaluó el mayor desarrollo de callo y la presencia de coloración en el mismo. La evaluación del experimento se realizó a las 4 semanas (Tabla V.5). (Fig. V.6.-Metodología general).

5.7.-ANALISIS QUIMICO DEL PIGMENTO.

La metodología de extracción y análisis de los pigmentos se llevó a cabo en base a los estudios realizados por Piattelli y Minale (1964), Minale et.al. (1966), Piattelli e Imperato (1970a y 1970b). Para la extracción de betalainas del material vegetal

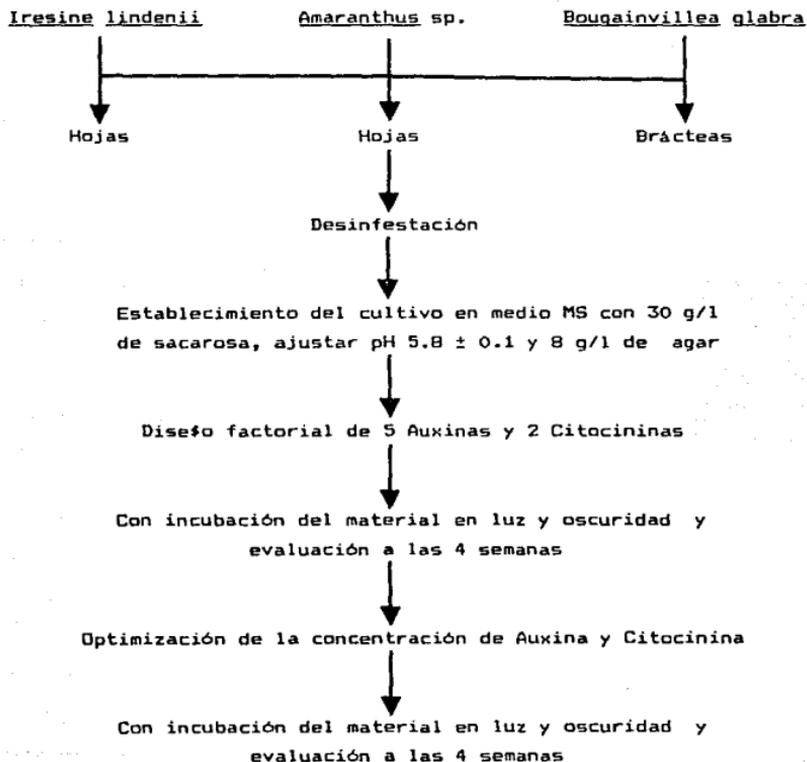


Fig. V.6.-Metodología General.

TABLA V.2.- INDUCCION DE CALLO

		AUXINAS (1.5 mg/l)		
		AIA	ANA	2,4-D
CITOCININAS (0.2 mg/l)	K	AIA / KIN	ANA / KIN	2,4-D / KIN
	I			
	N			

COMBINACIONES DE AUXINAS/CITOCININAS PROBADAS EN MEDIO MS CON INOCULOS DE HOJA DE Iresine lindenii.

TABLA V.3.- INDUCCION DE CALLO

		AUXINAS (1.5 mg/l)				
		AIA	ANA	2,4-D	AIB	Pic
CITOCININAS (0.2 mg/l)	K					
	I	AIA/KIN	ANA/KIN	2,4D/KIN	AIB/KIN	Pic/KIN
	N					
	B					
	A	AIA/BAP	ANA/BAP	2,4D/KIN	AIB/BAP	Pic/BAP
	P					

COMBINACIONES DE AUXINAS/CITOCININAS PROBADAS EN MEDIO MS CON INOCULOS DE Amaranthus sp. Y BRACTEAS DE Bougainvillea glabra.

TABLA V.4.- OPTIMIZACION DE CONCENTRACIONES

		2,4-D (mg/l)				
		0.0	0.5	1.0	2.0	5.0
K	0.0	0.0/0.0	0.5/0.0	1.0/0.0	2.0/0.0	5.0/0.0
	0.05	0.0/0.05	0.5/0.05	1.0/0.05	2.0/0.05	5.0/0.05
I	0.2	0.0/0.2	0.5/0.2	1.0/0.2	2.0/0.2	5.0/0.2
	0.5	0.0/0.5	0.5/0.5	1.0/0.5	2.0/0.5	5.0/0.5
N	1.0	0.0/1.0	0.5/1.0	1.0/1.0	2.0/2.0	5.0/1.0

CONCENTRACIONES PRBADAS DE 2,4-D/KIN EN MEDIO MS CON INOCULOS DE HOJA DE Iresine lindenii.

TABLA V.5.- OPTIMIZACION DE CONCENTRACIONES

		2,4-D (mg/l)		
		0.5	1.5	3.0
(mg/l)	B 0.05	0.5/0.05	1.5/0.05	3.0/0.05
	A 0.2	0.5/0.2	1.5/0.2	3.0/0.2
	P 0.5	0.5/0.5	1.5/0.5	3.0/0.5

CONCENTRACIONES PROBADAS DE 2,4-D/BAP EN MEDIO MS CON INOCULOS DE HOJA DE Amaranthus sp. Y BRACTEAS DE Bougainvillea glabra.

fresco, se colectaron hojas de Iresine lindenii y brácteas de Bougainvillea glabra de color púrpura, rojo y amarillo, con las cuales se trabajó tan pronto como fue posible, para evitar cambios fisiológicos mayores que afectaran el análisis.

Se pesaron en balanza granataria 100 g de hojas y 100 g para cada uno de los diferentes colores de brácteas. Estas, se cortaron con navaja para facilitar la extracción del pigmento y posteriormente se agregaron 200 ml de etanol al 70% , durante 2 minutos. Transcurrido este tiempo se decantó y se desechó el extracto etanólico y se agregaron 200ml de agua destilada y se dejaron remojando por 24 h a 5°C. El extracto acuoso se filtró en papel, mientras que, al residuo se le volvieron a agregar 200 ml de agua destilada para seguir extrayendo, hasta que no hubiera más pigmento, con filtraciones en papel. Por otro lado, cada uno de los extractos se calentó en baño María a 80°C durante 2 minutos, para desnaturalizar la enzima. Los extractos se reunieron y se concentraron en rotavapor a 70°C, para después centrifugar a 13000 xg; el sobrenadante se filtró a vacío y se llevó a leer con un espectro Varian mod. DMS 90, UV-visible, en un rango de 750 a 350 nm, con una apertura de slit de 1 nm, velocidad de registro de 100 nm/minuto y velocidad de carta de 20 nm/cm (Fig. V.7).

La cuantificación de pigmento del material en cultivo se basó en la metodología previamente establecida para el material vegetal fresco, para lo cual, se pesaron callos de Amaranthus sp. que se congelaron por 24 h. Posteriormente se llevó a cabo la extracción agregando agua destilada y moliendo con Potter a una temperatura de 5°C. El extracto se calentó en baño María a 80°C durante 2 minutos, después se filtró en papel, se centrifugó a 13000 xg, el sobrenadante se filtró a vacío y se llevó a leer al espectro a 480 y 540 nm con las condiciones anteriormente mencionadas (Fig. V.8).

S.8.-EFECTO DE LA LONGITUD DE ONDA SOBRE LA SINTESIS DE PIGMENTO.

Debido al efecto que tiene la luz sobre la acumulación o producción de pigmento (Yamakawa et.al., 1983) se planteó el siguiente experimento:

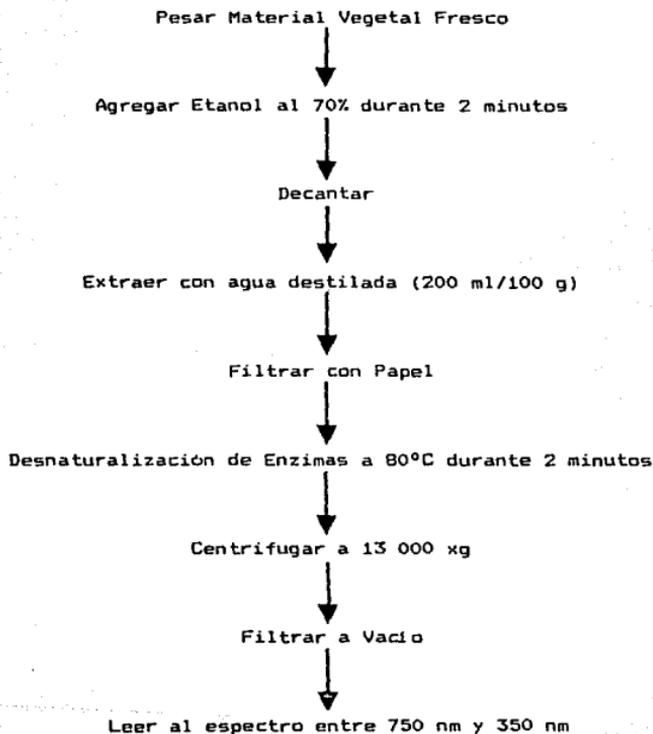


Fig. V.7.-Metodología de extracción para Betalainas de material in vivo .

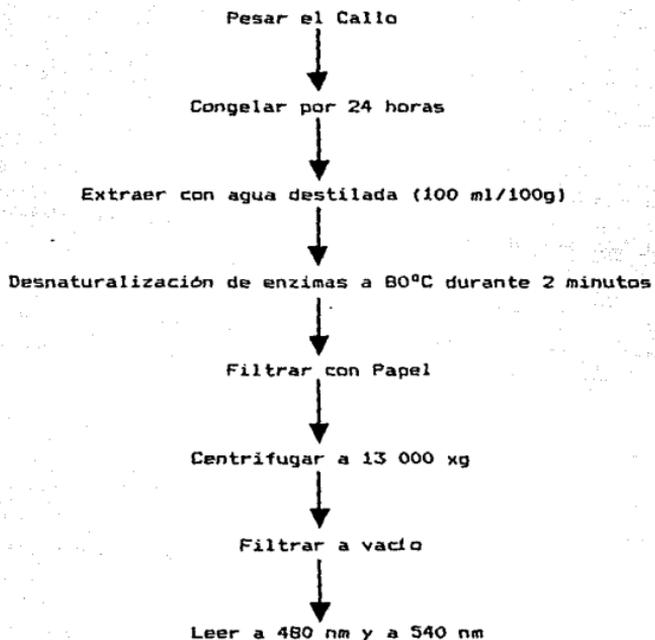


Fig. V.8.-Metodología de extracción para betalainas de material in-vitro .

Se desinfectaron hojas de Iresine lindenii de acuerdo a los procedimientos previamente descritos. Se sembraron 6 inóculos por frasco con medio MS adicionado con 30g/l de sacarosa, 2,4-D y KIN en concentraciones de 0.5 y 0.2 mg/l respectivamente y 8 g/l de agar. También se desinfectaron hojas de Amaranthus sp. y brácteas Bougainvillea glabra de acuerdo a los procedimientos previamente descritos. Se sembraron 6 inóculos por frasco con medio MS, adicionado con 30 g/l de sacarosa, 2,4-D y BAP en concentraciones de 2.0 y 0.2 mg/l respectivamente y 8 g/l de agar. Para cada especie, la mitad de la siembra (24 frascos), se incubó en diferentes longitudes de onda. Esto se hizo, envolviendo cada frasco (4 frascos por tratamiento), con papel celofán rojo (490-560 nm), naranja (480-490 nm), amarillo (435-480 nm), verde (595-650 nm) y azul (580-595 nm). El lote control se incubó en oscuridad. Se evaluó el efecto de las diferentes longitudes de onda sobre la producción de callo, así como, la acumulación o producción de pigmento. La evaluación del experimento se llevó a cabo a las 4 semanas.

La otra mitad de la siembra (24 frascos), se incubó en oscuridad por 4 semanas, una vez obtenidos los callos, se resembraron en los medios antes mencionados para cada especie y se incubaron en diferentes longitudes de onda, envolviendo cada frasco (4 frascos por tratamiento), de la manera anteriormente mencionada. El lote control se incubó en oscuridad. En este experimento se evaluó el desarrollo del callo y la acumulación o producción de pigmento. La evaluación se llevó a cabo a las 4 semanas. (Fig. V.9).

5.9.-MANIPULACIONES DEL MEDIO DE CULTIVO.

Para estos experimentos se trabajó con callos de Amaranthus sp., los cuales se resembraron en medio MS adicionado con 2.0 y 0.2 mg/l de 2,4-D y BAP, 30 g/l de sacarosa y 8 g/l de agar, incubando el material en luz roja para posteriormente resembrar nuevamente en medio MS con variación en las concentraciones de fósforo y calcio y en la relación carbono/nitrógeno (Yamakawa,

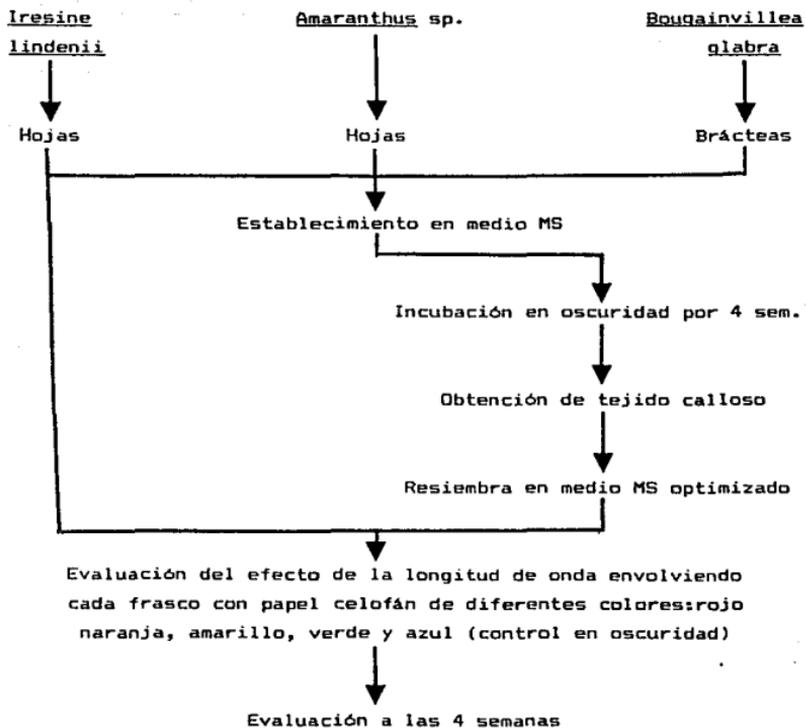


Fig. V.9.-Efecto de la longitud de onda sobre la síntesis de pigmento.

et.al.,1983). También se adicionaron diferentes concentraciones de agentes osmóticos como manitol y NaCl. El material se incubó en luz blanca, luz roja y en oscuridad (Control), evaluando a las 4 semanas (Fig. V.10).

5.9.1.-VARIACIONES DE FOSFORO (KH_2PO_4) Y CALCIO ($CaCl_2$).

Se probaron 6 tratamientos con variaciones de fósforo de 20, 50, 100, 170 (que se utilizó como control por ser la concentración normal en el medio) 350 y 600 mg/l, así como, 3 tratamientos con variaciones de calcio de 150, 330 (concentración control) y 600 mg/l, en medio MS suplementado con 2.0 y 0.2 mg/l de 2,4-D y BAP, 30 g/l de sacarosa y 8 g/l de agar. Se resembraron 2 callos de Amaranthus sp. por frasco y se incubaron 2 frascos en luz blanca, 2 en luz roja y 2 en oscuridad (lote control), para cada uno de los tratamientos. Se evaluó la producción de pigmento mediante la metodología previamente descrita para el análisis químico del material en cultivo. La evaluación se llevó a cabo a las 4 semanas (Tabla V.6).

5.9.2.-VARIACIONES DE LA RELACION CARBONO/NITROGENO.

Se probaron 20 tratamientos, resultantes de la combinación de 4 concentraciones de sacarosa, como fuente de carbono, de 0.040, 0.090, (concentración control) 0.150 y 0.300 M y 5 concentraciones de nitrato de amonio (NH_4NO_3), como fuente de nitrógeno, de 0.015, 0.030, 0.060, (concentración control) 0.120 y 0.180 M, en medio MS, suplementado con 2.0 y 0.2 mg/l de 2,4-D y BAP respectivamente y 8 g/l de agar. Se resembraron 2 callos de Amaranthus sp. por frasco, y se incubaron 2 frascos en luz blanca, 2 en luz roja y 2 en oscuridad (lote control), para cada uno de los tratamientos. Se evaluó la producción de pigmento mediante la metodología previamente descrita para el análisis químico del material en cultivo. La evaluación se realizó a las 4 semanas (Tabla V.7).

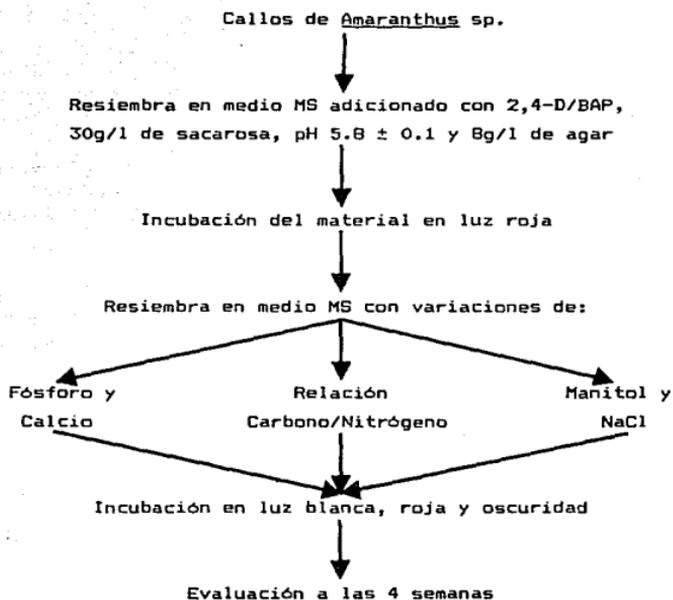


Fig. V.10.—Manipulaciones del medio de cultivo.

Tabla V.6.-Variaciones en la concentración de fósforo y calcio.

Tratamientos de fósforo	KH_2PO_4 (mg/l)	Tratamientos de calcio	CaCl_2 (mg/l)
1	20		
2	50		
3	100	I	150
4	170	II	330
5	350	III	600
6	600		

Tabla V.7.-Variaciones en la concentración de la relación carbono/nitrógeno.

Tratamientos de Sacarosa	Sacarosa (M)	Tratamientos de Nitrógeno	NH ₄ NO ₃ (M)
A	0.040	1	0.015
		2	0.030
		3	0.060
		4	0.120
		5	0.180
B	0.090	1	0.015
		2	0.030
		3	0.060
		4	0.120
		5	0.180
C	0.150	1	0.015
		2	0.030
		3	0.060
		4	0.120
		5	0.180
D	0.300	1	0.015
		2	0.030
		3	0.060
		4	0.120
		5	0.180

5.9.3.-VARIACIONES EN LA CONCENTRACION DE AGENTES OSMOTICOS.

Se probaron 4 tratamientos con variaciones de NaCl de 0.1, 0.5, 1.0 y 1.5 % (además del control sin NaCl), así como, 4 tratamientos con variaciones de manitol de 2.0, 7.0 12.0 y 17 % (el control sin manitol), en medio MS suplementado con 2.0 y 0.2 mg/l de 2,4-D y BAP, 30 g/l de sacarosa y 8 g/l de agar. Se sembraron 2 callos de Amaranthus sp. por frasco, y se incubaron 2 frascos en luz blanca, 2 en luz roja y 2 en oscuridad (lote control), para cada uno de los tratamientos. Se evaluó la producción de pigmento mediante la metodología previamente descrita para el análisis químico del material en cultivo. La evaluación se llevó a cabo a las 4 semanas (Tabla V.8).

Tabla V.8.-Variaciones en la concentración de Agentes Osmóticos.

Tratamientos	NaCl (%)	Manitol (%)
a	Control	Control
b	0.1	2.0
c	0.5	7.0
d	1.0	12.0
e	1.5	17.0

VI RESULTADOS Y DISCUSION

Con el propósito de obtener líneas celulares productoras de pigmentos, el material vegetal fue seleccionado principalmente, con base en la presencia de betalainas. Una vez elegidas las especies con las que se iba a trabajar, se prosiguió al establecimiento del material en cultivo. Esta fase implica, el desarrollo de un método de desinfestación específico.

También, con el propósito de encontrar cual de los diferentes tejidos vegetales inducía formación de tejido calloso, se sembraron fragmentos por separado, tanto de hoja como peciolo de Iresine lindenii y Amaranthus sp. e igualmente se sembraron fragmentos de hojas, brácteas de los fenotipos rojo, amarillo y blanco, así como peciolo de Bougainvillea glabra, en medio MS al 50% o con concentración de sales a la mitad (consultar el apéndice). Se observó que había formación de callo en todos los inóculos probados, sin embargo, en el primer caso hubo mayor producción de callo en inóculos de hoja, y en el segundo caso, fue en las brácteas donde se observó mejor respuesta obteniéndose producción de callo para los tres fenotipos.

Cabe mencionar que aunque las "bugambileas" son plantas perennes, la época de floración varía con las estaciones del año y esto afectaba los experimentos, ya que al tirar las flores se perdían también las brácteas y no se podía tener un suministro constante de material por lo que se tuvo que trabajar con diferentes plantas, es decir, diferentes genotipos para cada fenotipo. Se observó que, había variación en la respuesta a la formación de callo, así como, en la friabilidad e incluso de coloración en los mismos, dependiendo del genotipo utilizado. Esto demuestra la importancia e influencia que tiene la información genética sobre la respuesta que se obtenga en cultivo.

La iluminación fue otro aspecto importante que tuvo que ser determinado para cada planta, debido a que los requerimientos luminosos para la obtención de pigmentos en cultivo de tejidos no

han sido suficientemente investigados. Por eso se decidió que el material se incubara tanto en luz como en oscuridad, observándose que cuando el material se incubó en condiciones de iluminación los tejidos sufrieron necrosamiento, mientras que, el material incubado en oscuridad se conservó en buenas condiciones.

Con base en los resultados preliminares, se plantearon como primera etapa del presente estudio, los bioensayos correspondientes a inducción de callo y optimización de la concentración de los reguladores del crecimiento. La evaluación de los resultados se hizo de manera cualitativa, analizándose en el primer caso, la producción de tejido calloso, y en el segundo, la producción de biomasa, así como la coloración del callo.

6.1.-INDUCCION DE CALLO.

En la tabla VI.9, se muestran los resultados correspondientes para Iresine lindenii, en inóculos de hoja incubados en oscuridad. Se observó, en una primera aproximación que con la combinación 2,4-D/KIN a una concentración de 1.5 y 0.2 mg/l respectivamente, hubo inducción a la formación de tejido calloso. Cabe mencionar que mientras con la combinación AIA/KIN se indujo formación de raíces, con la combinación ANA/KIN se indujo elongación y división celular que finalmente produjeron el necrosamiento de tejido. Con el material incubado en luz se observó una respuesta semejante para cada tratamiento, aunque esta fue menor, además de que hubo necrosamiento de los tejidos. Se ha reportado que la luz aumenta la producción de pigmento en cultivo, y que con una o dos excepciones, la producción de antocianinas y betalainas no ocurre en ausencia de ésta (Dougall, et.al., 1980 citados por Ilker, 1987). Sin embargo, en estudios realizados por Yamakawa et.al.(1983), sobre la producción de antocianinas en cultivos de Vitis, encontraron que había producción de pigmento en los callos incubados en la oscuridad, lo que concuerda con los resultados obtenidos para las diferentes especies con las cuales se trabajó.

TABLA VI.9.- RESPUESTA A LA INDUCCION DE CALLO

AUXINAS (1.5 mg/l)

AIA

ANA

2,4-D

-	-	+
---	---	---

CITOCININAS
(0.2 mg/l)

EFFECTO DE LAS COMBINACIONES DE AUXINA/CITOCININA
PROBADAS EN MEDIO MS CON INOCULOS DE HOJA DE
Iresine lindeni INOCULADOS EN OSCURIDAD,
REALIZANDO LA EVALUACION A LAS 4 SEMANAS.

En el caso de Amaranthus sp. (Tabla VI.10), en inóculos de hoja incubados en la oscuridad, se observó que las combinaciones que indujeron formación de callo fueron 2,4-D/KIN, así como, 2,4-D/BAP, probando concentraciones de 2.0 y 0.2 mg/l respectivamente. En este caso, las características de friabilidad y coloración en el callo, fueron importantes para determinar que la combinación 2,4-D/BAP era la mejor.

Se observaron también respuestas interesantes en cuanto a la formación de raíces con las combinaciones AIB/KIN y AIB/BAP, siendo en esta última donde se desarrollaron en mayor proporción, mientras que, en los demás tratamientos no se observó ninguna respuesta.

Con Bougainvillea glabra, se indujo formación de callo con 4 diferentes tratamientos (Tabla VI.11), 2,4-D/KIN y 2,4-D/BAP, así como, Picloram / KIN y Picloram / BAP, probando también concentraciones de 2.0 y 0.2 mg/l respectivamente. En este caso, en el fenotipo rojo fue donde se observó la mayor respuesta a la producción de callo, siendo estos, friables y con coloración en todas las combinaciones mencionadas. Las respuestas a la inducción de callo, el desarrollo de estos fue menor en comparación con el fenotipo blanco fueron similares, ya que aunque había producción de callo, el desarrollo de estos fue menor en comparación con el fenotipo rojo. Sin embargo, el callo formado por el fenotipo blanco era más friable que el del fenotipo amarillo. Precisamente con base en estas características de friabilidad y coloración en los callos, se seleccionó la combinación con 2,4-D/BAP como la más apropiada.

TABLA VI.10.- RESPUESTA A LA INDUCCION DE CALLO

AUXINAS (2.0 mg/l)

	AIA	ANA	2,4-D	AIB	Pic
K I N	-	-	+	-	-
B A P	-	-	++	-	-

CITOCININAS
(0.2 mg/l)

EFFECTO DE LAS COMBINACIONES AUXINAS/CITOCININAS
PROBADAS EN MEDIO MS CON INOCULOS DE HOJA DE
Amaranthus sp. INCUBADOS EN OSCURIDAD, REALIZANDO
LA EVALUACION A LAS 4 SEMANAS.

+ = CON FORMACION DE CALLO
- = SIN FORMACION DE CALLO

TABLA VI.11.- RESPUESTA A LA INDUCCION DE CALLO

		AUXINAS (2.0 mg/l)				
		AIA	ANA	2,4-D	AIB	Pic.
K I N	CITOCININAS (0.2 mg/l)	-	-	++	-	+
	B A P	-	-	+++	-	+

EFFECTO DE LAS COMBINACIONES DE AUXINAS/CITOCININAS PROBADAS EN MEDIO MS CON INOCULOS DE BRACTEAS DE Bougainvillea glabra EN OSCURIDAD, EVALUANDO A LAS 4 SEMANAS.

+ = CON FORMACION DE CALLO
 - = SIN FORMACION DE CALLO

Ilker, (1987) reportó que los dos pasos más importantes en el desarrollo de cultivos celulares productores de pigmentos incluyen :1) selección continua de líneas celulares altamente productoras y 2) el control de la concentración de los reguladores del crecimiento. La variación en la producción de pigmento en el callo puede detectarse fácilmente a simple vista y el primer punto se puede llevar a cabo seleccionando y propagando las células de callo altamente coloreadas. En cuanto al segundo punto, el mismo autor indica que como una generalización, solo 2 tipos de reguladores del crecimiento, auxinas y citocininas, son necesarias para el desarrollo celular y la formación de pigmentos en cultivo. En los experimentos del presente trabajo se logró la inducción de tejido calloso con coloración en todos los casos, utilizando los reguladores anteriormente mencionados.

6.2.-OPTIMIZACION EN LA CONCENTRACION DE AUXINA/CITOCININA.

A este respecto se sabe que la cantidad exacta de citocinina requerida para la producción de pigmento, depende de la concentración de auxina. Sin embargo, como los receptores de auxina, no han sido determinados con certeza, no se puede decir qué tipo de auxina es más efectivo (Ilker, 1987). En los experimentos realizados para la producción de antocianinas con cultivos de Vitis (Yamakawa, 1983) se observó que a una concentración de 0.6 mg/l de cinetina y 0.01 mg/l de 2,4-D, se estimulaba la producción de pigmento, pero esta se inhibía cuando se utilizaba la misma concentración de 2,4-D y la concentración de cinetina aumentaba a 2.0 mg/l. Esto muestra que los efectos de auxina y citocinina, tienen que ser tomados en cuenta en relación uno con otro, es decir, el efecto de 2,4-D depende de la concentración de cinetina y viceversa.

En la tabla VI.12, se muestran los resultados correspondientes a Iresine lindenii en inóculos de hoja, incubados en luz y oscuridad, para encontrar la concentración óptima de 2,4-D/KIN para el desarrollo de tejido calloso. La mayor producción de

biomasa. así como, la obtención de callo friable y con coloración se obtuvo a una concentración de 0.5 mg/l de 2,4-D y 0.1 mg/l de KIN, cuando el material se incubó en oscuridad. Se observó que cuando aumentó o disminuyó la concentración tanto de auxina como de citocinina, la producción de callo era afectada. De igual manera cuando el material se incubó en luz, la mayoría de los tejidos se necrosaron y en los que hubo respuesta el callo no era friable, la coloración del mismo fue mínima, además de una pobre producción de biomasa.

Para Amaranthus sp., en inóculos de hoja incubados en oscuridad, se observó inducción de tejido callosos friable y con mayor producción de biomasa en concentraciones de 1.5 mg/l de 2,4-D y 0.2 mg/l de BAP (Tabla VI.13). En este caso no se observaron zonas de coloración en el callo. Nuevamente fue evidente el efecto de la concentración de los reguladores del crecimiento sobre el desarrollo del callo y la producción de pigmento. Se obtuvieron respuestas mínimas en las otras 7 concentraciones probadas y no hubo respuesta cuando la concentración de 2,4-D y BAP fue de 0.5 y 0.05 mg/l respectivamente.

En Bougainvillea glabra con inóculos de brácteas para los fenotipos blanco y rojo, incubados en luz y oscuridad (Tabla VI.14), se observó producción de tejido calloso y desarrollo de biomasa a concentraciones de 1.5 mg/l de 2,4-D y 0.2 mg/l de BAP. Es importante hacer notar que aunque se observó respuesta en el fenotipo blanco a la concentración mencionada, ésta no fue buena, en comparación con la respuesta observada para el fenotipo rojo, donde los callos eran friables y con coloración. También al igual que en los dos bioensayos anteriores, la respuesta fue mínima en los demás tratamientos y nuevamente no se observó respuesta en la concentración más baja probada que fue de 0.5 mg/l de 2,4-D y 0.05 mg/l de BAP para ambos fenotipos y para el fenotipo blanco tampoco hubo respuesta a la concentración más alta probada que fue de 3.0 y 0.5 mg/l de 2,4-D y BAP.

TABLA VI.12.- RESPUESTA A DIFERENTE CONCENTRACION DE REGULADORES

2,4-D

mg/l		0.0		0.5		1.0		2.0		5.0	
		L	O	L	O	L	O	L	O	L	O
0.0	R	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	N	-	+	+	+	+	+	++	++	++	++
	C	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
0.05	R	+	-	+	+		-	++	++	+	+
	N	-	+	-	-		+	+	+	++	++
	C	-	-	-	+		+	-	-	-	-
0.1	R	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	N	+	-	++	-	+	-	++	++	++	++
	C	-	+	+	++	+	+	-	-	-	-
0.5	R	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	N	+	+	+	+	++	+	++	++	++	++
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.0	R	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
	N	++	+	++	+	++	+	++	++	++	++
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

EFFECTO DE LAS CONCENTRACIONES DE 2,4-D/KIN PROBADAS EN MEDIO MS PARA INOCULOS DE HOJA DE *Iresine lindenii*, INCUBADOS EN LUZ Y OSCURIDAD. REALIZANDO LA EVALUACION A LAS 4 SEMANAS.

R = RESPUESTA
+ = FORMACION DE CALLO
- = SIN FORMACION

N = NECROSAMIENTO
+ = NECROSIS
- = SIN NECROSIS

C = COLORACION
+ = CON COLORACION
- = SIN COLORACION

L = LUZ
O = OSCURIDAD

TABLA VI.13.- RESPUESTA A DIFERENTE CONCENTRACION DE REGULADORES

2,4-D

mg/l		0.5	1.5	3.0
B	0.05	R -	+	+
		N -	-	-
		C -	-	-
A	0.2	R +	++	+
		N -	-	-
		C -	-	-
P	0.5	R +	+	+
		N -	-	-
		C -	-	-

EFFECTO DE LAS CONCENTRACIONES DE 2,4-D/BAP PROBADAS EN MEDIO MS PARA INOCULOS DE HOJA DE *Amaranthus sp.* INCUBADAS EN OSCURIDAD, REALIZANDO LA EVALUACION A LAS 4 SEMANAS.

R = RESPUESTA
 + = FORMACION DE CALLO
 - = SIN FORMACION DE CALLO

N = NECROSAMIENTO
 + = NECROSIS
 - = SIN NECROSIS

C = COLORACION
 + = CON COLORACION
 - = SIN COLORACION

TABLA VI.14.- RESPUESTA A DIFERENTE CONCENTRACION DE REGULADORES

2,4-D

	mg/l	0.5				1.5				3.0				
		B		R		B		R		B		R		
		L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	
B	0.05	R	-	-	-	-	+-	+-	+-	+	-	-	+-	+
		N	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
		C	-	-	+-	+	-	-	+-	+	-	-	+-	+
A	0.2	R	+	+-	+	+	+	+	++	++	+-	+-	+	+
		N	+	-	+	-	+-	-	+	-	+	-	+	-
		C	-	-	+-	+	-	-	+-	+	-	-	+-	+
P	0.5	R	+	+-	+	+	+-	+-	+	+	-	-	+	+
		N	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-
		C	-	+	+-	+	-	-	+-	+	-	-	+-	+

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE 2,4-D/BAP EN MEDIO MS CON INOCULOS DE BRACTEAS DE Bougainvillea glabra INCUBADOS EN LUZ Y OSCURIDAD PARA EL FENOTIPO BLANCO Y ROJO EVALUANDO A LAS 4 SEMANAS.

R = RESPUESTA
 + = FORMACION DE CALLO
 - = SIN FORMACION DE CALLO

N = NECROSAMIENTO
 + = NECROSIS
 - = SIN NECROSIS

C = COLORACION
 + = CON COLORACION
 - = SIN COLORACION

L = LUZ
 O = OSCURIDAD

B = BLANCA
 R = ROJA

6.3.-RESULTADOS DEL ANALISIS QUIMICO DEL PIGMENTO.

En los extractos obtenidos se observó degradación del pigmento con el tiempo, lo que se vió reflejado como pérdida de coloración roja y aparición de coloración café en las muestras. Esto concuerda con lo reportado por von Elbe et.al. (1974), donde también observó la pérdida de coloración en diferentes soluciones de betanina. Ahora se sabe, de la presencia de una enzima decolorasa que degrada a las betacianinas. Lashley y Wiley (1979), reportaron que la enzima se encuentra en la porción interna de la pared celular. Debido a ésto se pensó en calentar los extractos a una temperatura tal que inactivara la enzima pero que no fuera un tratamiento tan drástico que degradara las betalainas ya que su estabilidad se afecta por calentamiento. De esta forma se logró determinar que era posible calentar los extractos en baño María a 80°C, durante 2 minutos, conservándose éstos hasta por un mes, sin concentrar, a una temperatura de 5 °C. Una vez lograda la estabilización del pigmento, se obtuvieron los espectros de absorción del material vegetal fresco para Iresine lindenii (Fig. VI.11) observándose una λ máx. a 539 nm. También se obtuvieron los espectros de Bougainvillea glabra, para el fenotipo púrpura (Fig. VI.12) con una λ máx. a 551 nm, para el fenotipo rojo (Fig. VI.13) con una λ máx. a 539 nm y para el fenotipo amarillo (Fig. VI.14) con una λ máx. a 478 nm.

Estos datos coinciden con los reportados por Piattelli y Minale (1964), quienes hicieron el análisis de betacianinas en 37 especies vegetales del Orden Centrospermae, entre las que se encuentran las especies del presente estudio.

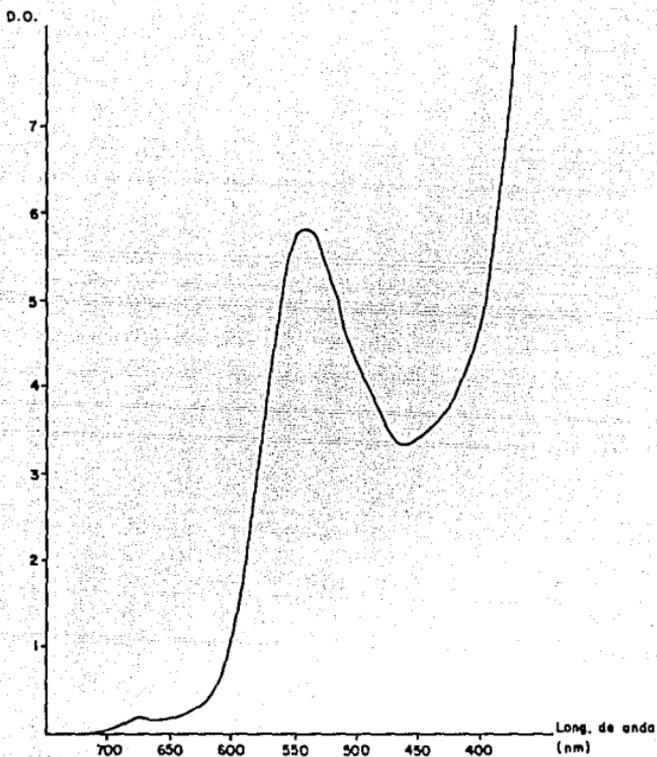


Fig. VI. II - Espectro de absorción de betocianinas, obtenido de material in-vivo de Iresine lindenii.

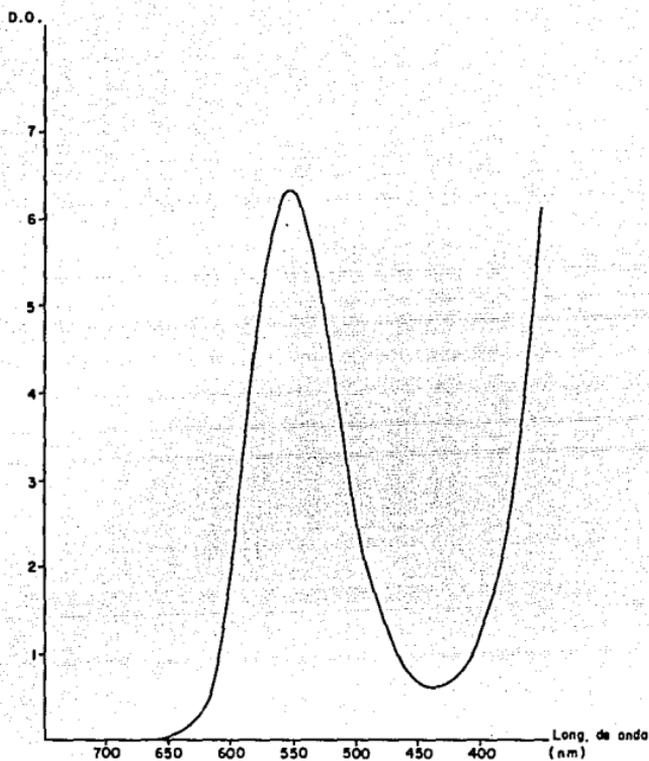


Fig. VI. 12.- Espectro de absorción de betaninas de Bougainvillea glabra, obtenido de material in-vivo del fenotipo púrpura.

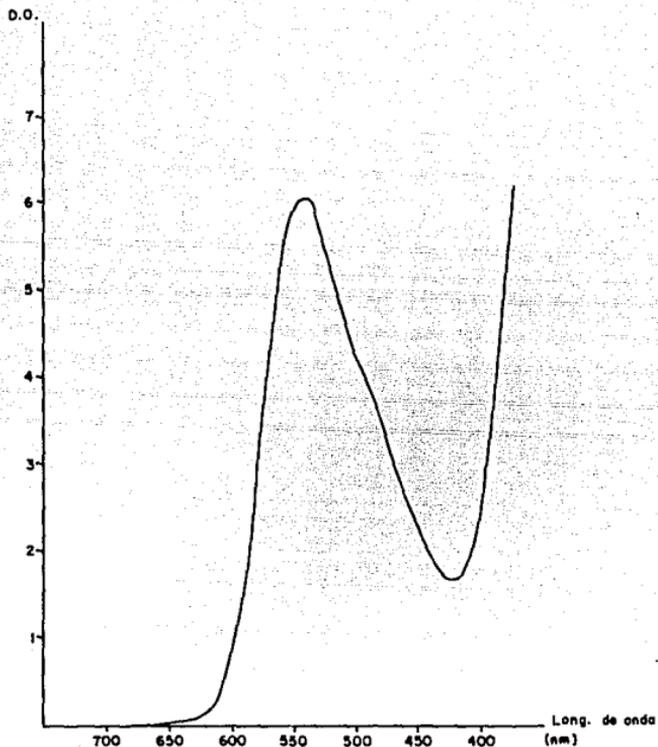


Fig. VI. 13.— Espectro de absorción de betaninas de Bougainvillea glabra, obtenido de material in-vivo del fenotipo rojo.

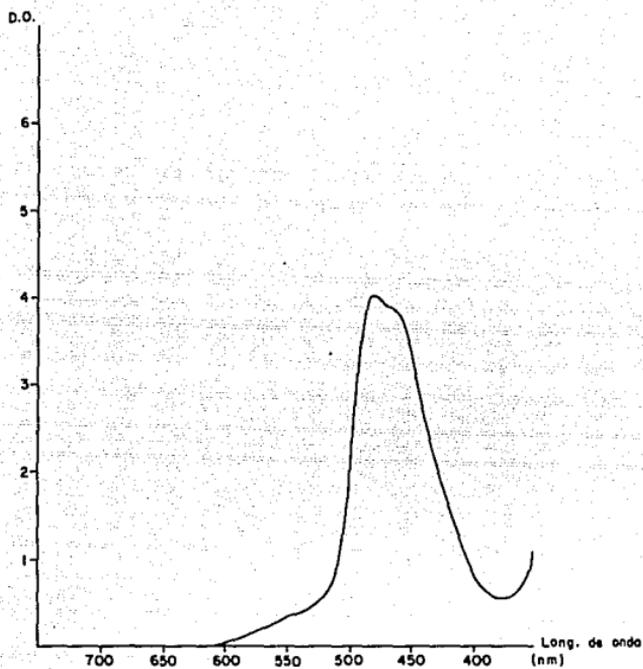


Fig. VI. 14. - Espectro de absorción de betaxantinas de Bougainvillea glabra, obtenido de material in-vivo del fenotipo amarillo.

6.4.-EFECTO DE LA LONGITUD DE ONDA SOBRE LA SINTESIS DE PIGMENTO.

Los bioensayos correspondientes para esta etapa se plantearon con el propósito de observar de qué manera las diferentes longitudes de onda, podían afectar la inducción de tejido calloso, así como, el efecto sobre la producción de biomasa. En ambos casos, la coloración en el callo fue un aspecto importante a considerar. Esto es, ver si con la inducción de callo había producción de pigmento, o si una vez desarrollados los callos se lograba inducir o aumentar la síntesis del pigmento incubándolos en diferentes longitudes de onda. En el caso de Iresine lindeni y Bougainvillea glabra, se obtuvieron callos que presentaban coloración cuando el material se incubó en condiciones de oscuridad (que era el lote control en todos los casos). Sin embargo, la sobrevivencia de los callos durante los subcultivos fue un punto crítico para poder llevar a cabo los experimentos correspondientes, ya que el tiempo de vida media de los callos era de solo 4 semanas. Se observó, el necrosamiento del callo independientemente de la longitud de onda en la cual se incubara el material. Incluso con el material incubado en oscuridad se pudo apreciar un punto máximo en la producción de tejido calloso a las 4 semanas y posteriormente la pérdida gradual de friabilidad y coloración, para finalmente producirse el necrosamiento del callo a la semana siguiente.

Debido a esto, se tuvo que seguir trabajando únicamente con los callos de Amaranthus sp. En la Tabla VI.15, se muestran los resultados correspondientes de respuesta a la inducción de callo y producción de biomasa, tanto para inóculos como para tejido calloso incubados a diferentes longitudes de onda. Se observó que hubo una respuesta a la producción de callo del 80 % cuando el material se incubó en luz naranja (480-490 nm), al igual que en luz amarilla (435-480 nm). Así mismo, la menor respuesta se observó en los inóculos incubados en luz azul (580-595 nm), siendo ésta del 40 % . Sin embargo, el porcentaje de respuesta a la inducción de callo más alto que fue del 90 % . se observó en condiciones de oscuridad que era el lote control.

TABLA VI.15.- RESPUESTA A LA LONGITUD DE ONDA

LONGITUD DE ONDA	RESPUESTA (%)	PESO FRESCO (g)	COLORACION
ROJO	70	9.20	-
NARANJA	80	7.16	-
AMARILLO	80	4.14	-
VERDE	60	8.26	-
AZUL	40	8.77	-
OSCURIDAD (CONTROL)	90	4.90	-

EFFECTO SOBRE LA INDUCCION DE CALLO Y PRODUCCION DE BIOMASA, EN INOCULOS DE HOJA DE *Amaranthus* sp., EVALUANDO A LAS 4 SEMANAS.

En cuanto a la producción de biomasa, esta se midió como peso fresco del callo, observándose la mayor producción de biomasa cuando los callos se incubaron en luz roja (490-560 nm) y la menor, cuando se incubaron en luz amarilla (435-480 nm).

Cabe recordar que, son mínimos los estudios realizados en cuanto a las condiciones de iluminación para la síntesis de pigmento en cultivo.

Con base en estos resultados, los callos de Amaranthus sp. se incubaron posteriormente en luz roja, con el fin de inducir un incremento en la producción de biomasa y posteriormente utilizarlos para los experimentos con manipulaciones del medio de cultivo.

6.5.-MANIPULACION DE LOS NUTRIENTES DEL MEDIO DE CULTIVO.

Los nutrientes desempeñan un papel importante tanto para el crecimiento celular como para la producción de metabolitos secundarios. De tal forma que los mecanismos de consumo de nutrientes por células vegetales, tienen importantes consecuencias sobre la velocidad de crecimiento y productividad celular (Staba, 1980).

Existen diversos trabajos acerca de los efectos del suministro de nutrientes sobre la síntesis y acumulación de metabolitos secundarios, donde el efecto de los nutrientes ha sido asociado con una alteración en la velocidad de crecimiento de las células cultivadas, aunque los mecanismos de regulación no sean aún claros.

Lindsey, (1985) (citado por Jaramillo, 1990) propone, que el efecto de los nutrientes sobre la actividad metabólica secundaria puede actuar alterando la actividad de las vías metabólicas primarias. Desde un punto de vista práctico, la manipulación de los nutrientes permitiría variar la velocidad de división celular que induciría la síntesis del metabolito deseado.

En los callos de Amaranthus sp., no se observó síntesis de pigmento con los experimentos anteriores, por eso se planteó hacer la manipulación de los nutrientes del medio y al mismo tiempo

estudiar el efecto de la luz, incubando el material en luz blanca, en luz roja (por ser la longitud de onda en la que se produjo incremento en la producción de biomasa) y en oscuridad (que fue el lote control en todos los casos), para tratar de inducir la síntesis de pigmento.

El cálculo de la concentración de pigmento en el callo se hizo de acuerdo a la curva tipo para betalainas (consultar el apéndice) obtenida de betabel, (Beta-vulgaris), debido a que esta especie sintetiza tanto betacianinas como betaxantinas, calculada con base en el coeficiente de extinción molar y leyendo al espectro a 540 nm en todos los casos.

6.5.1.-EFECTO DE LA CONCENTRACION DE FOSFORO.

El fósforo es importante como parte estructural de compuestos tales como ácidos nucleicos y fosfolípidos. Además, el fósforo desempeña una función indispensable en el metabolismo energético; la elevada energía de la hidrólisis del pirofosfato y diversos enlaces de fosfato orgánico, se utilizan para impulsar reacciones químicas. De ahí la importancia de probar diferentes concentraciones de la fuente de fósforo en el medio para inducir la síntesis de pigmento.

En este bioensayo, cuando el material se incubó en luz blanca (Fig. VI.15), se observó que la mayor concentración de pigmento fue de 0.46 mg, a una concentración de KH_2PO_4 de 170 mg/l, con un desarrollo celular de 4.3 g. Con el material incubado en luz roja (Fig. VI.16), se observó que la producción de pigmento se incrementó a 0.80 mg, nuevamente a 170 mg/l de KH_2PO_4 con un desarrollo celular de 2.12 g. En los resultados correspondientes para oscuridad (Fig. VI.17), se observó producción de pigmento de 0.73 mg a concentración de 100 mg/l de la fuente de fósforo, con un desarrollo celular de 4.97 g, siendo en luz roja donde se obtuvo la mayor producción de pigmento a la concentración de fósforo que se utiliza en el medio MS. Sin embargo, también fue en luz roja donde se observó el menor desarrollo celular. En este caso, se esperaba obtener mayor desarrollo celular pero no fue

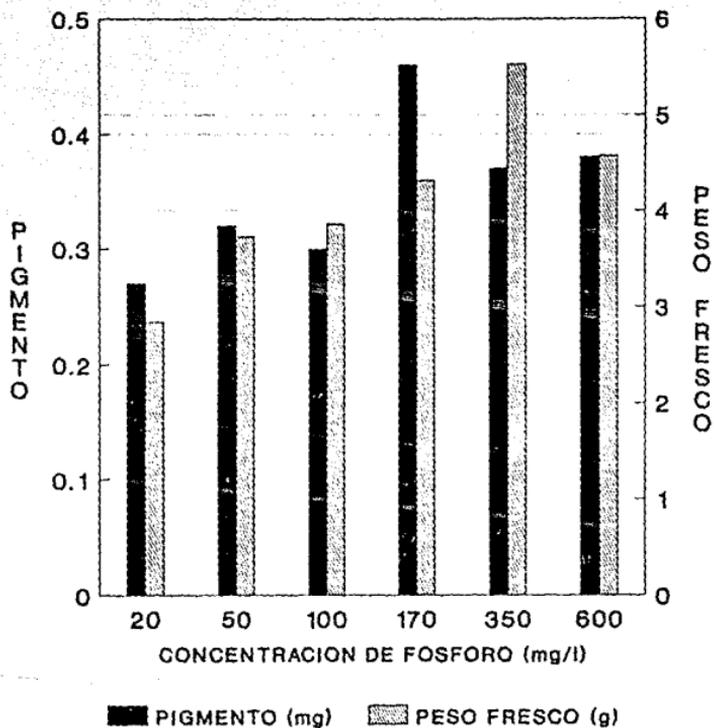


FIG.VI.15.-EFECTO SOBRE LA ACUMULACION DE PIGMENTO Y PRODUCCION DE BIOMASA, EN CALLOS DE *Amaranthus sp.* EN LUZ BLANCA.

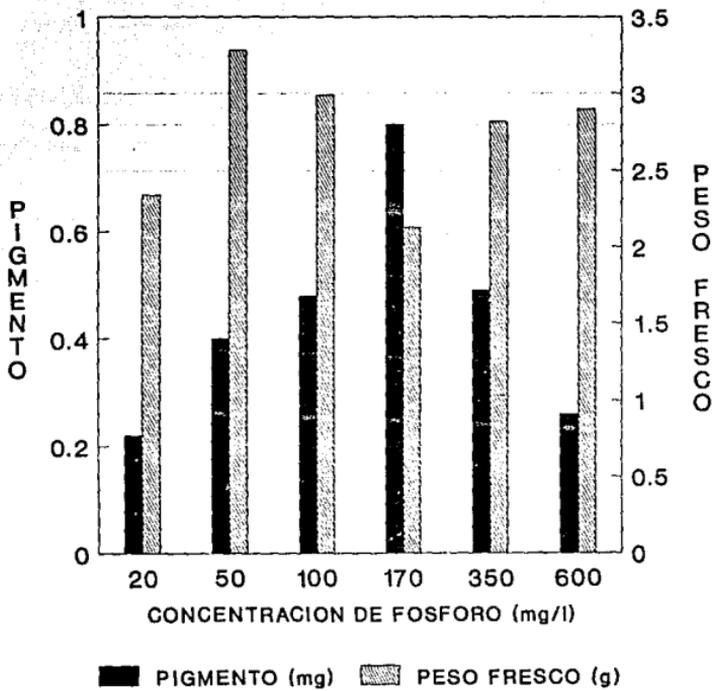


FIG.VI.16.-EFECTO SOBRE LA ACUMULACION DE PIGMENTO Y PRODUCCION DE BIOMASA, EN CALLOS DE *Amaranthus* sp. EN LUZ ROJA.

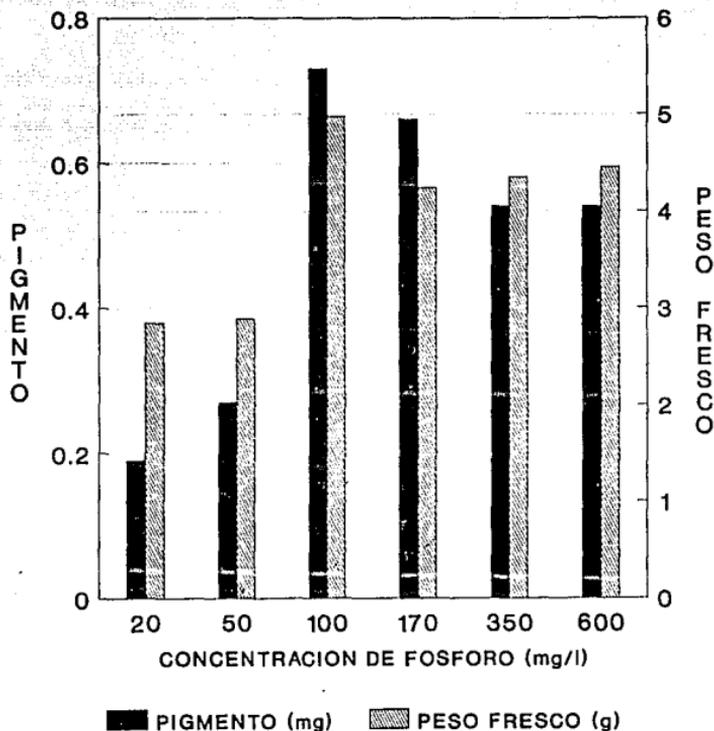


FIG.VI.17.-EFECTO SOBRE LA ACUMULACION DE PIGMENTO Y PRODUCCION DE BIOMASA, EN CALLOS DE *Amaranthus* sp. EN OSCURIDAD.

así. Esto se debe a que existe una relación inversa entre la síntesis del metabolito y la producción de biomasa, es decir, si hay incremento en la síntesis de pigmento disminuye la producción de biomasa y viceversa, si disminuye la síntesis de pigmento hay incremento en la producción de biomasa.

En el trabajo realizado con cultivos de Vitis (Yamakawa, 1983), observó que el desarrollo celular aumentó significativamente con el incremento en fosfato, mientras que, la cantidad de antocianina disminuyó en altas concentraciones de fosfato. Sin embargo, con Amaranthus sp., el mayor desarrollo celular se obtuvo en una baja concentración de fósforo, mientras que, la síntesis de pigmento aumentó a una concentración intermedia de fósforo.

6.5.2.-EFECTO DE LA CONCENTRACION DE CALCIO.

Con el material incubado en luz blanca (Fig. VI.18), se observó una producción de pigmento de 0.41 mg a una concentración de 330 mg/l de CaCl_2 , con un desarrollo celular de 3.1 g. En luz roja (Fig. VI.19), se obtuvo producción de pigmento de 0.74 mg nuevamente con 330 mg/l, con un desarrollo celular de 2.8 g. Finalmente en oscuridad (Fig. VI.20), se observó que la síntesis de pigmento fue de 0.41 mg, con desarrollo celular de 3.2 g. El tratamiento con luz roja, fue el que indujo mayor síntesis de pigmento a la concentración de cloruro de calcio utilizada en el medio MS. También en este bioensayo, se obtuvo el menor desarrollo celular a la concentración que indujo incremento en la síntesis de pigmento, a pesar de que el material fue incubado a la longitud de onda que producía mayor biomasa.

En este caso, el incremento en la síntesis de pigmento puede atribuirse entonces al efecto de la concentración del cloruro de calcio. Cabe recordar que el movimiento de iones y su transporte a través de membrana, implica problemas particulares, debido a que generalmente los iones presentan muy baja permeabilidad. Las fuerzas que actúan sobre iones que incluyen gradientes de potencial eléctrico, o gradientes de potencial de carga, son de

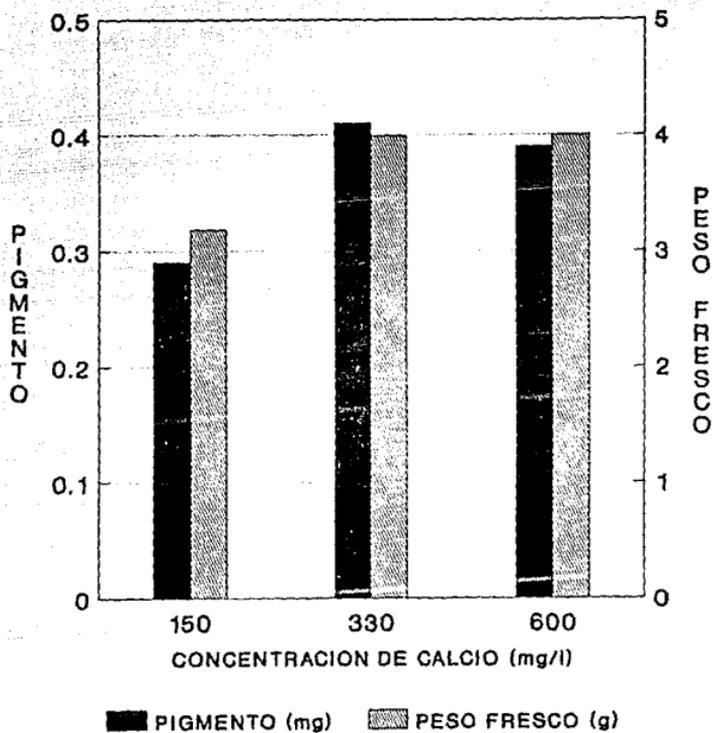


FIG.VI.18.-EFECTO SOBRE LA ACUMULACION DE PIGMENTO Y PRODUCCION DE BIOMASA, EN CALLOS DE *Amaranthus* sp. EN LUZ BLANCA.

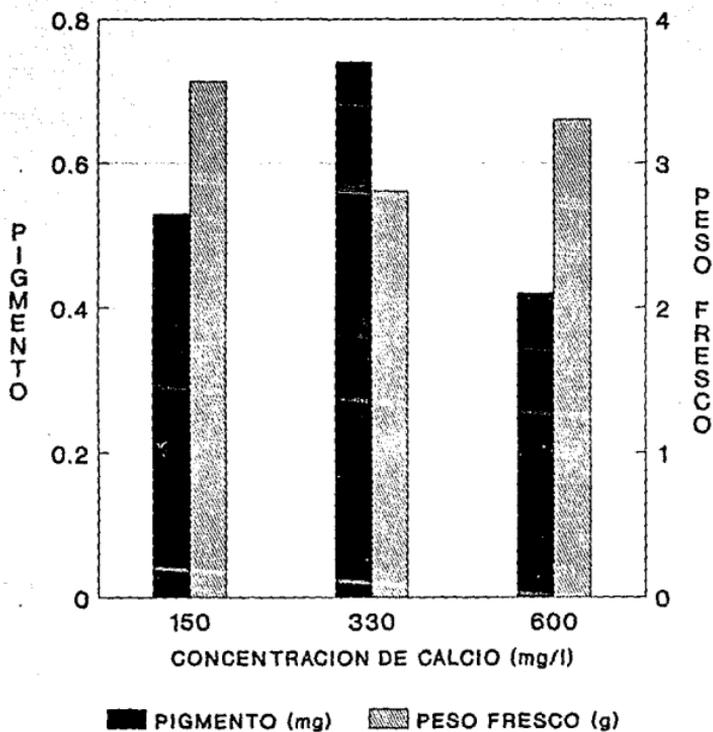


FIG.VI.19.-EFECTO SOBRE LA ACUMULACION DE PIGMENTO Y PRODUCCION DE BIOMASA, EN CALLOS DE *Amaranthus sp.* EN LUZ ROJA.

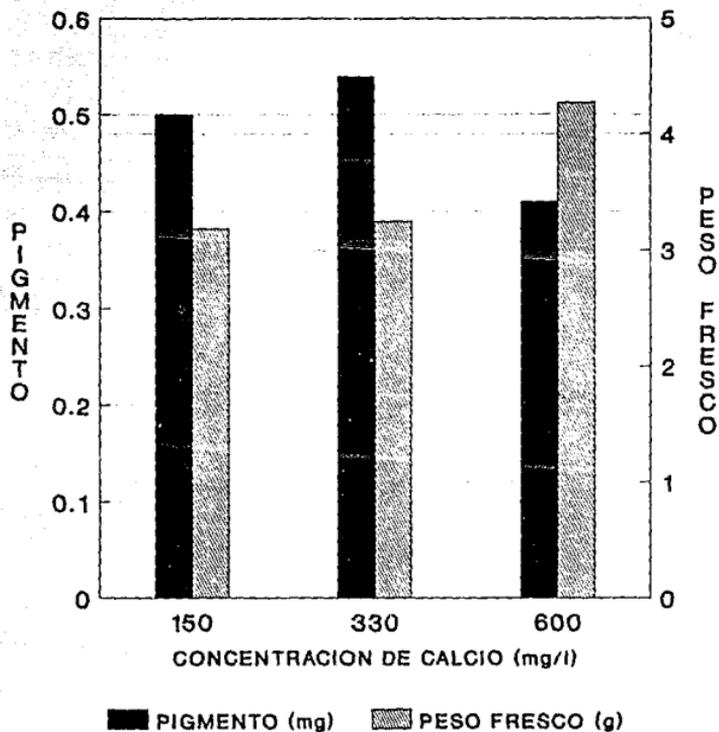


FIG.VI.20.-EFECTO SOBRE LA ACUMULACION DE PIGMENTO Y PRODUCCION DE BIOMASA, EN CALLOS DE *Amaranthus sp.* EN OSCURIDAD.

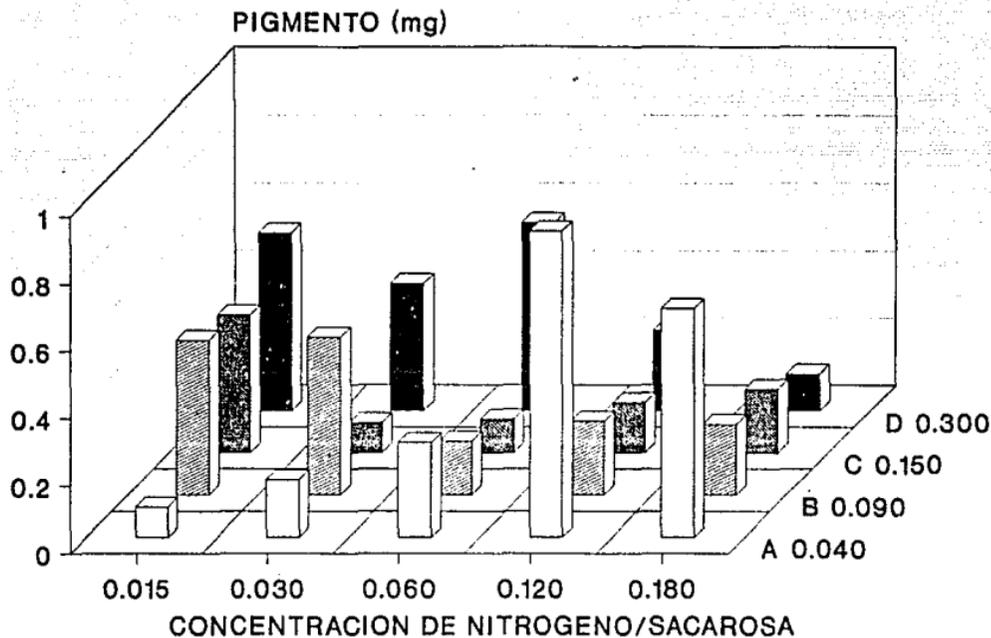
suma importancia, porque sus movimientos están influidos tanto por distribución de carga como por concentración. Además el movimiento de un ion influye automáticamente sobre el patrón de carga del sistema, de modo que el movimiento de otros iones se ve afectado sin importar el signo de sus cargas. En consecuencia, el movimiento activo de iones puede llevarse a cabo por la generación de gradientes eléctricos y viceversa. Además de los iones, se presenta el transporte activo de otras sustancias. Los azúcares y otros compuestos orgánicos para los cuales las membranas son relativamente impermeables, son absorbidas. El transporte activo ocurre a través de muchas membranas intracelulares, hacia adentro y hacia afuera de mitocondrias, cloroplastos y otros organelos, así como a través del retículo endoplásmico. Actuando tal vez de este modo sobre las diversas rutas metabólicas, induciendo la síntesis del pigmento.

6.5.3.-EFECTO DE LA CONCENTRACION DE LA RELACION CARBONO/NITROGENO

La fuente de carbono más importante para la obtención de energía por células vegetales en cultivo, es la sacarosa, mientras que el nitrato, es la fuente de nitrógeno que más fácilmente absorbe la planta. El suministro de nitrógeno es sumamente importante por ser un constituyente de proteínas y ácidos nucleicos. Mediante la entrada de sacarosa en el metabolismo respiratorio se obtiene energía por una parte, e intermediarios para el metabolismo de síntesis por otra.

Las líneas principales del metabolismo del carbono y el nitrógeno constituyen conjuntamente la totalidad integrada de la fotosíntesis, fotorrespiración y respiración.

En el presente bioensayo se observó que en luz blanca (Fig VI.21), la producción de pigmento fue de 0.91 mg, en la concentración de sacarosa (0.040 M) más baja probada y una concentración relativamente alta de NH_4NO_3 (0.120 M). El desarrollo celular fue de 2.5 g. En este caso, el desarrollo celular más bajo (1.0 g) se obtuvo en la concentración más alta (0.300 M) de sacarosa. En luz roja (Fig VI.22), la producción de



**FIG.VI.21.-EFECTO SOBRE LA ACUMULACION
 DE PIGMENTO Y PRODUCCION DE BIOMASA EN
 CALLOS DE *Amaranthus* sp. EN LUZ BLANCA**

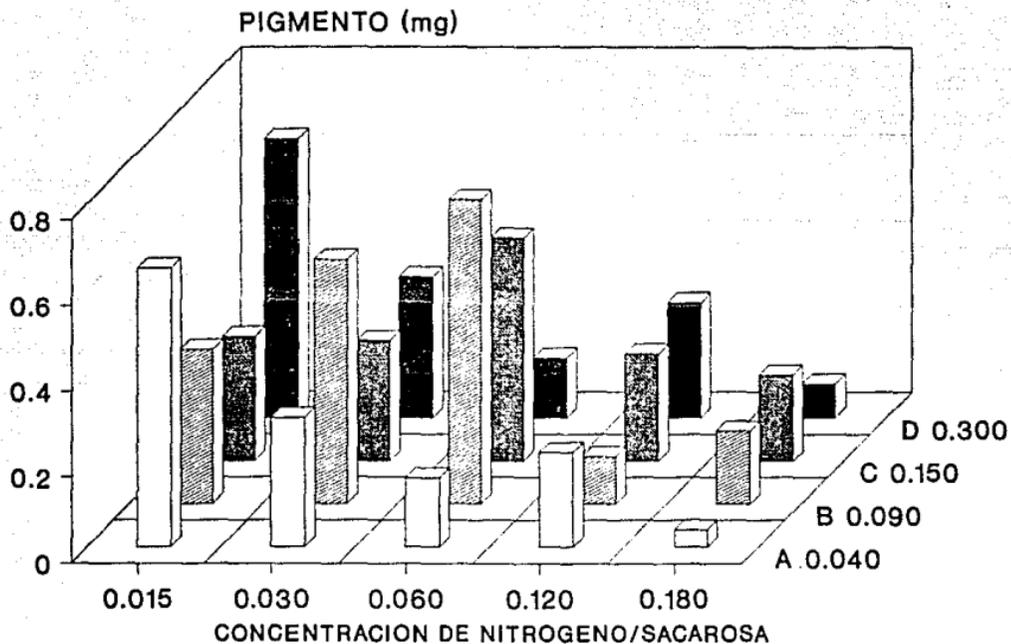


FIG.VI.22.-EFECTO SOBRE LA ACUMULACION DE PIGMENTO Y PRODUCCION DE BIOMASA, EN CALLOS DE *Amaranthus* sp. EN LUZ ROJA.

pigmento fue de 0.71 mg, en concentraciones intermedias de sacarosa (0.090 M) y de NH_4NO_3 (0.060 M), con un desarrollo celular de 5.1 g, que fue el valor más alto obtenido. Nuevamente, el menor desarrollo celular se observó en la concentración más alta de sacarosa. En oscuridad (Fig VI.23), se observó una producción de pigmento de 0.86 mg, en una concentración de 0.300 M de sacarosa y 0.120 M de NH_4NO_3 . El desarrollo celular fue de 1.16 g.

El medio utilizado en éste bioensayo, contenía ion amonio y ion nitrato en proporción molar de 1:1 . Se observó, en términos generales que el efecto de la concentración de sacarosa dependió de la concentración de nitrógeno.

Yamakawa (1983), reportó que en las más bajas concentraciones de sacarosa (0.040 ó 0.090 M) y la más baja concentración de nitrógeno se producía la cantidad más alta de antocianinas. Sin embargo, cuando los callos se incubaron por más tiempo en presencia de 0.06 M ó 0.12 M de nitrógeno, con una alta concentración de sacarosa (0.300 M) se producía incremento en la producción de antocianinas.

De acuerdo con lo anterior, en Amaranthus sp., se obtuvo la mayor producción de pigmento también en la concentración más baja de sacarosa pero a una concentración relativamente alta de nitrógeno, cuando el material se incubó en luz blanca.

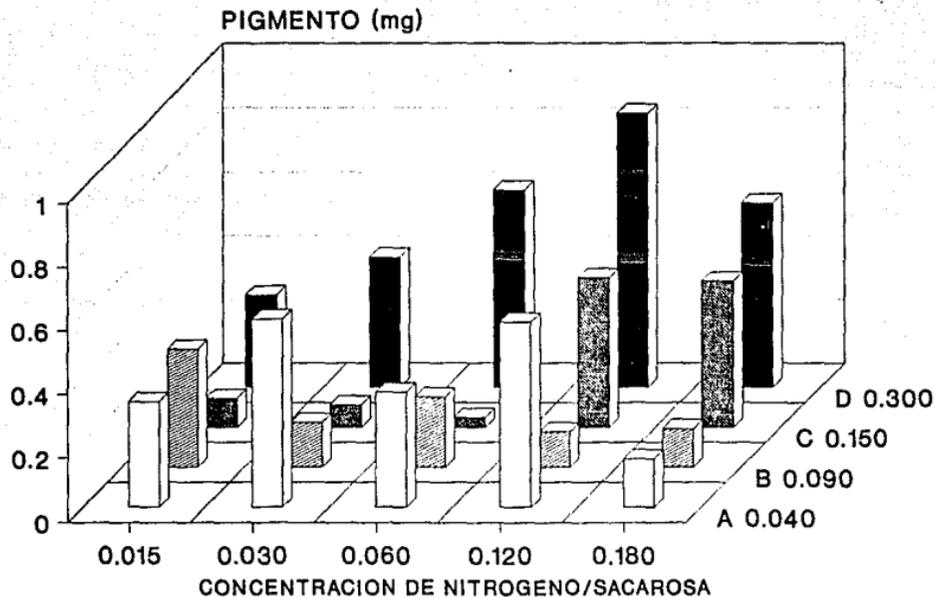


FIG.VI.23.-EFECTO SOBRE LA ACUMULACION DE PIGMENTO Y PRODUCCION DE BIOMASA, EN CALLOS DE Amaranthus sp. EN OSCURIDAD.

6.5.4.-EFECTO DE LA CONCENTRACION DE NaCl.

En luz blanca (Fig. VI.24), la producción de pigmento fue de 0.52 mg a una concentración de 1.5 % de NaCl, que fue la concentración más alta probada. En este caso, el desarrollo celular fue de 1.3 g. En luz roja (Fig. VI.25), la producción de pigmento fue de 0.96 mg a una concentración de 0.1 % de NaCl, que fue la concentración más baja probada. El desarrollo celular fue de 4.4 g. Estos valores son los más grandes, tanto para síntesis de pigmento, como para producción de biomasa, obtenidos en este bioensayo. En oscuridad (Fig. VI.26), la producción de pigmento fue de 0.70 mg a una concentración de 1.0 % de NaCl con un desarrollo celular de 1.4 g.

El estres salino influye sobre la síntesis de betacianinas, dado que los agentes empleados para inducir tales condiciones, modifican el estado termodinámico del agua, mismo que es más importante que la cantidad de agua disponible. El cloro y el sodio son dos de los iones que causan problemas osmóticos y que presentan una especificidad iónica tóxica (Fitter, 1987 citado por Velázquez, 1990). El efecto que estos iones tienen sobre el metabolismo celular, es por una competencia en la interacción de los mismos, es decir, el transporte mediado por competidores, por ejemplo, Na y K ó Na y Cl. Entre otros mecanismos es posible mencionar el ajuste osmótico, durante el cual las células vegetales aumentan el contenido de solutos, por síntesis o por transporte de iones y metabolitos al interior de las células, con lo que logra un potencial menor al de los solutos y por consiguiente tienden a absorber agua (Fitter, 1987 citado por Velázquez, 1990).

Se observó que la mayor producción de pigmento se logró en la concentración de NaCl más baja probada y esto pudo ser influenciado por las características de toxicidad iónica que provoca el cloruro de sodio, más que por el estres hídrico que produce el mismo. Sin embargo, en las otras condiciones de incubación (luz blanca y oscuridad), la producción de betacianinas se obtuvo en altas concentraciones de NaCl.

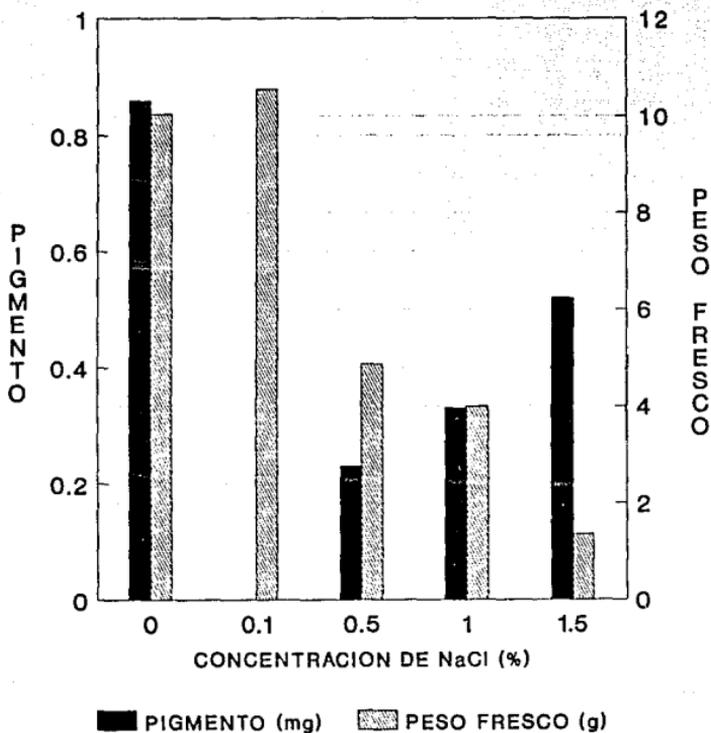


FIG.VI.24.-EFECTO SOBRE LA ACUMULACION DE PIGMENTO Y PRODUCCION DE BIOMASA, EN CALLOS DE *Amaranthus* sp. EN LUZ BLANCA.

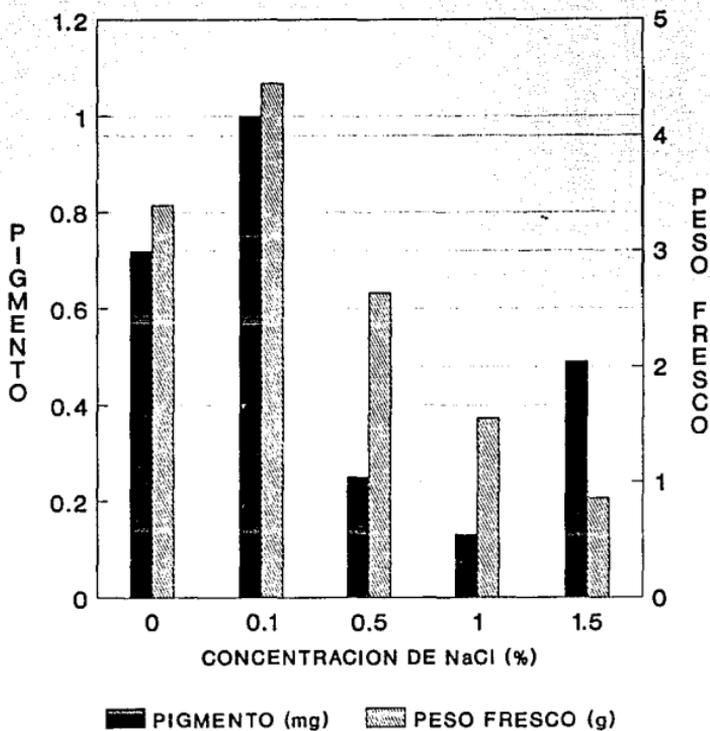


FIG.VI.26.-EFECTO SOBRE LA ACUMULACION DE PIGMENTO Y PRODUCCION DE BIOMASA, EN CALLOS DE *Amaranthus* sp. EN LUZ ROJA.

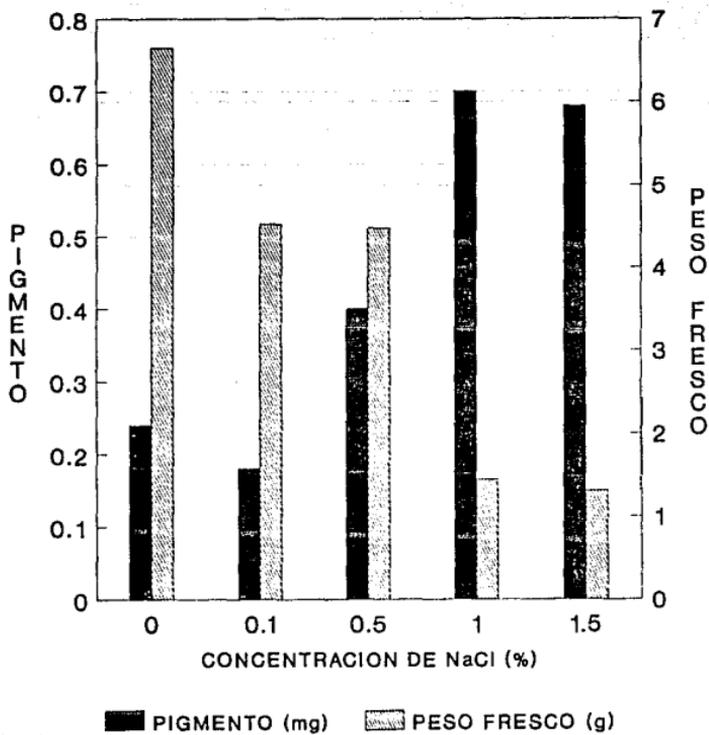


FIG.VI.26.-EFECTO SOBRE LA ACUMULACION DE PIGMENTO Y PRODUCCION DE BIOMASA, EN CALLOS DE *Amaranthus* sp. EN OSCURIDAD.

6.5.5.-EFECTO DE LA CONCENTRACION DE MANITOL.

En luz blanca (Fig. VI.27), la producción de pigmento fue de 0.54 mg, a una concentración de 17 % de manitol, que fue la concentración más alta probada, observándose un desarrollo celular de 2.8 g. En luz roja (Fig. VI.28), se obtuvo una producción de pigmento de 0.69 mg, nuevamente a la concentración de manitol más alta (17 %), con un desarrollo celular de 1.7 g. En oscuridad (Fig. VI.29), se observó que la producción de pigmento fue de 0.70 mg, con una concentración de 17 % de manitol y un desarrollo celular de 0.9 g.

En este bioensayo observamos que la mayor concentración de manitol, fue la que indujo incremento en la síntesis de pigmento en las diferentes condiciones de cultivo, sin embargo, en oscuridad fue donde se obtuvo la mayor producción de pigmento, aunque también el menor desarrollo celular.

Diversos autores como Elliott (1979), Mabry (1980) y Piattelli y Minale (1964), han advertido que las variaciones en la concentración de betacianinas en los tejidos vegetales, observados a lo largo de sus experimentos, son el resultado de la variación de diversos factores, teniendo el agua un papel importante entre estos. Debido a que el manitol es un azúcar, al agregarse al medio en grandes cantidades se produce un gradiente osmótico, donde se crea un flujo de agua de la región de alto potencial (célula vegetal), hacia la región de potencial más bajo (medio de cultivo), produciéndose un estres hídrico en las células vegetales que provoca una respuesta hacia la formación del pigmento.

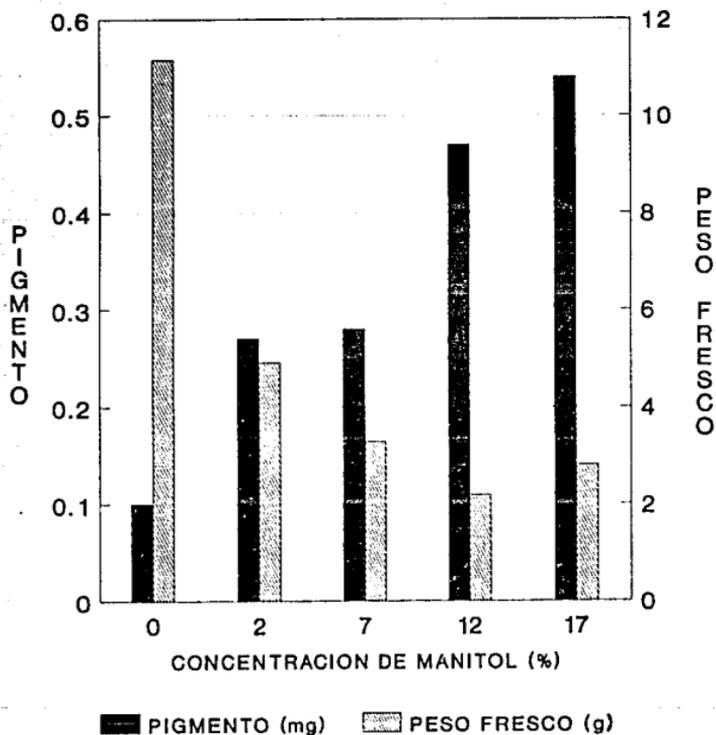


FIG.VI.27.-EFECTO SOBRE LA ACUMULACION DE PIGMENTO Y PRODUCCION DE BIOMASA, EN CALLOS DE Amaranthus sp. EN LUZ BLANCA.

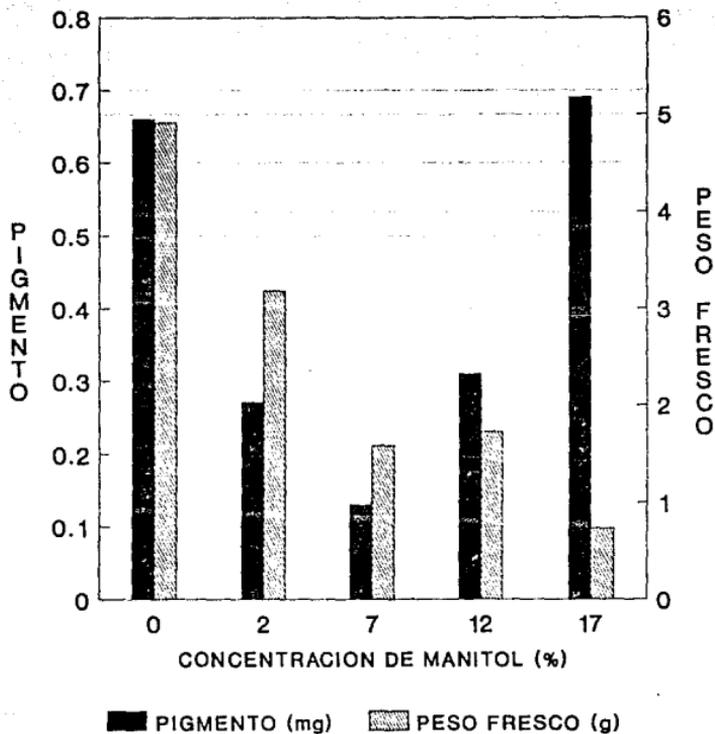


FIG.VI.28.-EFECTO SOBRE LA ACUMULACION DE PIGMENTO Y PRODUCCION DE BIOMASA, EN CALLOS DE *Amaranthus* sp. EN LUZ ROJA.

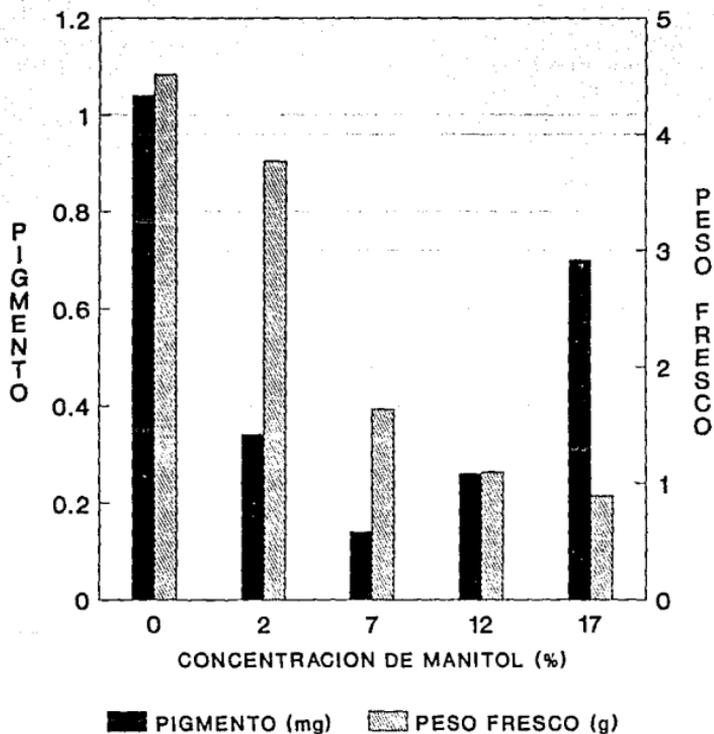


FIG.VI.29.-EFECTO SOBRE LA ACUMULACION DE PIGMENTO Y PRODUCCION DE BIOMASA, EN CALLOS DE *Amaranthus* sp. EN OSCURIDAD.

VII CONCLUSIONES

Se encontró que la respuesta a la inducción de callo es favorecida por 2,4-D y KIN en Iresine lindenii y con 2,4-D y BAP para Amaranthus sp. y Bougainvillea glabra.

La concentración de auxina y citocinina afecta esta respuesta, observándose un óptimo para la producción de tejido calloso.

En general, se observó que cuando el material se incubó en condiciones de oscuridad, se indujo formación de tejido calloso con coloración.

También se indujo incremento en la producción de biomasa cuando los callos se incubaron en luz roja (490-560 nm).

Mediante la metodología establecida en el laboratorio fue posible hacer el análisis químico de los pigmentos tanto del material in-vivo como del material en cultivo.

En las manipulaciones con fósforo y calcio se obtuvo síntesis de pigmento en las concentraciones empleadas para el medio MS (170 y 330 mg/l respectivamente), incubando el material en luz roja.

En la relación carbono/nitrógeno la mayor síntesis de pigmento se obtuvo en la concentración más baja de sacarosa (0.040 M) con una concentración de nitrógeno de 0.120 M, cuando los callos se incubaron en luz blanca.

Cuando se emplearon agentes osmóticos se observó que las altas concentraciones de NaCl y Manitol indujeron incremento en la síntesis de pigmento, incubando los callos en oscuridad.

De todas las condiciones de cultivo la que dió mejor resultado para la síntesis de pigmento (0.96 mg) y producción de biomasa (4.4 g) fue cuando el material se incubó en 0.1 % de NaCl en luz roja.

En general, cuando se indujo incremento en la síntesis de pigmento se observó decremento en la producción de biomasa, por lo que, no siempre la mejor concentración para obtención de pigmento, es la óptima para obtener biomasa.

B I B L I O G R A F I A

Bauernfeind, J.C.(1981). In "Carotenoids as colorants and vitamin A precursors" . (Stewart, G.F., Schweigert, B.S. and Hawthorn, J. Eds.) Academic Press, Inc. pag 1-24.

Clydesdale, F.M.(1977). In "Current aspects of food colorants" (Furia, T.E. Ed.) CRC Press. pag. 1-17.

Chang, C., Kimler, L. y Mabry, T.J. (1974). Biogenesis of Betalamic Acid. *Phytochemistry*. 13, 2771-2775.

Chang, K.L. y Prather, J.W. (1978). Ultraviolet and visible absorption spectroscopy. In "Instrumental analysis". (Bauer, H., Christian, G. and O'Reilly, J. Eds.) Allyn and Bacon, Inc. pag 154-155.

Dougall, D.K. (1980). In "Plant tissue culture as a source of biochemicals". (Staba, E.J ed.) CRC Press. pag. 22-58.

Dougall, D.K. (1985). In "Biotechnology in plant science. Relevance to agriculture in the eighties". (Zaitlin, M., Day, P. and Hollaender, A. Eds.) Academic Press, Inc. pag. 179-191.

Elliott, C. D. (1979). Analysis of variability in the Amaranthus bioassay for cytokinins. *Plant Physiol*. 63, 269-273.

Fairweather, F.A. (1981). Food additives and cancer. *Proc. Nutr. Soc.* 40, 21-30.

Fowler, M.M. (1983). In "Plant biotechnology". (Mantell, S.H. y Smith, H. Eds.) Cambridge Univ., Press. pag. 4-37.

Ilker, R. (1987). In-vitro pigment production : An alternative to color synthesis. *Food technol.* 41 (4) : 70-72.

Jaramillo, L.P. (1990). "Selección de líneas celulares de Capsicum annuum y Capsicum chinense altamente productoras de capsaicinoides". Tesis Licenciatura. Biólogo. ENEP Zaragoza. UNAM.

Lashley, D. y Wiley, R.C. (1979). A betacyanine decolorizing enzyme found in red beet tissue. J. Food Sci. 44, 1568-1569.

Leclercq, E. (1985). Vegetables as Raw Materials in Biotechnological processing. Process Biochem. 20 (6) : 75-78.

López, G. (1985). "Obtención de colorantes rojos de origen natural a partir de betabel". Tesis Licenciatura. Químico. Facultad de Química. UNAM.

Mabry, T.J., Taylor, A. y Turner, B.L. (1963). The betacyanins and their distribution. Phytochemistry. 2, 61-64.

Mabry, T.J. (1980). Betalains. Encyclopedia of plant physiology. (Bell, E.A. and Charlwood, B.V. Eds.) Secondary plant products. 8, pag. 513-533.

Mantell, S.H., Matthews, J.A. y McKee, R.A. (1985). Principles of plant biotechnology. An introduction to genetic engineering in plants. Blackwell Scientific Publications. pag. 186-220.

Marmion, D.M. (1979). Handbook of U.S. colorants for foods, drugs and cosmetics. John Wiley Sons, Inc. pag. 15-27.

Meggos, H.N. (1984). Colors-key food ingredients. Special Report. Food technol. 38 (1) : 70-74.

Minale, L., Piattelli, M., De Stefano, S. y Nicolaus, R.A. (1966). Pigments of centrospermae-VI. Phytochemistry. 5, 1037-1052.

Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15 : 473-497.

Paredes, O. (1986). La biotecnología de plantas : una herramienta estratégica en los programas agroalimentarios de México. *Ciencia y Desarrollo.* 68 (12) : 27-43.

Pasch, J.H. and y von Elbe, J.H. (1975). Betalains as natural food colorants. *Food Prod. Dev.* 9 (9) : 38-45.

Piattelli, M. y Minale, L. (1964). Pigments of *Centropomae*- II. *Phytochemistry.* 3, 547-557.

Piattelli, M. e Imperato, F. (1970 a). Betacyanins from Bougainvillea. *Phytochemistry.* 9, 455-458.

Piattelli, M. e Imperato, F. (1970 b). Pigments of Bougainvillea glabra. *Phytochemistry.* 8, 2557-2560.

Piattelli, M. (1976). Betalains. In "Chemistry and biochemistry of plant pigments". (Goodwin, T. Ed.) Academic Press, Inc. pag 560-596.

Piattelli, M. (1981). The betalains : Structure, biosynthesis and chemical taxonomy. In "The biochemistry of plants : a comprehensive treatise" . (Conn, E. Ed.) Academic Press, Inc.(7) pag. 557-575.

Spears, K. (1988). Developments in food colourings : the natural alternatives. *Tibtech.* 6, 283-288.

Teutonico, R.A. y Knorr, D. (1984). Plant tissue culture : Food applications and the potential reduction of nutritional stress factors. *Food Technol.* 38 (2) : 120-127.

Velázquez, I. (1990). "Cambio en la concentración de betacianinas bajo estress hídrico y salino en Amaranthus sp." . Tesis licenciatura. Biólogo. Facultad de Ciencias. UNAM.

Villegas, L. (1979). " Estudio de los colorantes del betabel (Beta vulgaris) " . Tesis Licenciatura. Químico. Facultad de Química. UNAM .

von Elbe, J.H. (1977). The betalains. In "Current aspects of food colorants" . (Furia, T.E. Ed.) CRC Press. pag. 29-39.

von Elbe, J.H., Young M. and Amundson, C.H. (1974). Color stability of betanin. J. Food Sci. 39, 334-337.

Walford, J. (1980). Developments in food colours-1. Applied science publishers. pag. 255.

Weller, T.A. y Lasure, L.L. (1981). Betalains in beet root tissue culture. J. Food Sci. 47, 162-163.

Whitaker, R.J. y Evans, D.A. (1987). Plant biotechnology and production of flavor compounds. Food Technol. 41 (4) : 70-72.

Yamakawa, T. Kato, S. Ishida, K. Kodama, T. y Minoda, Y. (1983). Production of anthocyanins by Vitis cells in suspension culture. Agric. Biol. Chem. 47 (10) : 2185-2191.

Zenk, M.H. y Deus, B. (1982). Natural product synthesis by plant cell cultures. Plant Tissue Culture. 12, 391-394.

APENDICE A. Componentes nutricionales del medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962).

MACRONUTRIENTES.	CONCENTRACION (mg/l)
MgSO ₄ 7H ₂ O	370.0
NH ₄ NO ₃	1650.0
KNO ₃	1900.0
KH ₂ PO ₄	170.0
MICRONUTRIENTES.	
H ₃ BO ₃	6.2
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.5
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025
KI	0.88
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.025
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.25
MnSO ₄ H ₂ O	16.9
VITAMINAS	
Glicina	2.0
Acido nicotínico	0.5
Piridoxina HCl (B ₆)	0.5
Tiamina HCl (B ₁)	1.0
Mio-inositol	100.0

APENDICE B. Preparación del Hipoclorito de Calcio.

Hipoclorito de Calcio	4.0 g
Agua destilada	100.0 ml

Disolver con agitación constante y filtrar en papel.

APENDICE C. Preparación del medio de Murashige y Skoog con concentración de sales a la mitad.

Macronutrientes	50.0 ml
Micronutrientes	50.0 ml
Vitaminas	50.0 ml
CaCl ₂	5.0 ml
Fe EDTA	5.0 ml
Sacarosa	15.0 g
Reguladores del crecimiento	
Ajustar pH	5.8 ± 0.1
Agar	8.0 g

Aforar a 1 l

Esterilizar por 30 minutos en autoclave.

APENDICE D. Curva tipo para Betalainas, obtenida de Betabel (Beta-vulgaris).

