

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química

378

EFFECTO DEL MEDIO AMBIENTE EN LA PRODUCCION DE ANTOCIANINAS EN DISTINTAS VARIEDADES DE SORGO

T E S I S

Que para obtener el título de

Q U I M I C O

p r e s e n t a

Ma. de los Angeles Violana Gallegos Corona

México, D. F.

1975



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

CLAS. Tesis
ADQ. 1975
FECHA
PROC Mt. 117



QUIN:02

PRESIDENTE: Estela Sánchez de Jimenez
VOCAL: Guadalupe Vélez Pratt
SECRETARIO: John K. Gaunt
1er. Suplente: Bertha Soto de Villatoro
2o. Suplente: Magdalena Oliva Gonzalez

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Bioquímica, División de Estudios Superiores. Facultad de Química.

Nombre completo y firma del sustentante:

Ma. A. Violana Gallegos C.

Ma. de los Angeles Violana
Gallegos Corona

Nombre completo y firma del asesor del tema:



John K. Gaunt

Yo tenía necesidad de un pulmón me ha dicho el árbol, entonces mi savia se ha convertido en hoja para que pudiera respirar por ella. Luego cuando ha respirado mi hoja, ha caído y yo no - he muerto por ello. Mi fruto contiene todo mi - pensamiento sobre la vida.

A. Gide

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN LOS LABORATORIOS
DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA DE LA FACULTAD DE QUIMICA
DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

EXPRESO MI GRATITUD A LOS DOCTORES: JOAQUIN ORTIZ CERECERES
Y JOSUE KOHASHI , POR LAS FACILIDADES OTORGADAS PARA TRA _
BAJAR EN LOS LABORATORIOS DEL DEPARTAMENTO DE BOTANICA DE
LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE CHAPINGO.

A MI ASESOR, DOCTOR JOHN K. GAUNT , MI SINCERA ADMIRACION
Y RECONOCIMIENTO.

I N D I C E

	<u>Página</u>
INTRODUCCION	1
CONSIDERACIONES GENERALES	4
MATERIALES Y METODOS	28
RESULTADOS	39
CONCLUSIONES	57
APENDICE	61
BIBLIOGRAFIA	76

INTRODUCCION

En los años cuarentas, se empezaron a probar en México nuevos cultivos en varios ditritos de riego y temporal, encontrando que la pro ducción por hectárea era mejor para estos cultivos que la del maiz. Sin embargo, la falta de mercado para estas especies como son: mijo, gira - sol, soya y sorgo, hizo que su producción fuera esporádica. Solamente en el estado de Sinaloa, en sus tierras de temporal, el sorgo, también llamado "milo-maiz", tuvo cierta importancia.

En 1960, ya se registró oficialmente una producción de 210 mil toneladas de grano, sin contar con una importante producción consumida - como forraje verde.

El sorgo es un cultivo que no requiere de riego, su cultivo per mite el uso de zonas de poca precipitación pluvial, en donde el cultivo del maiz no puede alcanzar buenos rendimientos.

El sorgo ha adquirido gran importancia para la producción de ali mentos concentrados y equilibrados necesarios en establos y para la engor da de ganado vacuno de corral. El sorgo es de primera importancia como - sucedáneo del maiz, cuya producción en ocasiones resulta menor y a mayor costo, por lo que es una planta valiosa para combatir la pobreza de la po blación rural de las zonas semiáridas del país.

Recientemente, el cultivo del sorgo va ganando terreno y las ci fras por hectárea para su cultivo se han ido multiplicando. A pesar de que se utiliza semilla mejorada que ya se produce en la zona, se ha visto que aún falta perfeccionar el cultivo y mejorar la productividad en las re-

giones de siembra.

En los últimos años se ha desarrollado en el Colegio de Post-Graduados de Chapingo, un programa de mejoramiento de variedades de sorgo, para que se puedan tener buenos rendimientos bajo las condiciones ambientales de México. Para esto se busca que las variedades de sorgo puedan producir grano en climas fríos y que sean precoces, esto último es una característica importante en regiones en donde existen limitaciones en la disponibilidad de agua o el ciclo de lluvia es muy corto y hay la posibilidad de heladas tempranas, que pueden causar la pérdida de la cosecha.

El presente trabajo tiene como antecedente las observaciones - que se han hecho en el Colegio de Post-Graduados de Chapingo, sobre distintas variedades de sorgo. Estas observaciones se describen de la siguiente manera: algunas variedades de sorgo presentan la aparición en sus hojas de pigmentación roja, que se cree es debida a la síntesis de antocianinas en las plantas. Al mismo tiempo se ha observado una correlación entre la aparición del color en las hojas y el alargamiento del ciclo vegetativo, con respecto a otras variedades que no muestran la coloración.

Para seleccionar las semillas de sorgo para la siembra anual en Chapingo, se escogen variedades de las llamadas " precoces" (ciclo vegetativo corto), las cuales no han mostrado la producción de color rojo.

Se ha sugerido que este fenómeno puede estar relacionado con las bajas temperaturas nocturnas registradas durante las fechas de siembra y en las diferentes fases de desarrollo del sorgo en valles altos como los de México, ya que se cree, que las mismas variedades sembradas en ba-

jas altitudes no presentarían esta coloración.

Las antocianinas son pigmentos hidrosolubles que se encuentran en la savia vacuolar de las células vegetales. Se encuentran presentes en varias partes de la planta como: flores, frutos, semillas, raíces, etc, y en ocasiones en hojas, proporcionando colores como son: rojo, azul y violeta.

Las antocianinas se encuentran agrupadas dentro de un grupo de compuestos denominados flavonoides, los cuales derivan todos de una estructura química básica. La importancia de este grupo de flavonoides en plantas, en general no es conocida.

Se ha visto que la biosíntesis de antocianinas en vegetales depende en gran parte de prolongados períodos de irradiación a relativamente altas intensidades de luz. Existen otros parámetros que pueden afectar la síntesis de antocianinas como son: infecciones virales, daños físicos, temperaturas, etc.

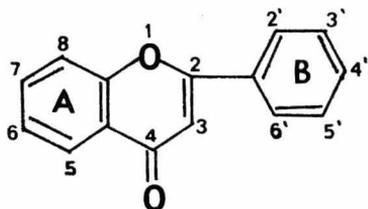
El objeto de este trabajo, es el de tratar de determinar los factores o parámetros ambientales que controlan la producción del pigmento en distintas variedades de sorgo, constituyendo así el primer paso para determinar la existencia de una relación bioquímica o fisiológica entre precocidad y aparición de antocianinas.

CONSIDERACIONES GENERALES

I ASPECTOS GENERALES DE PIGMENTOS FLAVONOIDES

La mayoría de los colores brillantes que se encuentran presentes en flores y frutos, se deben principalmente a la presencia de grupos de compuestos flavonoides. Sin embargo, el color también puede deberse a la presencia de otros pigmentos como son los carotenoides.

Los pigmentos flavonoides son una serie de compuestos fenólicos glucosilados, solubles en agua, que tienen una estructura básica común constituida por un esqueleto de 15 carbonos:



flavona 6 2-fenil cromona

Dentro de los flavonoides se agrupan varias clases de compuestos que difieren unos de otros sólo por el estado de oxidación en la posición C_3 . Existe un número limitado de estructuras como se muestra en la siguiente tabla:

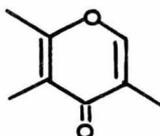
Nombre	Estructura en C_3
Flavan-3-ol	

Nombre	Estructura*en C ₃
Flavona	
Flavan-3,4-diol	
Dihidrochalcona	
Chalcona	
Flavanona	
Di-hidroxi-flavonol	
Antocianina	
Flavonol	

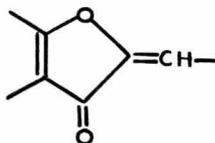
Nombre

Estructura en C₃

Isoflavona



Aurona



Sin embargo, aunque algunas clases de compuestos no poseen realmente el esqueleto básico, se han incluido en la clasificación de flavonoides ya que están relacionados química y biosintéticamente con los otros compuestos.

Los compuestos individuales de cada clase se distinguen entre sí, por el número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo que se encuentran arreglados de acuerdo a patrones restringidos en las moléculas de flavonoides, reflejando así los diversos orígenes biosintéticos de cada uno de los anillos aromáticos.

En el anillo A, la mayoría de los grupos hidroxilo están en las posiciones 5 y 7 o sólo en 7 y generalmente no metilados.

En el anillo B, se encuentran uno, dos o tres grupos hidroxilos o metoxilos en las posiciones: 3',4' y 5'.

En la mayoría de los casos, los compuestos flavonoides existen

como glicósidos en las plantas, esto es, uno o más de los grupos hidroxilos están unidos por una unión semiacetal con un azúcar. Los compuestos libres de azúcar, aunque su presencia ha sido reportada en plantas, es posible que se hayan producido durante su extracción. Swain (1965), reporta que muchos de los tejidos contienen glicosidasas muy activas - que pueden actuar aún en presencia de altas concentraciones de disolventes orgánicos.

La presencia de azúcares en la molécula da cierta solubilidad a los flavonoides dentro de la savia celular. Los azúcares encontrados en glicósidos de flavonoides incluyen simples hexosas y pentosas (monósidos), además bi y tri sacáridos (biósidos y triósidos respectivamente), siempre combinados en C_1 y generalmente por una unión β . El algunos casos pueden estar sustituyendo más de un grupo hidroxilo dando dimonósidos.

D-glucosa, sola o como parte de un disacárido es el azúcar más común en los glicósidos; D-galactosa y D-ramnosa son menos frecuentes, L-arabinosa y D-xilosa son raras.

En general los residuos de azúcar están unidos en las posiciones C_3 y C_5 . Se ha acostumbrado distinguir los glicósidos dándoles nombres triviales de acuerdo a las especies de donde derivan o fueron aislados por primera vez.

Se han encontrado también, flavonoides complejos o acilados derivados de los glicósidos, en los cuales se encuentran ácidos orgánicos como: ácido p-hidroxi benzoico, ácido malónico, ácido p-cumárico, ácido sinápico y en ocasiones también ácido acético unidos a la molécula

formando uniones éster con uno de los grupos hidroxilo del azúcar.

Los cuatro tipos de flavonoides que están relacionados directamente con la coloración de las plantas son: antocianinas, flavonoles, chalconas y auronas. La coloración de estos compuestos se debe a que absorben luz en la región visible del espectro (400 - 800 nm). La presencia de dobles ligaduras conjugadas y de grupos cromóforos y auxócromos promueven en estos compuestos la transición de electrones a niveles de mayor energía. En base a esto, los diferentes compuestos flavonoides presentan características especiales en sus espectros.

TABLA DONDE SE MUESTRAN LAS DIFERENCIAS DE LOS ESPECTROS DE DISTINTOS COMPUESTOS FLAVONOIDES.

Nombre	banda I λ max. (nm)	banda II λ max. (nm)
Flavanal-3-ol		275-280
Flavanonas	310-330	275-290
Flavonoles	330-350	250-270
Chalconas	360-390	240-260
Auronas	390-430	240-260
Antocianinas	475-560	275-280

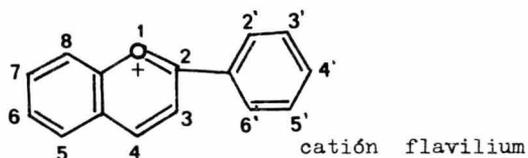
El aumento de hidroxilación tiene el efecto de aumentar la longitud de onda máxima de absorción, debido al aumento de electrones que no están formando enlaces, proporcionados por los grupos hidroxilos.

Su contribución dependerá de la posición de la sustitución. La acilación de estos grupos da como resultado un cambio en la longitud de onda máxima de absorción; la metilación o formación de glicósidos tiene un menor efecto. El espectro en todos los grupos de compuestos flavonoides es alterado cuando sus grupos hidroxilos están ionizados o cuando hay formación de quelatos con metales.

II NOMENCLATURA Y QUIMICA DE ANTOCIANINAS

El término de antocianinas fue propuesto inicialmente en 1835 por Marquart, para denominar el pigmento azul de la flor "cornflower" (Centaurea cyanus); más tarde se usó con un sentido más amplio para denominar a todo un grupo de pigmentos similares, ya que se encontró que los colores rojo y azul se manifiestan por un solo tipo de pigmento.

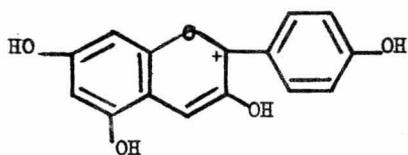
Willstätter y Everest (1913), establecieron que las antocianinas, la mayoría de las cuales se encuentran disueltas en la savia celular de flores, frutas y otros órganos de las plantas, pertenecen a un grupo de glicósidos con una estructura común establecida por primera vez por Willstätter (1915) y más tarde confirmada por Robinson (1932), siendo la estructura encontrada la de: 2-fenil benzopirilium o ión flavilium.



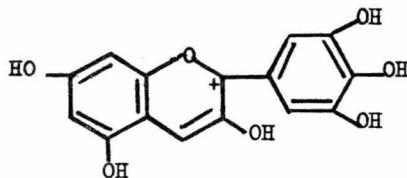
Las porciones libres de azúcar han sido nombradas antocianidinas (agliconas), de las agliconas que han sido aisladas de plantas se han encontrado presentes en forma común seis antocianidinas: pelargonidina, cianidina, peonidina, delfinidina, petunidina y malvidina.

Numerosas investigaciones han mostrado que el patrón de hidroxilación de antocianidinas naturales puede clasificarse dentro de tres grupos básicos de pigmentos: pelargonidina, cianidina y delfinidina;

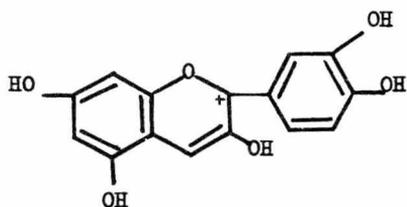
todas están hidroxiladas en las posiciones: 3, 5 y 7. Sus derivados metilados se encuentran comunmente en la naturaleza.



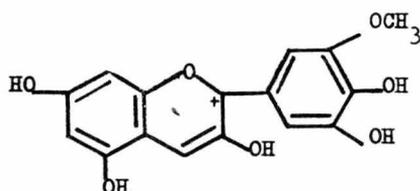
Pelargonidina



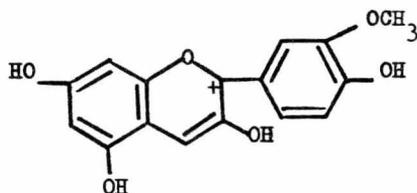
Delfinidina



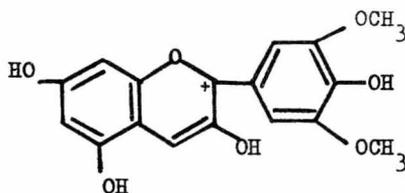
Cianidina



Petunidina



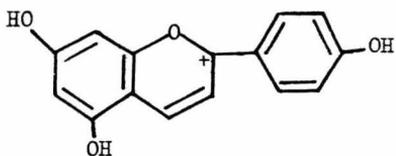
Peonidina



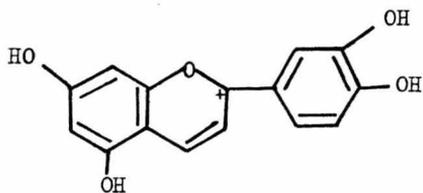
Malvidina

Se conocen en total doce antocianidinas, ocho de las cuales - tienen una estructura basada en las estructuras de: cianidina y delfinidina y las cuatro restantes basadas en la estructura de pelargonidina.

Las antocianidinas que carecen de grupo hidroxilo en la posición C₃ como son: apigeninidina y luteolinidina son muy raras.



Apigeninidina



Luteolinidina

Fong et al. (1974) reportan que las antocianinas aciladas no han sido investigadas como los pigmentos monoglucósidos. Sin embargo encontraron que el ácido acético puede estar acilando antocianinas - 3,5-diglucósidos. Sus investigaciones han demostrado que las antocianinas acetiladas son extremadamente lábiles y se descomponen rápidamente en presencia de ácidos minerales.

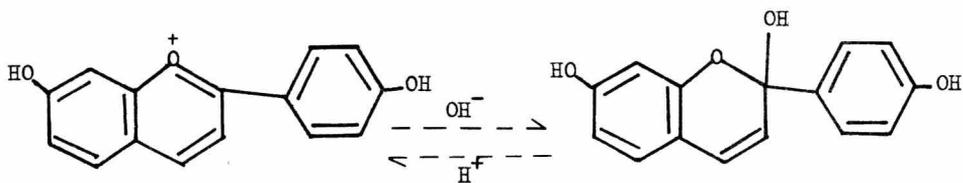
Los distintos tipos de antocianinas se dividen de acuerdo con el número de azúcares unidos y su posición, se han encontrado pocos di sacáridos y aún menos trisacáridos.

III EFECTOS SOBRE EL COLOR DE ANTOCIANINAS

El color visible de las antocianinas es dependiente del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo. El color varía desde:

amarillo-naranja - - - - - > azul
(Apigeninidina) (Delfinidina)

La intensidad del color también depende del pH, debido al carácter iónico de las antocianinas, conforme se va neutralizando mucho del pigmento se transforma en su forma incolora de pseudo-base:



Las soluciones de antocianinas son rojas en soluciones ácidas y azules en alcalinas. El pH de la savia celular de las plantas es con siderado un factor importante para la manifestación del color.

Muchos de los efectos del color son producidos por interacción de las antocianinas con otros pigmentos (in vivo), este fenómeno se conoce como co-pigmentación, en donde hay formación de complejos con otros pigmentos.

Las antocianinas también forman quelatos in vivo con iones metálicos teniéndose como resultado una pigmentación azulosa en flores.

Los requerimientos para formar un quelato y con ello tener un cambio de color de rojo a azul son:

- a) Antocianinas con grupo catecol
- b) Metal quelante (Al, Mg ó Mo)
- c) Un balance mineral interno que promueva la disponibilidad de los metales quelantes.

IV DISTRIBUCION E IMPORTANCIA DE ANTOCIANINAS EN PLANTAS

Las antocianinas están ampliamente distribuidas en la naturaleza, se les encuentra en:

Pétalos: en donde proporcionan colores como: rojo, azul, lila, etc.

Frutos: los glicósidos en frutos son más simples en estructura que los que se han determinado en flores.

Hojas: los flavonoles y flavonas son constituyentes comunes de hojas, pero no así las antocianinas. Sin embargo, su presencia ha sido observada en hojas de plantas jóvenes. Las antocianinas más comunes son los derivados 3-glicosídicos. Harborne (1965), reporta que la pelargonidina y delfinidina se encuentran con mucha frecuencia en flores, pero en general se encuentran ausentes en hojas pigmentadas, las cuales casi siempre contienen cianidina y sus derivados, en todos los estados de crecimiento de la planta.

Las antocianinas junto con la clorofila y carotenos, son los grupos coloridos considerables y característicos de las plantas superiores. Sin embargo, en algunas plantas las antocianinas son reemplazadas por betacianinas nitrogenadas.

Las antocianinas son los únicos flavonoides visibles en hojas, su contribución puede considerarse bajo tres tipos:

- 1) Pigmentos rojos formados transitoriamente en hojas jóvenes que desaparecen cuando éstas crecen.

2) En ocasiones se observa como pigmentación permanente de la hoja.

3) Coloración otoñal: dada por antocianinas y carotenos.

La coloración de antocianinas se ha observado en cierto género de plantas y se cree que su completo desarrollo es dependiente de factores climáticos.

La importancia de la presencia de flavonoides, en especial de antocianinas no es bien conocida. Se han sugerido las siguientes explicaciones para justificar su presencia:

a) Dar color a las flores y frutos con el fin de atraer a los animales e insectos y de esta forma asegurar la fertilización.

b) Debido a que los flavonoides están presentes en forma universal, es posible que a veces funcionen en las hojas como reguladores de crecimiento y también se cree que pueden ser inhibidores de la germinación.

c) Como una fuente de reserva de carbohidratos; las hojas jóvenes de muchas plantas superiores producen antocianinas que desaparecen rápidamente. La causa de la formación de antocianinas en esta etapa del desarrollo en hojas es posiblemente la acumulación de azúcares en los tejidos en cantidades en exceso a los requerimientos inmediatos de la planta para el crecimiento. De hecho, la síntesis de antocianinas en hojas parece estar bastante relacionada con el metabolismo de carbohidratos.

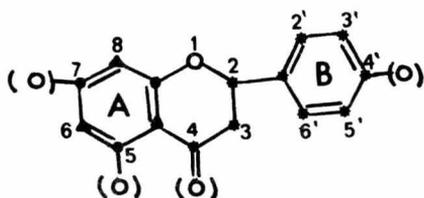
d) Otras condiciones que provocan la acumulación de antocianinas en hojas incluyen las infecciones debidas a hongos y virus. Su aparición se considera como un mecanismo de defensa desarrollado por la planta.

V BIOSINTESIS DE ANTOCIANINAS

Robinson (1921), postuló que los flavonoides derivan biogénicamente de dos unidades: $C_6 - C_3$ y C_6 (anillo A).

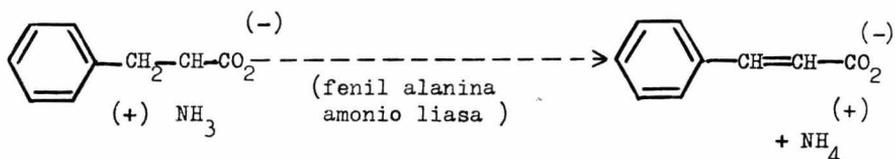
Birch y Donovan (1953), propusieron la hipótesis de que los flavonoides se obtenían de la unión de tres moléculas de acetato adicionadas a ácido cinámico o compuestos relacionados. Esta hipótesis hasta el momento se ha considerado correcta y a sido reforzada por trabajos posteriores hechos con precursores radioactivos.

Lo que se sabe actualmente es que: el anillo A de flavonoides esta formado por una condensación cabeza-cola de tres unidades acetilo (malonilo), mientras que el anillo B y los átomos de carbono 2,3 y 4 se originan de una unidad fenil propano.



- unidad fenil propano
- grupo carboxilo de acetato (malonato)
- ▲ grupo metilo de acetato (malonato).

La formación de compuestos fenil propano en plantas es vía ácido shikímico y prefénico y su precursor más efectivo es L-fenil alanina



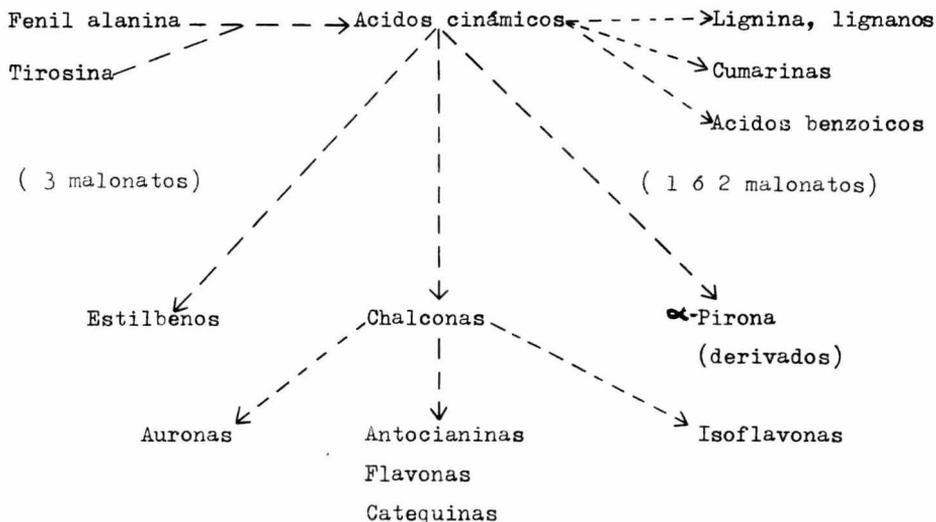
L- fenil alanina

trans-ácido cinámico

Por estudios realizados con derivados de acetato, se supone que malonil-Co-A y no acetyl-Co-A es el intermediario biológico en la formación del anillo A de flavonoides.

Puede suponerse que los oxígenos de las posiciones 5 y 7 de los flavonoides, así como el del anillo heterocíclico, también se originan del grupo carboxilo de malonato.

De los datos experimentales se ha concluido el siguiente diagrama para la síntesis de diversos compuestos:



VI INFLUENCIA DE LA LUZ EN LA FORMACION DE ANTOCIANINAS

La síntesis de antocianinas así como algunas otras respuestas fotomorfogénicas de plantas, requieren de prolongados períodos de irradiación a relativamente altas intensidades de luz. Este efecto de luz aparentemente es independiente de la fotosíntesis.

El sistema fotoquímico que controla las respuestas morfogénicas de plantas ha sido llamado sistema de reacción de alta energía (HER) para distinguirlo del sistema de fitocromo que controla el rojo-rojo lejano, el cual requiere de dosis bajas de radiación visible.

Las regiones del azul y rojo lejano del espectro son las más efectivas para inducir respuestas en el HER.

VII INDUCCION DE FENIL ALANINA AMONIO LIASA (PAL)

El descubrimiento de la enzima (PAL) puede ser útil para entender las bases moleculares de los efectos de luz y otros factores en la síntesis de compuestos fenólicos derivados de fenil alanina. Esta enzima cataliza la desaminación directa de L-fenil alanina a ácido trans-cinámico, el esqueleto de carbonos de éste ácido puede ser incorporado en una amplia variedad de compuestos fenólicos.

La estimulación de síntesis de PAL inducida por luz fue observada en el sistema de papa y se reinvestigó en otros sistemas envolviendo fotoregulación para la síntesis de fenólicos, teniendo el mismo resultado.

La síntesis de PAL está controlada por fitocromo, pero no en todas las plantas jóvenes, algunas no muestran dependencia de luz para la síntesis de PAL; la síntesis no es necesariamente bajo control de fitocromo en todos los tejidos de las plántulas. La síntesis de PAL en tejidos de hojas verdes, se controla con frecuencia por reacciones fotosintéticas.

La inducción de PAL en algunos tejidos ha sido demostrada debido a la influencia de hormonas. Entre las hormonas efectivas se incluyen: giberelina, ácido abscísico y etileno.

La excisión del tejido es otro requerimiento para la inducción de PAL en algunos sistemas sensibles a la luz. En los casos en que hay una ruptura seguida de una infección con patógenos, se estimula grandemente la síntesis.

La variedad de factores que influyen en la inducción de PAL, generalmente estimulan la producción de compuestos fenólicos. En muchos sistemas de inducción, la síntesis de PAL puede correlacionarse con la subsecuente aparición en el tejido de compuestos fenólicos que derivan total o parcialmente de fenil alanina, como son: lignina, flavonoides y conjugados hidroxicinamoilos. Sin embargo, la síntesis de PAL y biosíntesis de fenólicos, no pueden siempre correlacionarse. Se han sugerido dualidad de caminos en biosíntesis de fenólicos en donde no se incluye PAL. La interconversión de compuestos fenólicos puede estar influenciada por condiciones de iluminación que afectan la síntesis de PAL.

Muchas enzimas que catalizan los pasos subsecuentes en la biosíntesis de fenólicos son inducidas simultáneamente con PAL por la luz o etileno. Esto sugiere que el operón fenólico inducido por luz, consiste de genes estructurales para por lo menos tres enzimas que existen en los tejidos de las plantas.

Los caminos distintos de biosíntesis de fenólicos, dando distintos productos finales pueden envolver diferentes isoenzimas. Zucker (1972).

Se tienen algunos datos sobre la producción de antocianinas en plantas de sorgo, principalmente en algunas partes de la planta como son: raíz, tallo, coleoptilo y primer internodo.

Downs y Siegelman (1962), reportan que para la producción de antocianinas en coleoptilos, raíces e internodos en varias especies de plantas de sorgo, es necesario una irradiación de intensidad moderada, observando además que el espectro de formación es diferente para cada especie.

Encontraron también que en la producción de antocianinas la temperatura tanto en los periodos de incubación en la oscuridad, como en los de luz, es un factor determinante de la cantidad de pigmento producido. Máxima producción ocurrió como respuesta a una temperatura de 20°C durante el periodo de incubación en la oscuridad.

La cantidad de antocianinas formada en plántulas de sorgo aumenta al aumentar la iluminación, requiriendo mayor tiempo para la producción cuando la intensidad es menor. En cada caso la proporción de acumulación fue lineal una vez que la antocianina apareció pero las proporciones a alta y baja iluminación no fueron las mismas.

Stafford (1965 , 1966), reporta la presencia de tres tipos de antocianinas presentes en varias partes de la planta de sorgo.

Cianidina, producida en coleoptilo, raíces así como en el primer internodo, esta antocianina predomina cuando las distintas partes se han sometido a tratamientos a alta intensidad de luz.

Los pigmentos anaranjados y amarillos correspondientes a luteolinidina y apigeninidina, se encontraron en grandes cantidades en cubiertas de semillas y raíces. Se observó que la luz no tiene efecto en la síntesis neta de una de éstas antocianinas, apigeninidina; mientras que acelera la producción de luteolinidina y es un requisito obligatorio para la síntesis del tercer tipo, cianidina.

Stafford encontró datos en los que se sugiere que la síntesis de proteínas es un factor limitante en la acumulación neta de antocianinas en tejidos separados del primer internodo de plántulas de sorgo. La evidencia para esta conclusión, es un tiempo mayor requerido para la aparición de antocianinas, cuando se usaron inhibidores de síntesis de proteínas

A) IDENTIFICACION POR CROMATOGRAFIA

La cromatografía es una técnica indispensable para el estudio de toda clase de pigmentos de plantas. No fue sino hasta la introducción de la cromatografía en papel hecha por Bate-Smith en 1948, que se tuvieron métodos cromatográficos satisfactorios para la separación e identificación de antocianinas. En general, los flavonoides son regulares en su desarrollo y es posible encontrar relaciones entre sus estructuras químicas y comportamientos cromatográficos.

EXTRACCION:

Los extractos de órganos de plantas pueden ser examinados directamente por cromatografía en papel. Los disolventes usados son metanol o agua conteniendo 1 % HCl.

La extracción con agua o disolventes acuosos tienen dos desventajas principales:

- 1) Muchas otras sustancias, especialmente aquellas de alto peso molecular se extraen también e interfieren con manipulaciones subsecuentes y son difíciles de separar completamente.
- 2) Debido a su relativo alto punto de ebullición y presión de vapor de agua, el agua es difícil de remover completamente.

Los extractos de hojas normalmente se lavan con éter de petróleo ó éter etílico para eliminar la clorofila y carotenoides antes de ser concentrados.

VALORES DE Rf Y ESTRUCTURA:

Los valores de Rf de las antocianinas no son completamente con fiables, ya que la posición y número de marcas puede ser afectada por la presencia de otros componentes, especialmente glicósidos de flavonoles.

Algunos investigadores han encontrado que existen relaciones regulares entre los valores de Rf y la estructura de una antocianina.

a) Hidroxilación: un mayor número de grupos hidroxilo presente en la molécula corresponde a un menor valor de Rf.

b) Metilación: mientras mayor es el número de grupos metoxilo el valor de Rf se incrementa.

c) Glicosilación: existe una relación directa entre el valor de Rf y el número de residuos de azúcar, en forma independiente de la natu raleza de la antocianidina.

d) Acilación: causa un aumento en el valor de Rf en mezclas de disolventes basadas en butanol, pero son menores en disolventes acuosos. En general, los compuestos acilados dan lugar a una serie de bandas ya que son compuestos muy inestables.

VISUALIZACION:

Las diferentes antocianinas aparecen en los cromatogramas como manchas de diferentes colores a la luz del día y cambian característi - camente de color bajo los vapores de amoniaco y con el uso de luz ultra violeta, algunas antocianinas muestran fluorescencia.

Los colores producidos también al revelar los cromatogramas - con: 5% AlCl_3 -EtOH, 2% FeCl_3 y acetato de plomo son útiles para la ca -

racterización de antocianinas.

IDENTIFICACION CROMATOGRAFICA DE ANTOCIANIDINAS:

La hidrólisis ácida de antocianinas produce antocianidinas y azúcares. La identificación del aglicón del pigmento desconocido se hace en forma más satisfactoria mediante cromatografía en papel usando marcas patrón para comparar. La elección del disolvente para la cromatografía, está limitada por el hecho de que son aún más inestables que las antocianinas a pH y luz (Harborne, 1958). Los disolventes que se emplean generalmente contienen ácido mineral.

La relación que existe entre los valores de Rf y estructura química en antocianinas, también se encuentra en las series de antocianidinas.

Una antocianina desconocida puede ser caracterizada mediante una cuidadosa comparación de sus valores de Rf en algunos sistemas de disolventes, con valores de glicósidos de la misma antocianidina bien caracterizados.

B) IDENTIFICACION POR METODOS ESPECTRALES

Las antocianinas son compuestos muy difíciles de tratar con técnicas químicas comunes, ya que son difíciles de aislar en forma pura, muchas de las cuales no tienen puntos de fusión exactos y sus análisis elementales no dan resultados significantes. La ventaja

de los métodos espectrofotométricos es que requieren de sólo pequeñas -
cantidades del pigmento.

El exámen de su espectro y comportamiento durante cromato -
grafía, proveen de cierta información básica requerida para la identifi
cación de antocianinas.

MATERIALES

METODOS

MATERIAL DE PLANTAS:

Se usaron distintas variedades de sorgo, que se eligieron teniendo en cuenta su comportamiento en relación a la producción de antocianinas, mostrado en los campos experimentales de Chapingo y en pruebas preliminares realizadas en el laboratorio. Entre las variedades seleccionadas se incluyeron distintos grados de sensibilidad, con respecto a la síntesis del pigmento en hojas.

TABLA DE LAS VARIEDADES USADAS Y SU CLASIFICACION DE ACUERDO A SU RESPUESTA A LA PRODUCCION DE ANTOCIANINAS

No. de progenie	Suceptibilidad en estado de plántula
1310	sensible
1806	sensible
2046	sensible
Otomí	sensible
1093	poco sensible
1274	poco sensible
1335	poco sensible
1548	poco sensible
8311	poco sensible
Dekalb-F	poco sensible
1609	insensible
2008	insensible
Te-Bird	insensible

La susceptibilidad de las plántulas está indicada por el grado de coloración púrpura que se manifiesta.

Sensible = coloración en mayor área de la hoja

Poco sensible = poca área coloreada

Insensible = sin color en las hojas

CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS:

Las semillas de las variedades seleccionadas fueron sembradas en la siguiente manera: el material de plántulas utilizado en experimentos para determinar la naturaleza del pigmento, creció con frecuencia en los campos experimentales de Chapingo, con el uso de irrigación.

El resto del material de plantas creció en el laboratorio del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, en un medio inerte (agrolita). Las semillas fueron plantadas en este material en cajas de plástico (37 X 27 X 8 cm). El medio inerte fue saturado con solución nutritiva de Long-Ashton (fórmula modificada de Hewitt) (Steward, 1963). Se añadió solución nutritiva en caso necesario para mantener húmeda la agrolita.

Las plantas crecieron en el laboratorio durante 10 ó 14 días, dependiendo de la naturaleza del experimento para el que se requirieran. Generalmente se usaron como material de experimentación después de que habían alcanzado una altura de aproximadamente 5 cm . Se plantaron 20 semillas de cada variedad para cada tratamiento.

TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES:

Las plántulas se sometieron a varios tratamientos, ya fue usando exposición directa a la luz solar o transfiriéndolas a cámaras de crecimiento Sherer Cel. 37-14, con medio ambiente controlado del Departamento de Botánica de Chapingo, en las que se pudo tener control de intensidad de luz y temperatura.

Inicialmente se determinó la importancia de la intensidad de luz para la producción del pigmento en hojas. Se usaron plántulas de once variedades de distinta susceptibilidad y se expusieron directamente a la luz solar, a lotes de las mismas variedades se les redujo la intensidad de luz incidente cubriendo las cajas de crecimiento con capas de gasa, 4, 6, 8 y 16 capas. No es posible saber con exactitud la intensidad de luz real usada, pero se obtuvieron valores de la siguiente magnitud: 40,000 lux (luz directa); 24,000 lux (con 4 capas); 18,000 lux (con 6 capas); - 16,000 lux (con 8 capas) y 10,000 lux (con 16 capas) aproximadamente.

Para poder llevar a cabo los tratamientos con las plántulas en las cámaras de ambiente controlado, se seleccionaron dos intensidades de luz: intensidad mínima necesaria para la producción del pigmento (18,000 lux) e intensidad máxima posible dentro de la cámara (50,000 lux). Para hacer esta determinación se utilizó una variedad sensible (1310), usando una temperatura en la cámara de 25°C durante el período de irradiación.

La intensidad de luz se midió usando una fotocelda "Toshiba" - con un rango de 0 - 300,000 lux.

Una vez seleccionadas tres variedades de sorgo de distinta susceptibilidad (1310, 1093 y Te-Bird) y las dos intensidades de luz, las plántulas se sometieron a los siguientes tratamientos:

I) Las plántulas en las cámaras de crecimiento tuvieron un fotoperíodo de 12 horas diarias, usando las dos intensidades de luz. Se usaron varias temperaturas diurnas durante los períodos de irradiación. El rango de temperaturas usado fue: 15^o, 20^o, 25^o, 30^o, 35^o y 40^o C respectivamente. Estas temperaturas se mantuvieron constantes durante el fotoperíodo en cada caso. La temperatura durante las noches no fue controlada, se registraron temperaturas que variaron de 15^o a 18^o C, después de equilibrarse la temperatura de la cámara con la del medio ambiente.

Estos mismos tratamientos se llevaron a cabo con ocho variedades más, de las cuales se tenía un poco más de información sobre su comportamiento en el campo. En este caso, la temperatura nocturna fue controlada y se mantuvo constante a 15^oC para cada tratamiento.

II) Usando nuevamente el mismo tiempo de fotoperíodo e intensidades de luz, se mantuvo constante la temperatura durante el período de irradiación, 30^o C, variando las temperaturas nocturnas en cada tratamiento, siendo el rango usado de: 0^o, 5^o, 10^o y 15^o C respectivamente. Estas temperaturas nocturnas se mantuvieron constantes en cada caso.

Todos los tratamientos en las cámaras de crecimiento tuvieron una duración de dos días (48 horas).

EXTRACCION DEL PIGMENTO

Tanto para el análisis cualitativo como cuantitativo del pigmento, se siguió el método de extracción usado por Stafford (1966), el cual se esquematiza a continuación:

Hojas de plántulas de sorgo frescas (1 g)

1. Extracción con homogeneizador Polytron PCU-2 (Kinematica Gm bH) ó Virtis "23", usando el mínimo volúmen de una solución 0.1% ó 1 % HCl-MeOH (8-10 ml)
2. Centrifugación del extracto a 2000 rpm durante 10 minutos. Se utilizó una centrifuga MSE LR-6 con cabezal de columpio.

Extracto crudo (después de centrifugación)

1. Adición de dos volúmenes (20 ml) de éter etílico y agua suficiente (7-10 ml) para la separación de dos fases.
2. La fase etérea se lava dos veces con agua para extraer todo el pigmento.

I Fracción soluble en éter
(se desecha)

II Fracción insoluble en éter
(conteniendo el pigmento)

a) La fracción acuosa conteniendo antocianinas puede leerse directamente, usando un espectrofotómetro. Se usó un Unicam SP 1800 tomando - el espectro en el rango 400-600 nm.

b) Concentración a presión reducida y temperatura de 35^o-37^oC, a un volúmen mínimo.

Cromatografía de la fracción - para purificación e identificación del pigmento

CROMATOGRAFIA DEL EXTRACTO:

La fracción conteniendo el pigmento, después de concentrarse, se aplicó en bandas sobre hojas de papel Whatman 3 MM (25cm X 18 cm) y se colocaron en cámaras cilíndricas para cromatografía descendente.

Los sistemas de disolventes que se usaron para las cromatografías fueron:

- a) BAW (4:1:5) n-butanol- ácido acético- agua (fase superior)

Este sistema se deja reposar uno ó dos días antes de usarse, para obtener mejor resolución. (Harborne, 1958).

- b) 10% A-HCl ácido acético- agua- HCl conc. (10:87:3) (Stafford,1965)

Los extractos crudos se sometieron a varias cromatografías usando 10% A-HCl para una separación preliminar y BAW para subsecuentes cromatografías.

Las bandas de antocianinas fueron visibles después de las cromatografías, pero se probaron los siguientes reactivos para su detección y caracterización:

- a) Vapores de NH_3 : los cromatogramas secos se expusieron a estos vapores. Las distintas antocianinas dan cambios de color característicos (Harborne, 1958).

- b) Solución al 5% de AlCl_3 (p/v). Una rociada con esta solución causa cambios en $\lambda_{\text{máxima}}$ de absorción en el espectro visible en aquellas estructuras que tienen grupos hidroxilo en posición orto en el anillo B. (Harborne, 1958)

- c) Solución de acetato de plomo: produce cambios de color característicos para cada estructura de antocianinas, observándose un

cambio más marcado en aquellas estructuras con grupos hidroxilo en posición orto en el anillo B. (Fuleki and Francis, 1968).

La detección bajo luz ultravioleta, es también útil para la visualización de distintas antocianinas, debido a la capacidad de fluorescencia de cada compuesto (Harborne, 1958).

RACTERIZACION DE ANTOCIANINAS:

Cada banda de los cromatogramas fue eluida con una solución 0.01 por ciento de HCl-MeOH (Martin, 1970). Se determinó el espectro en la región visible de 400-600 nm, de cada una de las bandas, usando un espectrofotómetro Unicam SP 1800, determinando en cada caso la λ máxima absorción.

Las reacciones de caracterización de antocianinas, se hicieron tanto en los cromatogramas, como en las soluciones obtenidas al eluir cada banda.

Las propiedades observadas: reacciones específicas, λ máxima absorción y valores de Rf obtenidos, fueron comparados con las características reportadas para antocianinas conocidas en distintas plantas. Harborne, 1958; Harborne, 1964; Stafford, 1965; Fuleki, 1968; Tanchev, 1969).

Los extractos crudos de antocianinas, así como los distintos compuestos obtenidos después de cromatografía, se sometieron a hidrólisis ácida, para obtener los aglicones.

A un volúmen de solución de antocianinas, se le adicionó un volúmen igual de HCl 2N, la mezcla se dejó en un baño de agua hirviendo -

durante 30 minutos. Los aglicones se extrajeron con alcohol isoamílico, se les determinó su espectro en la región visible, se evaporaron a sequedad y se cromatografiaron en papel Whatman 3 MM, usando como eluyente el sistema BAW. A las nuevas marcas obtenidas se les hicieron las mismas pruebas específicas mencionadas anteriormente, sus características también fueron comparadas con los datos reportados en la literatura.

ANÁLISIS CUANTITATIVO DE ANTOCIANINAS:

Las antocianinas totales pueden determinarse en extractos crudos conteniendo otros compuestos fenólicos, midiendo la absorbencia de la solución a una longitud de onda máxima. Esto es posible ya que las antocianinas tienen máximos de absorción en la región de 510-550 nm (Harborne, 1958).

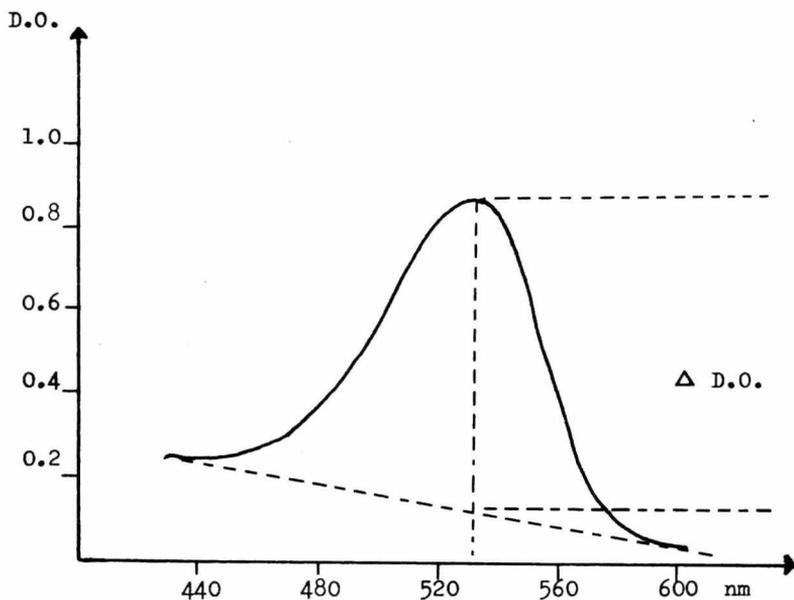
Para hacer una determinación cuantitativa de la cantidad de pigmento presente en cada muestra, se tomó un valor de $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (coeficiente de absorbencia), haciendo la suposición de que se trataba en todos los casos de derivados de cianina.

Los cálculos se hicieron siguiendo la relación:

$$\text{mg (totales)} = \frac{\text{D.O.} \times \text{volúmen total} \times \text{dilución}}{E_{1\text{cm}}^{1\%} / 10}$$

En donde: $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 750$ para cianina a 530 nm (Harborne, 1967)

Ya que se trataba de extractos crudos, en donde había muchos compuestos, se utilizó un valor de D.O. correspondiente a un Δ D.O. obtenido de la gráfica del espectro como se muestra en la siguiente figura:



En donde:

Δ D.O. corresponde a la absorbencia real, debida a la cantidad de pigmento presente en la muestra.

Las antocianinas totales de los extractos crudos y de las fracciones obtenidas después de su cromatografía, siempre se calcularon en la forma descrita.

EXPERIMENTOS IN VITRO CON HOJAS:

A plántulas de tres semanas de edad de distintas susceptibilidades (1310, 1093 y Te-Bird) se les cortó la primera hoja a la altura de la unión con la vaina. Cada hoja se cortó en 4 o 5 pedazos, los que se colocaron en cajas Petri (10 por cada variedad) que contenían 20 ml cada una de soluciones de distinta concentración de sacarosa:

- 1.- Agua destilada
- 2.- Solución 0.01 M de sacarosa
- 3.- Solución 0.05 M de sacarosa
- 4.- Solución 0.1 M de sacarosa
- 5.- Solución 0.5 M de sacarosa

Los pedazos de hoja de cada variedad se repartieron en 10 cajas (dos cajas para cada concentración).

Las cajas se expusieron a condiciones experimentales de: fotoperíodo de 12 horas, temperatura de 30° C durante el período de irradiación y dos intensidades de luz (las mismas que se usaron en todos los tratamientos), para cada variedad en las distintas soluciones.

La duración de este experimento fue también de dos días y los resultados fueron reportados únicamente por inspección visual de acuerdo al color púrpura desarrollado por los pedazos de hoja.

RESULTADOS

RESULTADOS

I. NATURALEZA Y DISTRIBUCION DE ANTOCIANINAS EN PLANTULAS DE SORGO.

NATURALEZA DEL COLOR:

Se encontró que el pigmento responsable del color rojo en las plántulas de sorgo, mostraba propiedades físicas y químicas características de las antocianinas, como es el hecho de ser: solubles en agua, insolubles en éter y mostrar cambios de color característicos con la adición de solución de acetato de plomo o bajo luz ultravioleta. En base a esto, puede decirse que el color desarrollado por las hojas de plántulas de sorgo es debido a la presencia de antocianinas.

ANTOCIANINAS EN HOJAS DE SORGO:

El pigmento de hojas de plántulas de sorgo, crecidas en los campos experimentales de Chapingo, fue extraído y cromatografiado.

Se hicieron análisis de distintas variedades de plántulas con el objeto de determinar si el patrón de compuestos era el mismo en todos los casos. Las cromatografías realizadas de los distintos extractos de plantas, muestran en la mayoría de los casos, después de cromatografiar en BAW, la presencia de 4 ó 5 bandas rosas de variable intensidad, dependiendo de la concentración presente en cada banda. En el sistema 10% A-HCl, solamente aparecieron dos bandas.

Para llevar a cabo esta determinación se seleccionaron 6 varie -

al azar, que mostraron mayor coloración roja en las hojas.

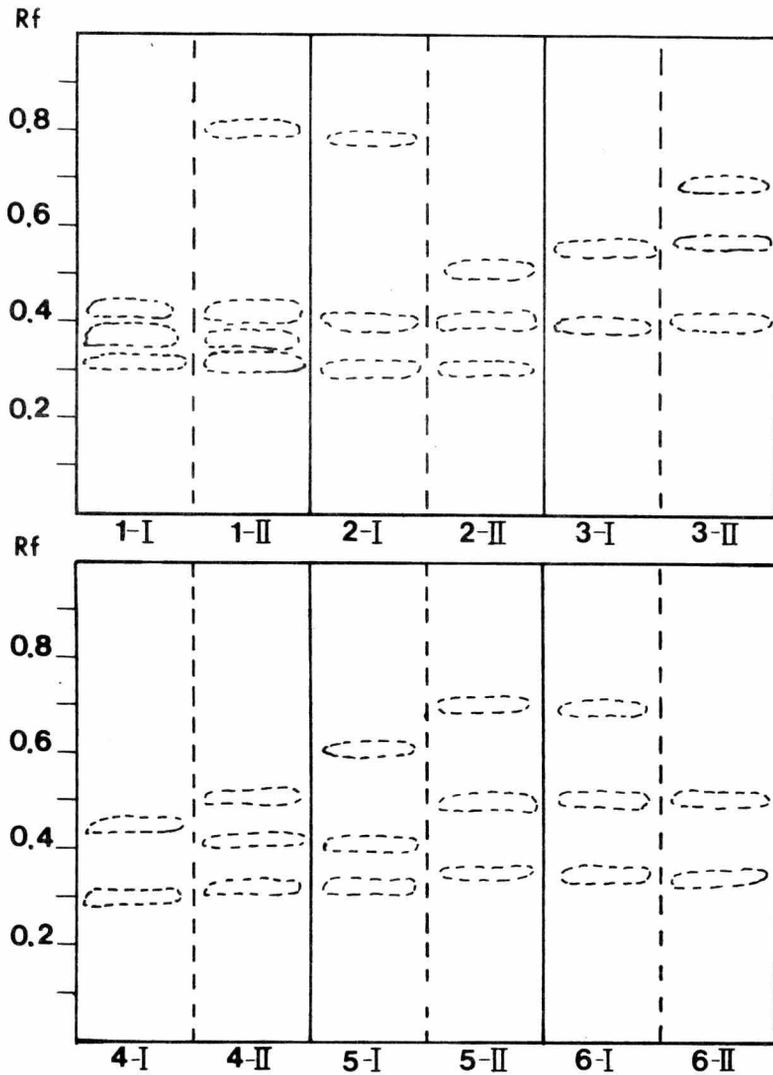
Los extractos se sometieron a dos cromatografías, una preliminar en 10% A-HCl, con la que se obtuvieron de cada extracto dos bandas: I y II. Estas bandas se volvieron a cromatografiar en el sistema BAW, obteniéndose una nueva separación de cada una, como se muestra en la figura 1. Al mismo tiempo, se cromatografiaron las muestras crudas usando únicamente el sistema BAW, con el que se tuvieron buenas resoluciones, como se muestra en el siguiente esquema:

		Bandas obtenidas	
		en BAW	Rf
Extracto (cromatografía) crudo	}	a	0.39
		b	0.50
		c	0.60
		d	0.65
		e	0.70

Se observó en primer lugar, que el patrón de componentes presentes en las distintas variedades es muy parecido aunque no igual, sin embargo, los derivados en cada caso parecen provenir de una misma antocianina, cianidina. La evidencia para esto está basada en el hecho de que las bandas obtenidas después de cromatografía muestran una longitud de onda máxima de $530\text{nm} \pm 2\text{ nm}$. Y entre las antocianinas encontradas en plantas, cianidina es la única que tiene una absorbancia máxima a esa longitud de onda.

La tabla I muestra algunas características importantes de los derivados de cianidina.

Fig. 1



REPRESENTACION DE LA SEGUNDA CROMATOGRAFIA EN BAW DE LAS BANDAS: I y II

Extractos crudos de seis muestras fueron cromatografiados dos veces, en 10% A-HCl la primera y sus respectivas bandas I y II recromatografiadas en BAW. Todas las bandas fueron color rosa con λ max. a 530 nm

TABLA I

CARACTERISTICAS MAS IMPORTANTES REPORTADAS DE ALGUNAS ANTOCIANINAS DERIVADAS DE CIANIDINA

PIGMENTO	$\lambda_{\max.}$ (nm)	Rf (BAW)	+ AlCl_3 $\Delta \lambda_{\max.}$ (nm)	Color	Color	
				+ acetato de plomo	Visible	U.V.
Cianidina	535	0.68	(+)	azul pastel	rojo-púrpura	rosa
		0.69				
		0.78				
Cn-3-RG	530 528	0.33	(+)		rojo-púrpura	rosa
		0.35				
Cn-3-G	530 525	0.36	(+)	azul pastel	rosa ó púrpura	rosa
		0.38				
		0.32				
		0.29				
Cn-3-Ru		0.25			púrpura	rosa
		0.30				
Cn-3-Ga	530 528	0.37		azul pastel	púrpura	rosa
		0.27				
		0.33				

TABLA I (continuación)

PIGMENTO	λ MAX. (nm)	Rf (BAW)	+ AlCl ₃ $\Delta \lambda$ max. (nm)	Color + acetato de plomo	Color Visible	Color U.V.
Cn-3-Ar		0.43		azul pastel	púrpura	rosa
Cn-3-GX	528	0.33			púrpura	rosa
	523	0.28				
		0.36				
Cn-3-G-5-G	522	0.28	(+)	azul pastel	púrpura	rosa
Cn-3-So		0.18				
Cn-3-G + ácido cafeico	525	0.29	(+)		azul-púrpura	rosa
Cn-3-G + ac. p-cumárico	523	0.35			azul-púrpura	rosa
Cn-3,5-RG-5-G		0.25			púrpura brillante	rojo

Cn= cianidina	Ru= rutinósido	RG= ramnoglucoósido	Ga= galactoósido
G = glucoósido	Ar= arabinósido	GX= xiloglucoósido	So= soforósido

Los derivados de una variedad obtenidos después de la segunda - cromatografía, se eluyeron y se sometieron a una tercera cromatografía en el sistema BAW. Se encontró, que los derivados son compuestos bastante - inestables, ya que ocurren cambios en el patrón de cromatografía durante el almacenamiento y procesamiento de cada muestra.

En el siguiente esquema, se indican los cambios ocurridos durante la purificación por cromatografía del extracto crudo de una variedad de sorgo:

	1a. crom. 10% A-HCl	2a. crom. BAW Rf(s)	3a. crom. BAW Rf(s)	
Extracto crudo	[]		0.36	
			0.45	
			0.38	
		BANDA I	0.52	0.51
				0.63
			0.71	0.51
				0.70
			0.30	0.33
			0.37	0.40
				0.72
		BANDA II	0.45	0.40
				0.47
	0.70	0.40		
		0.47		

Es difícil precisar las condiciones bajo las cuales se llevan a cabo dichos cambios, así como al compuesto al que se están convirtiendo. Sin embargo, durante la recromatografía de las muestras hay siempre los mismos cambios, apareciendo siempre una marca que parece ser el compuesto más estable, siendo el mismo en todos los casos de acuerdo a su valor de Rf aproximadamente 0.38-0.40. La hidrólisis ácida de ésta marca se cromatografió junto con el producto obtenido de la hidrólisis ácida del extracto crudo en el sistema BAW, se vió que su comportamiento fue similar y que sólo daban lugar a una marca con un valor de Rf de 0.45, que al ser tratada con solución de acetato de plomo, dió el cambio a coloración azul reportado para cianidina y sus derivados. Este mismo resultado se obtuvo al hidrolizar las distintas bandas obtenidas de los distintos extractos de plantas.

El hecho de no tener muestras puras de antocianinas con las cuales fuera posible comparar el desarrollo durante cromatografía de los distintos derivados presentes en hojas y teniendo como antecedente la existencia de otro tipo de antocianinas en otras partes de la plántula de sorgo (Stafford, 1965), hizo necesario que se investigara si existían diferencias cualitativas en las diferentes partes de la plántula.

DISTRIBUCION DE ANTOCIANINAS EN LAS DIFERENTES PARTES DE LA PLANTULA:

De plántulas de una sola variedad " sensible" de sorgo, que crecieron en el laboratorio y después se expusieron a la luz solar durante cuatro días, se cortaron y se analizaron distintas partes : raíz, semi-

lla, tallo, coleoptilo, vaina y hojas, con el propósito de determinar - las diferencias cualitativas y cuantitativas entre cada una.

Cada parte de la planta fue extraída y la fracción conteniendo las antocianinas fue cromatografiada en el sistema BAW. Se encontró, - que existe una marcada diferencia tanto en los extractos crudos de cada una de las partes, así como en los diferentes compuestos presentes.

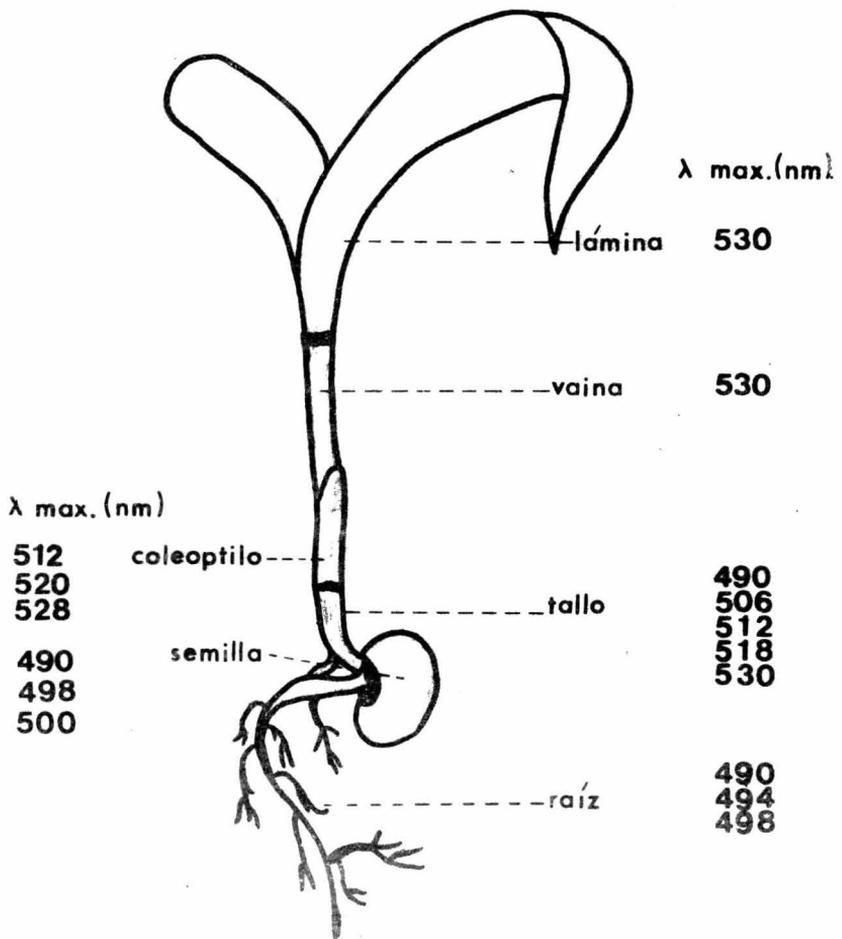
En la tabla II se presentan datos de los extractos crudos de las distintas partes de la plántula, incluyendo además la concentración aproximada de antocianinas.

En la figura 2 se muestran las partes de una plántula de sorgo y la longitud de onda de la absorbancia máxima de las bandas encontradas en cada parte después de cromatografía.

En la tabla III, se muestran las propiedades de cada banda por separado, incluyendo la identidad probable de antocianidina implicada. Esto se deduce de la información mostrada en la tabla IV, en donde se - presentan las características de las antocianidinas más comunes que se encuentran en las plantas.

Se encontró que en raíces y semillas, existe una alta concentra ción de antocianinas, que de acuerdo a su color, su detección bajo luz ultravioleta , sus valores de Rf después de su cromatografía en BAW y su longitud de onda máxima de absorción en el espectro visible, parecen ser derivados principalmente de luteolinidina y quizá en menor cantidad de apigeninidina. No es posible precisar la identidad del aglicón del - cual deriva cada banda, ya que los extractos fueron cromatografiados só lo una vez.

Fig. 2



Distribución de distintas antocianinas en diferentes partes de la plántula de sorgo.

TABLA II

CARACTERISTICAS DE LOS EXTRACTOS CRUDOS DE LAS DISTINTAS PARTES
DE LA PLANTULA DE SORGO.

Parte	$\lambda_{\text{m\acute{a}xima}$	$\mu\text{g/g}$ (peso fresco)	Color visible
RAIZ	491	185	amarillo-naranja
SEMILLA	490	457	amarillo-naranja
TALLO	515	248	anaranjado
COLEOPTILO	530	818	rosa
VAINA	530	70	rosa
HOJA	530	215	rosa

TABLA III

CARACTERISTICAS DE LAS DISTINTAS BANDAS OBTENIDAS DE LA CROMATOGRAFIA DE LOS EXTRACTOS CRUDOS DE LAS DISTINTAS PARTES DE LAS PLANTULAS DE UNA VARIEDAD DE SORGO.

Muestra	Rf (BAW)	λ_{max} . (nm)	Antocian. μ g. tot.	% banda	Color Visible	Color U.V	+ Acetato de plomo	Posible Antocianidina
RAIZ								
a	0.40	494	2	2	anaranjado	naranja fluorescente		Apigeninidina
b	0.55	498	6	8	rosa-naranja			Luteolinidina
c	0.65	498	24	34	rosa-naranja			Luteolinidina
d	0.72	498	21	30	rosa-naranja			Luteolinidina
e	0.84	490	11	16	amarillo-naranja			Apigeninidina
f	0.93	494	6	9	amarillo-naranja			
SEMILLA								
a	0.40	494	4	10	anaranjado	naranja fluorescente		Apigeninidina
b	0.60	500	14	36	rosa-naranja			Luteolinidina
c	0.71	498	12	31	rosa-naranja			Luteolinidina
d	0.84	490	9	23	amarillo-naranja			Apigeninidina
COLEOPTILO								
a	0.36	514	2	7	rosa pálido			
b	0.45	528	5	18	rosa pálido		azul	Cianidina
c	0.49	530	12	45	púrpura	púrpura	azul	Cianidina
d	0.67	528	8	30	púrpura		azul	Cianidina

TABLA III (continuación)

Muestra	Rf (BAW)	$\lambda_{max.}$ (nm)	Antocian.		Color Visible	Color U.V.	+ Acetato de plomo	Possible Antocianidina
			$\mu g.$ tot.	% banda				
TALLO								
a	0.30	506	1	4	rosa-amarillo			Luteolinidina
b	0.40	530	3	13	rosa pálido			Cianidina
c	0.49	512	9	39	rosa-naranja			
d	0.65	490	4	17	rosa-naranja			Apigeninidina
e	0.82	518	6	8	amarillo-naranja			
VAINA								
a	0.31	530	1	4	rosa		azul	Cianidina
b	0.40	528	4	15	rosa		azul	Cianidina
c	0.52	530	9	34	rosa		azul	Cianidina
d	0.62	530	7	27	rosa		azul	Cianidina
e	0.71	530	5	19	rosa		azul	Cianidina
HOJA								
a	0.43	530	3	9	rosa		azul	Cianidina
b	0.51	532	8	24	rosa		azul	Cianidina
c	0.61	530	15	46	rosa		azul	Cianidina
d	0.70	530	7	21	rosa		azul	Cianidina

TABLA IV

CARACTERISTICAS MAS IMPORTANTES PARA LA DIFERENCIACION DE LAS DISTINTAS ANTOCIANINAS

PIGMENTO	HCl-MeOH	HCl-EtOH	+ AlCl ₃	Color	Color	Color
	$\lambda_{\text{max.}}$ (nm)	$\lambda_{\text{max.}}$ (nm)	$\Delta \lambda_{\text{max.}}$	visible	U.V.	U.V. + NH ₃
Hirsutidina	536	545	0	púrpura	lila	
Malvidina	542	554	0	púrpura	lila	
Petunidina	543	558	24	púrpura	lila	
Delfinidina	546	557	23	púrpura	lila	
Rosinidina	524	534	0	rojo-púrpura	rosa	
Peonidina	532	542	0	rojo-púrpura	rosa	
Cianidina	535	545	18	rojo-púrpura	rosa	
Pelargonidina	520	530	0	rojo	rojo-naranja	
Luteolinidina	493	503	52	naranja	fluorescencia naranja	fluorescencia rosa
Apigeninidina	476	483	0	amarillo	amarillo café	fluorescencia rosa

Nota: Hay que observar que la longitud de absorción máxima depende del disolvente.

(Harborne, 1958; Harborne, 1967; Stafford, 1965.)

En el tallo y coleoptilo, de acuerdo a las características ya se ñaladas, parece haber derivados de por lo menos dos antocianidinas, cianidina (530 nm) y luteolinidina (490 nm): lo cual concuerda con lo reportado por Stafford (1965).

En la vaina y en la hoja, aparece sólo la presencia de una familia de antocianinas que parecen estar basadas en la estructura de cianidina, aún cuando en el caso de hojas en las que el patrón después de cromatografía fue distinto para las diferentes variedades.

Estos resultados resuelven la aparente discrepancia entre el estudio inicial de antocianinas en hojas y los datos reportados por Stafford.

DIFERENCIAS DE LA TECNICA DE ANALISIS:

El método de análisis desarrollado para la determinación de antocianinas, en hojas de las distintas variedades, y cantidades relativas de cada componente, es sólo una medida aproximada de la cantidad de pigmento presente, ya que pueden ocurrir pérdidas considerables de las muestras durante su procesamiento. A continuación se presenta una idea de las pérdidas encontradas:

PASO DEL PROCESAMIENTO

‰ APROXIMADO DE PERDIDA

- | | |
|-----------------------------------|---|
| 1. Extracción del material fresco | Existe una pérdida mínima |
| 2. Partición de la muestra | Existe una pérdida mínima |
| 3. Concentración de la muestra | Pérdida de material que queda adherido al material de vidrio. |

4. Cromatografía de la muestra

- a) Pérdida de 25 a 30% del material que queda absorbido en el papel de cromatografía después de la elución de la muestra.
- b) Pérdida de 30% adicional del total de la muestra aplicada, debida quizá a los cambios que sufre durante su cromatografía.

Aunque hay mucha pérdida durante la cromatografía del extracto crudo y el análisis de cada banda, el análisis total parece indicar una pérdida mínima.

Se hicieron análisis con muestras homogéneas obtenidas de una mezcla de pedazos pequeños de hojas de distintas variedades, esto fue con el objeto de evitar la variación debida al factor biológico y poder precisar el porcentaje de variación que se obtiene debido al método de análisis.

Se usaron cinco muestras de 6 g cada una, éstas fueron extraídas y analizadas exactamente en las mismas condiciones en cada paso del método ya mencionado para la obtención de la fracción conteniendo el pigmento. Se hizo el cálculo de la concentración total de pigmento presente en cada muestra. Se obtuvieron los siguientes resultados:

No. de muestra	μg totales de pigmento	% de error
1	32	23
2	23	10
3	29	10
4	23	10
5	26	0
	Promedio 26	

Se encontró, que la técnica de análisis era reproducible con un error máximo de hasta 23%. Puede pensarse que en éste porcentaje de variación debido a la técnica de análisis, no se ha eliminado completamente la variación biológica, ya que es posible que la homogeneización de la muestra total de hojas no haya sido completamente adecuada.

Sin embargo, durante el análisis de diferentes muestras de una misma variedad (1310), después de haber estado sometidas las plántulas a las mismas condiciones para la producción del pigmento (aproximadamente 10 plántulas en cada muestra), se tuvieron variaciones de hasta 38%. Esto da una idea de la alta variación biológica entre planta y planta. Los datos obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

No. de muestra	$\mu\text{g/g}$ (peso fresco)	% de error
1	132	3
2	141	2
3	95	30
4	190	38
5	135	2

No. de muestra	$\mu\text{g/g}$ (peso fresco)	% de error
6	114	16
7	122	10
8	177	29
9	<u>127</u>	7
Promedio	137	

A pesar de que la técnica de análisis no es muy buena, de acuerdo con los resultados obtenidos en las repeticiones, los datos que se obtuvieron durante el desarrollo del presente trabajo al someter a las plántulas a distintas condiciones experimentales, son diferentes aún tomando en cuenta el posible error inducido por la técnica de análisis y la variación biológica, de tal manera, que es posible hacer una interpretación adecuada de dichos resultados.

II. EFECTO DE FACTORES AMBIENTALES.

EFECTO DE INTENSIDAD DE LUZ:

Los primeros intentos para crecer plantas de once variedades distintas de sorgo en material inerte (agrolita) en el Departamento de Bioquímica, mostraron que bajo estas condiciones, algunas variedades presentaban color en: raíces, coleoptilo y en ocasiones en el primer internodo.

Estas mismas variedades después de ocho días de plantadas, se cambiaron al cuarto de crecimiento del Jardín Botánico Exterior (UNAM), en donde estuvieron bajo luz artificial durante el día a una temperatura de aproximadamente 40°C, en este caso tampoco hubo producción de color en hojas después de aproximadamente tres semanas en que permanecieron bajo estas condiciones.

Sin embargo, las mismas once variedades, al ser expuestas directamente a la luz solar, ocho días después de haber sido plantadas, mostraron la producción del color después de dos días bajo estas condiciones. Se hicieron observaciones visuales del desarrollo del color en las distintas partes de la plántula durante varios días bajo estas condiciones. En la tabla A del apéndice, se muestran las observaciones diarias hechas desde el momento en que las plántulas fueron expuestas a la luz solar directa.

De aquí que la intensidad de luz es un factor importante, necesario para la producción de antocianinas en hojas. De este hecho ya se tenía conocimiento, ya que ha sido estudiado en sorgo por Downs y Siegelman (1963), sin embargo, éstas investigaciones se hicieron usando los in

ternodos como tejido experimental.

Se hicieron experimentos preliminares en los que se redujo la intensidad de luz incidente sobre las plántulas de 11 variedades mediante el uso de capas de gasa, con lo cual se pudo observar la importancia de la intensidad de luz en la iniciación de la síntesis de antocianinas en hojas. En esta experiencia también se hicieron solamente observaciones visuales que se muestran en la tabla B del apéndice.

No es posible saber la intensidad de luz real usada, porque ésta varía con el grado de nublado y la hora del día, siendo que este experimento se llevó a cabo en el exterior. Sin embargo, se hicieron las siguientes observaciones:

- a) Existe una intensidad de luz mínima requerida antes de que ocurra la síntesis de antocianinas.
- b) Este límite mínimo es distinto para la síntesis de antocianinas en las diferentes partes de una plántula. Siendo los coleóptilos los más sensibles, después la vaina y finalmente las hojas. Esto es que las hojas requieren de una mayor intensidad de luz para iniciar la síntesis de antocianinas.
- c) Diferentes variedades muestran diferentes límites. Algunas variedades presumiblemente "insensibles" nunca mostraron color, aún cuando fueron expuestas a la luz solar directamente, la que alcanzó valores de hasta 100,000 lux en el día. Puede pensarse que existe una graduación en sensibilidad en vista de que con el uso de 16 capas de gasa (aprox. 10,000 lux), ninguna variedad mostró color en las hojas.

Sin embargo, ésta intensidad mínima requerida es muy baja en comparación con la intensidad de la luz solar total. Se ha dicho que las plantas de variedades sensibles no mostrarían color cuando estuvieran creciendo a bajas altitudes. La intensidad de luz a tales altitudes será mucho mayor que la mínima requerida para la iniciación de síntesis de antocianinas, así, la diferencia en comportamiento no es la intensidad de luz, aunque juega un papel importante en el control de producción del pigmento, pero debe estar relacionado con otros factores.

Para poder estudiar esto, fue necesario una cámara de crecimiento con medio ambiente controlado. Como ya se dijo se hicieron experimentos iniciales en el cuarto de crecimiento de Botánica (UNAM), en los que nunca se observó color en las hojas. La intensidad de luz no fue medida, pero probablemente fue arriba del límite. La explicación para la falta de color podría ser que la temperatura no fue controlada y fue bastante alta (40°C o más), esto conduce a la posibilidad de que temperatura es también un factor importante en la regulación de síntesis de antocianinas.

Fue posible usar las cámaras de crecimiento del Departamento de Botánica de Chapingo para determinar este factor, gracias a la amabilidad del Dr. Kohashi.

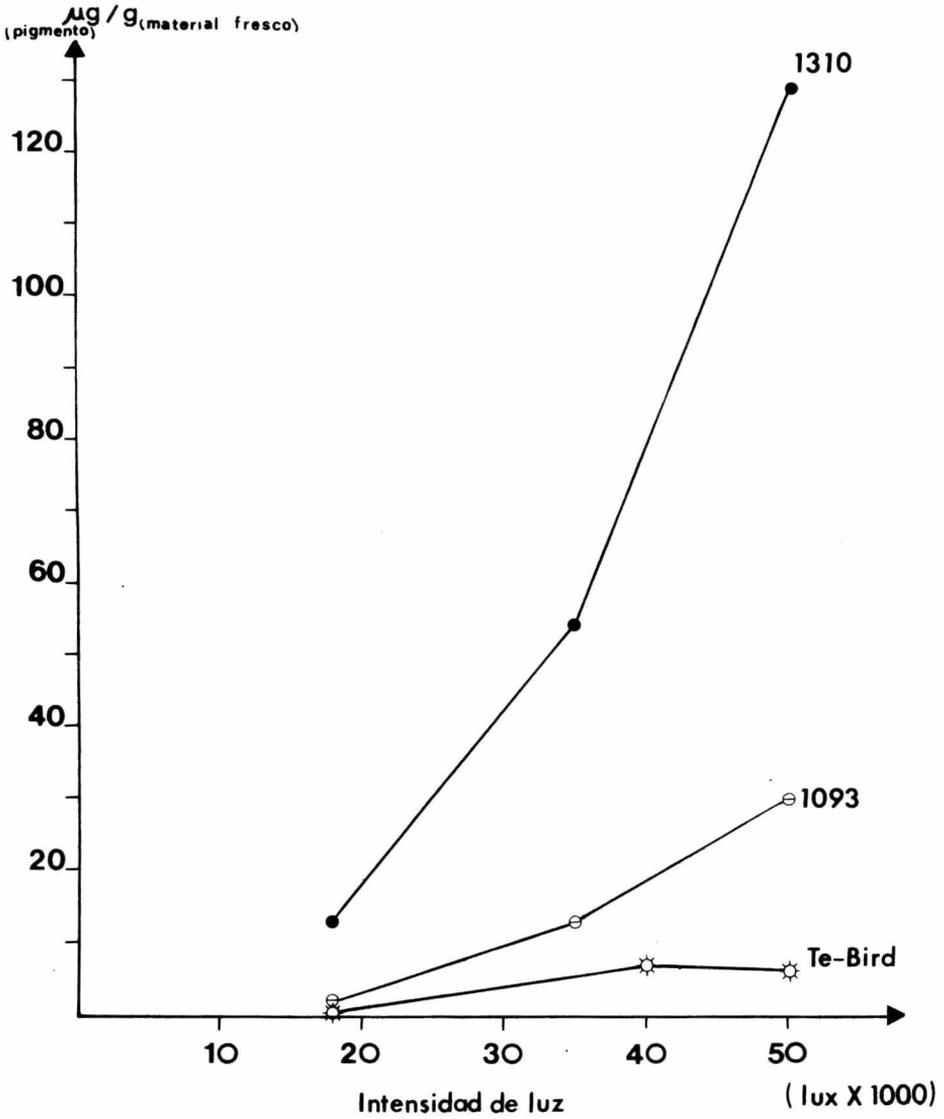
En un primer experimento en Chapingo, plántulas de once variedades de 18 días de edad se expusieron durante dos días a la luz artificial de las cámaras a una intensidad de 30,000 lux, un fotoperíodo de 10 horas y una temperatura de 25°C durante el período de irradiación. Se observó que había pigmentación en todas las variedades (muy poco color en las variedades "insensibles"; poco en las variedades "poco sensibles", pero co-

lor muy bien desarrollado en las hojas de las variedades " sensibles"). Esto sugiere la importancia de la temperatura, ya que no se había encontrado desarrollo de color en las variedades "insensibles" expuestas al sol.

Un segundo experimento, fue para determinar en una forma más exacta el valor de la intensidad mínima requerida para la síntesis del pigmento. A las plántulas de una variedad sensible (1310), se les dió el tratamiento anterior, pero se cubrieron las cajas de crecimiento con 8 y 16 capas de gasa para disminuir la intensidad de luz a: 16,000 y 8,000 lux respectivamente. El color se observó sólo en el tratamiento a mayor intensidad de luz, o sea, 16,000 lux. Esto parece indicar que el límite de intensidad de luz, para una variedad sensible, tiene un valor alrededor del que se determinó.

Una vez determinado el valor límite de intensidad de luz, se seleccionaron de las once variedades, tres que representaban las diferentes sensibilidades (1310, 1093 y Te-Bird). Estas se sometieron a un nuevo tratamiento en el que seleccionaron: tres intensidades de luz arriba del valor límite (18,000; 35,000 y 50,000 lux), con un fotoperíodo de 10 horas y una temperatura de 25°C durante el período de irradiación. Esto fue para ver la relación existente entre intensidad de luz y producción de antocianinas. Los resultados obtenidos, se muestran en la figura 3, es posible observar que existe una relación directamente proporcional entre síntesis de pigmento e intensidad de luz, este hecho se manifiesta en las tres variedades.

Fig. 3



DESARROLLO DEL COLOR PURPURA EN HOJAS EN RELACION CON LA INTENSIDAD DE LUZ

Plántulas de tres variedades de sorgo de 14 días de edad fueron transferidas del laboratorio (1500 lux) hasta una cámara de crecimiento a 25°C . Las plántulas fueron expuestas a tres intensidades de luz durante dos días, con un fotoperíodo de 12 horas diarias, antes de analizar.

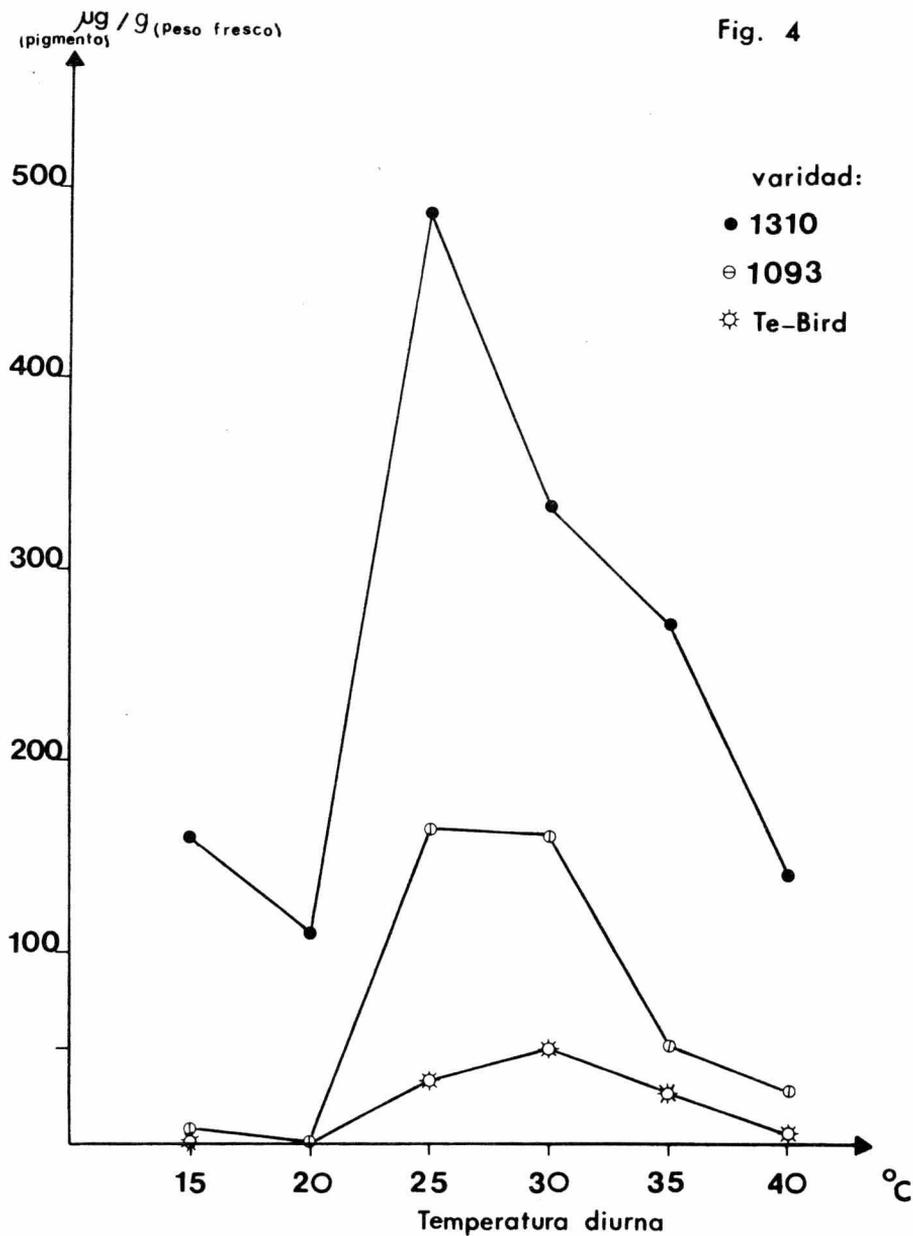
EFECTO DE TEMPERATURA:

Seleccionadas tres variedades y dos intensidades de luz (18,000 y 50,000 lux), plántulas de 14 días de edad, se sometieron a tratamientos de dos días de duración con fotoperíodos de 12 horas, en los que se trató de determinar el efecto de temperaturas, tanto diurnas en donde se seleccionó un rango de: 15° a 40°C, así como nocturnas, en el rango de 0° a 15° C, en relación a la síntesis de antocianinas en hojas.

TEMPERATURAS DIURNAS:

Las hojas de plántulas sometidas a los tratamientos de temperaturas diurnas, fueron extraídas y las fracciones conteniendo el pigmento, se cuantificaron espectrofotométricamente. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 4 y 5, correspondiendo a las respuestas a alta y baja intensidades de luz. Puede observarse que la temperatura es un factor determinante en la producción de antocianinas, pero en un cierto rango óptimo que puede pensarse 20° y 35°, donde se ve incrementada la producción, tanto a alta como a baja intensidades en las tres variedades.

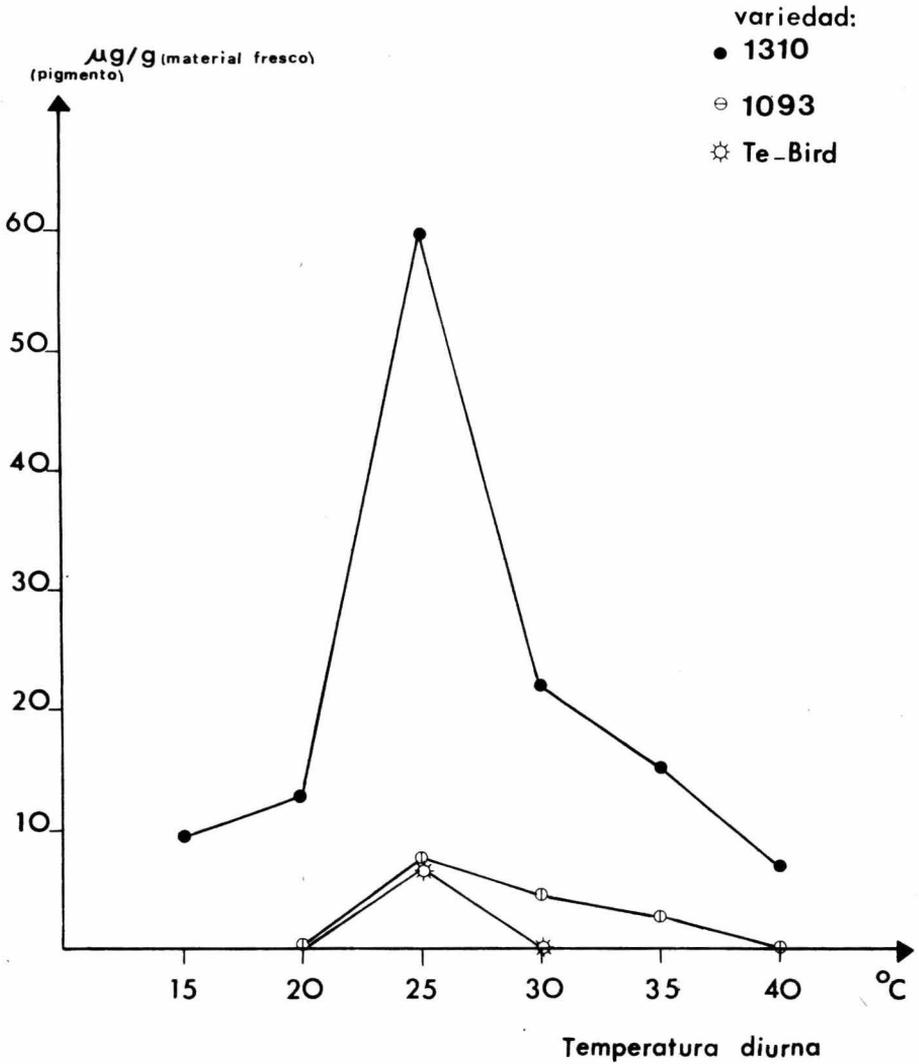
El mismo experimento fue repetido usando ocho variedades, cuyo comportamiento en el campo en relación a la síntesis de antocianinas, había sido observado. El resultado obtenido es similar al que se obtuvo con las tres variedades anteriores. Se observó de los resultados, que se muestran en las figuras: 6,7,8 y 9, que en todos los casos, la respuesta de cada variedad parece seguir un mismo patrón; es decir, un incremento en el rango de temperaturas entre 20° y 35°C, también en dos intensidades de luz que para estas variedades fueron de: 43,000 y 18,000 lux.



EFEECTO DE TEMPERATURAS DIURNAS EN EL DESARROLLO DE COLOR PURPURA EN HOJAS DE SORGO A ALTA INTENSIDAD DE LUZ (50,000 lux).

Plántulas de tres variedades de sorgo de 14 días de edad fueron transferidas del laboratorio hasta una cámara de crecimiento en donde se probaron varias temperaturas diurnas. Las plántulas fueron expuestas a alta intensidad de luz durante dos días para cada temperatura y con un fotoperíodo de 12 horas diarias.

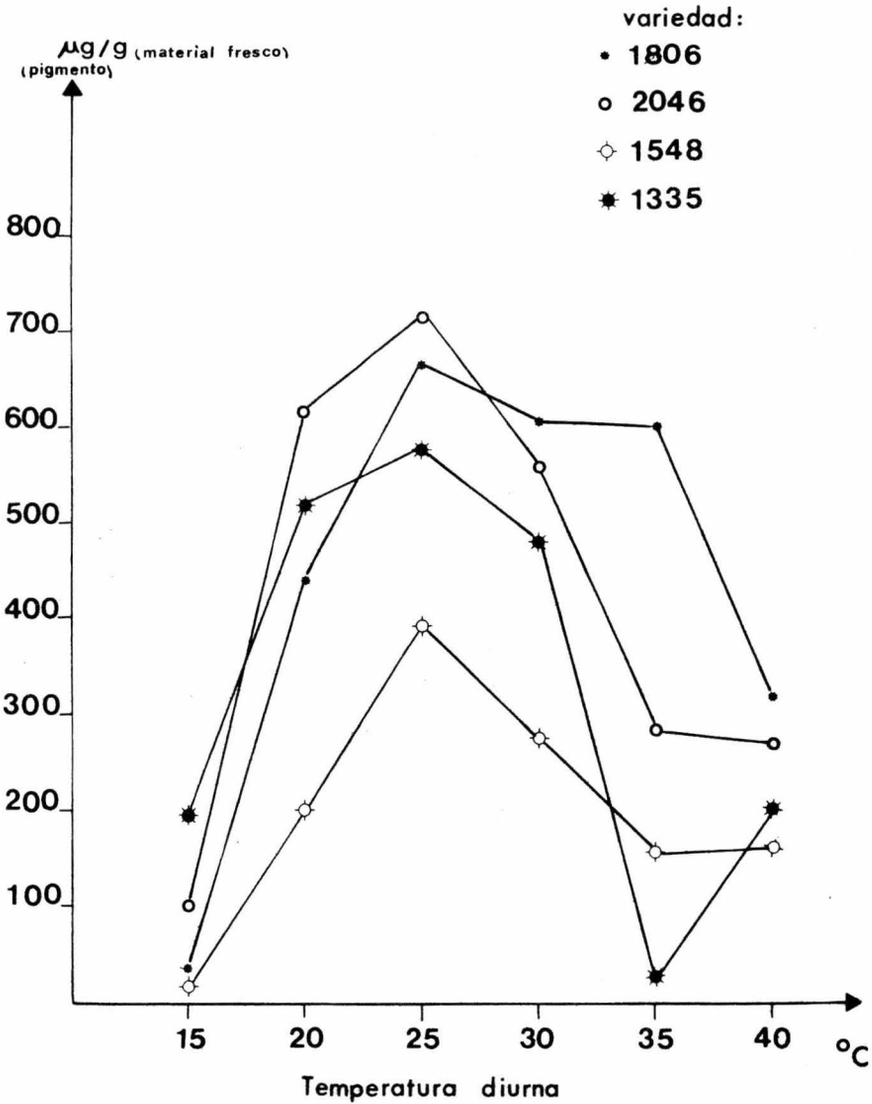
Fig. 5



EFECTO DE TEMPERATURAS DIURNAS EN EL DESARROLLO DE COLOR PURPURA EN HOJAS DE SORGO A BAJA INTENSIDAD DE LUZ (18,000 lux).

Plántulas de tres variedades de sorgo de 14 días de edad fueron transferidas del laboratorio a una cámara de crecimiento en donde se probaron varias temperaturas diurnas. Las plántulas fueron expuestas a baja intensidad de luz durante dos días para cada temperatura y con un fotoperíodo de 12 horas diarias.

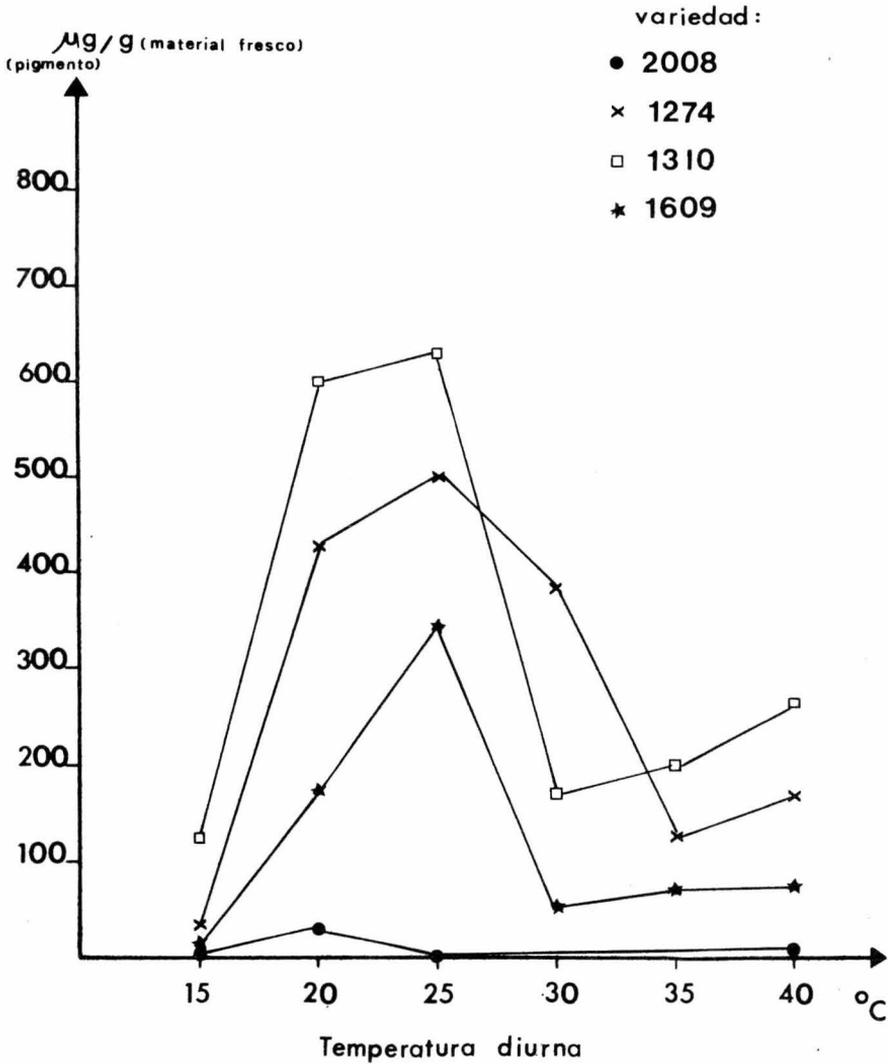
Fig. 6



EFEECTO DE TEMPERATURAS DIURNAS EN EL DESARROLLO DE COLOR PURPURA EN HOJAS DE SORGO A ALTA INTENSIDAD DE LUZ (43,000 lux).

Plántulas de cuatro variedades de sorgo de 14 días de edad fueron transferidas del laboratorio a una cámara de crecimiento en donde se probaron varias temperaturas diurnas. Las plántulas fueron expuestas a alta intensidad de luz durante dos días para cada tratamiento y con un fotoperíodo de 12 horas diarias.

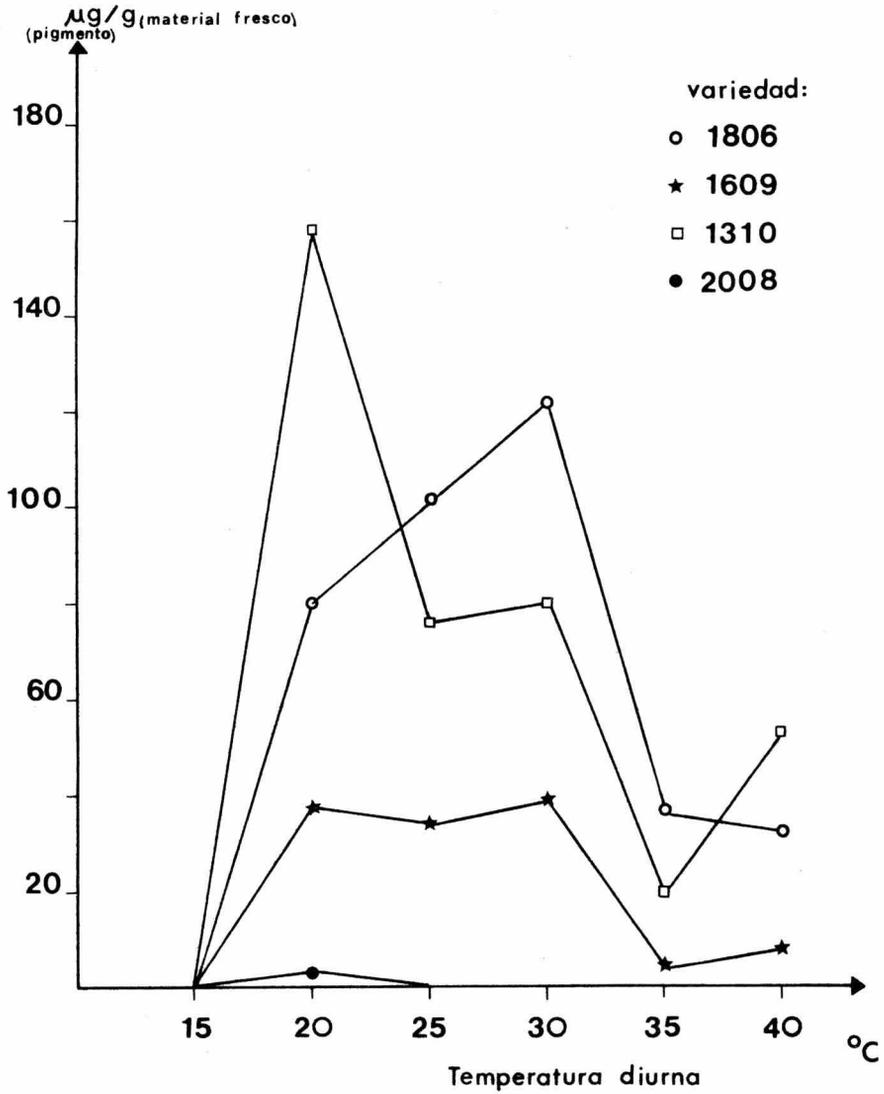
Fig. 7



EFFECTO DE TEMPERATURAS DIURNAS EN EL DESARROLLO DE COLOR PURPURA EN HOJAS DE SORGO A ALTA INTENSIDAD DE LUZ (43,000 lux).

Plántulas de cuatro variedades de sorgo de 14 días de edad fueron transferidas del laboratorio a una cámara de crecimiento en donde se probaron varias temperaturas diurnas. Las plántulas fueron expuestas a alta intensidad de luz durante dos días para cada tratamiento y con un fotoperíodo de 12 horas diarias.

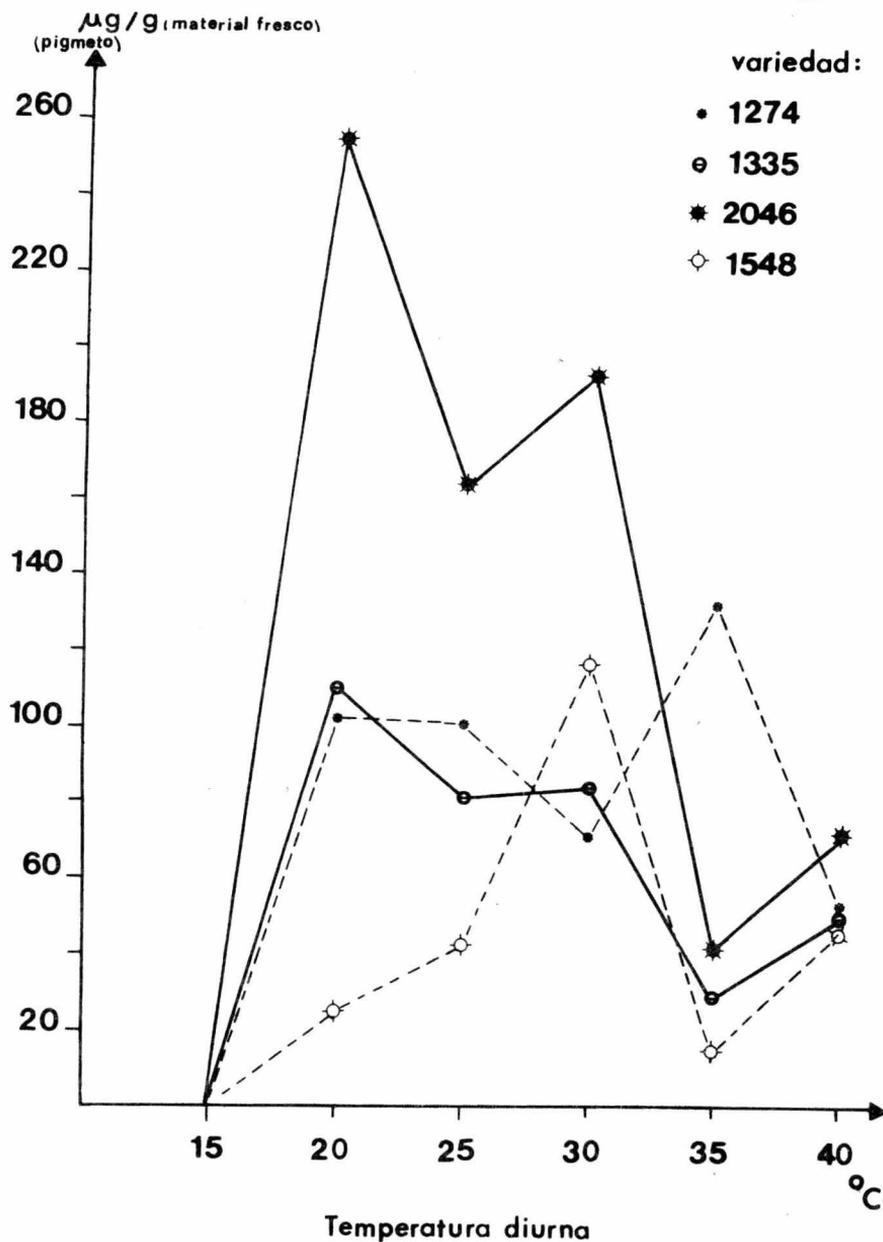
Fig. 8



EFFECTO DE TEMPERATURAS DIURNAS EN EL DESARROLLO DE COLOR PURPURA EN HOJAS DE SORGO A BAJA INTENSIDAD DE LUZ (18,000 lux).

Plántulas de cuatro variedades de sorgo de 14 días de edad fueron transferidas del laboratorio a una cámara de crecimiento en donde se probaron varias temperaturas diurnas. Las plántulas fueron expuestas a baja intensidad de luz durante dos días para cada tratamiento y con un fotoperíodo de 12 horas diarias.

Fig. 9



EFFECTO DE TEMPERATURAS DIURNAS EN EL DESARROLLO DE COLOR PURPURA EN HOJAS DE SORGO A BAJA INTENSIDAD DE LUZ (18,000 lux).

Plántulas de cuatro variedades de sorgo de 14 días de edad fueron transferidas del laboratorio a una cámara de crecimiento en donde se probaron varias temperaturas diurnas. Las plántulas fueron expuestas a baja intensidad de luz durante dos días para cada tratamiento y con un fotoperíodo de 12 horas diarias.

Es necesario señalar, que la interpretación de los resultados de be ser bastante cuidadosa, debido a que en las repeticiones de algunos de los tratamientos, los resultados obtenidos difieren bastante entre sí aún cuando las repeticiones se hicieron bajo las mismas condiciones. Un ejemplo de esta diferencia se muestra en la siguiente tabla, en donde - están los datos de las repeticiones de algunos de los tratamientos de - temperaturas diurnas:

TEMPERATURA	15°	20°	25°	30°	35°	40°	°C
<u>VARIEDAD</u>							
1310	199	113	588	375	328	165	µg/g(p.f.)
	119	109	380	440	194	122	
	116	596	604	167	196	270	
			646			421	
1274	103	427	507	387	124	174	
			493			56	
						326	
						128	
2046	101	614	727	589	283	73	
			701			36	
						411	
						253	

A pesar de que hay tanta variación entre las repeticiones, puede notarse, que las variedades siempre responden en la misma dirección. En el caso de temperaturas diurnas de 25° y 40°C, de las que fue posible tener más repeticiones, aunque hubo mucha diferencia en los resultados con una misma variedad, especialmente en el tratamiento a 40° C, siempre se encontró un pico muy marcado a 25°C.

A pesar de que los datos no son estadísticamente repetitivos, - las diferencias en respuesta a las distintas temperaturas puede conside_rarse bien definida, por lo que es posible pensar que sí existe un pa_ trón al cual responden todas las variedades. A temperaturas menores de - 20°C casi no hay producción de pigmento y a temperaturas mayores de 30°- 35°C hay una disminución en la producción.

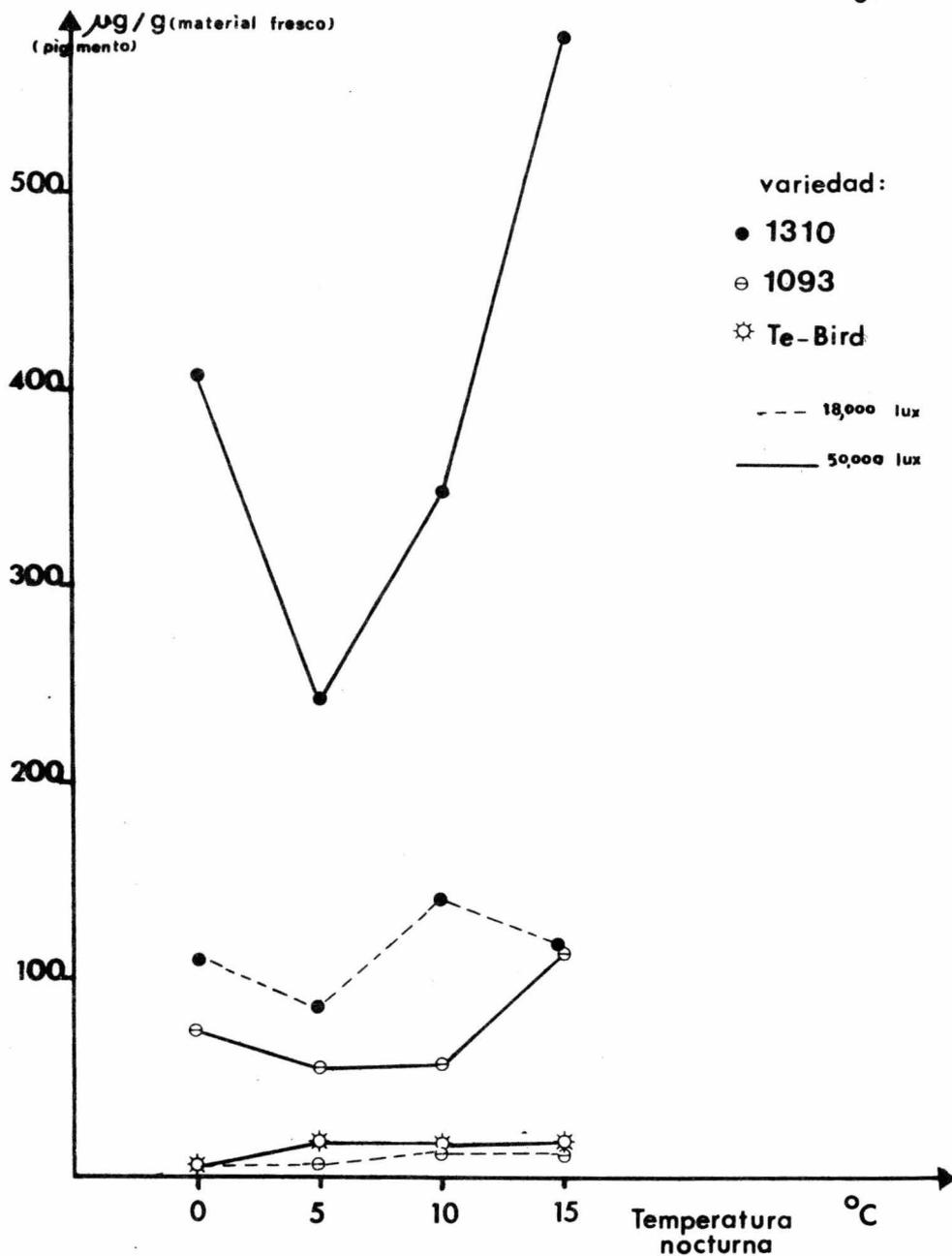
TEMPERATURA NOCTURNA:

Una vez que se vió la respuesta obtenida de las distintas varie_ dades a los tratamientos de temperaturas diurnas, fue necesario ver si su comportamiento era modificado por un cambio brusco de temperaturas (diur_ na y nocturna), como se supone sucede a plantas sembradas a altas altitu_ des, de tal forma que pudiera explicarse el comportamiento de las plantas en el campo en función de éstos cambios.

Para esta experiencia, se usaron únicamente las tres variedades que fueron primeramente seleccionadas para los tratamientos de temperatu_ ras diurnas (1310, 1093 y Te-Bird). Se procedió en forma similar para la extracción y cuantificación del pigmento presente en cada una de las tem_ peraturas probadas. Se seleccionó una temperatura de 30°C constante para los períodos de irradiación, variando en cada tratamiento únicamente la temperatura nocturna.

Los datos obtenidos tanto a alta como baja intensidades de luz, se presentan en la figura 10. Se puede ver, que las temperaturas noctur_ nas bajas no son tan efectivas en modificar el contenido de antocianinas

Fig. 10



EFFECTO DE BAJAS TEMPERATURAS NOCTURNAS EN EL DESARROLLO DE COLOR EN HOJAS DE PLANTULAS DE SORGO.

Plántulas de tres variedades de sorgo de 14 días de edad fueron transferidas del laboratorio a una cámara de crecimiento en donde se probaron varias temperaturas nocturnas, manteniendo a 30°C la temperatura en los periodos de irradiación. Las plántulas fueron expuestas a alta y baja intensidades de luz, dos días para cada tratamiento y fotoperiodo de 12 horas diarias.

como las temperaturas diurnas, sino por el contrario, la síntesis del pigmento se ve disminuida conforme la temperatura baja.

Este resultado sugiere la posibilidad de que la diferencia en comportamiento está más relacionada con las temperaturas diurnas que con las nocturnas.

EXPERIMENTO CON HOJAS AISLADAS:

Este experimento fue realizado con el objeto de probar la hipótesis de que la producción de antocianinas está ligada al nivel de azúcares acumulados en los tejidos de las hojas, condiciones que se producirían debido a una baja proporción de crecimiento, pero una alta actividad fotosintética. De tal forma, que si este es el único criterio controlando la producción de antocianinas, la síntesis debería llevarse a cabo independientemente de cualquier otro factor.

Se empleó la técnica desarrollada por Kohashi (1965). Pedazos de hojas de las mismas tres variedades se colocaron en cajas Petri conteniendo soluciones de distintas concentraciones de sacarosa. Se sometieron a un tratamiento con un fotoperíodo de 12 horas, dos intensidades de luz (50,000 y 18,000 lux) y temperatura de 30° C durante el período de irradiación.

De acuerdo con los resultados obtenidos, que se muestran en la figura 11, se puede apreciar que la presencia de una concentración adecuada de sacarosa, en este caso soluciones 0.01 M y 0.05 M, es donde se tuvo una mayor producción, pero soluciones de mayor concentración no in-

Fig. 11

VARIEDAD	H ₂ O dest.	Sacarosa 0.01 M	Sacarosa 0.05 M	Sacarosa 0.1 M	Sacarosa 0.5 M
* 1310	(+)	+ + + +	+ + + +	+ +	+
* 1093	-	-	+ +	-	(+)
* Te-bird	-	-	-	-	-
o 1310	(+)	+	+	(+)	(+)
o 1093	-	-	(+)	-	(+)
o Te-bird	-	-	-	-	-

+ indica un nivel en el color
 (+) muy poco color
 - no hay color

* Alta intensidad de luz
 o Baja intensidad de luz

DESARROLLO DE COLOR EN HOJAS AISLADAS DE PLANTULAS DE SORGO.

Pedazos de hojas de plántulas de tres variedades, de 14 días de edad, fueron colocados en cajas Petri conteniendo soluciones de varias concentraciones de sacarosa. Las cajas fueron expuestas por dos días en una cámara de crecimiento a 30°C, a dos intensidades de luz con un fotoperíodo de 12 horas diarias.

ducen una mayor producción de pigmento. Además, se encontró que la intensidad de luz es un factor determinante para la mayor o menor producción de antocianinas bajo las mismas condiciones de concentración de sacarosa.

Una interpretación que puede darse a estos resultados es que: se requiere un nivel mínimo de azúcares solubles en la hoja antes de iniciar la síntesis, pero que la síntesis ocurre debida a una activación luminosa.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES:

Una vez terminado este trabajo sobre la producción de antocianinas en plántulas de sorgo, es necesario recordar que la observación que - dió origen a esta investigación fue el hecho de que algunas variedades de sorgo presentan hojas pigmentadas de rojo cuando crecen en los campos experimentales de Chapingo (elevada altitud), mientras que otras variedades no presentan esta coloración, hecho que podría estar relacionado con un ciclo de vida más largo.

Se pensó en Chapingo que el factor responsable para la producción del color y el patrón de crecimiento son las bajas temperaturas nocturnas que se pueden tener a esas altitudes, en particular en primavera durante el inicio del crecimiento de las plantas.

De los resultados se puede decir:

- a) La coloración roja desarrollada por las plántulas de sorgo si es debida a la presencia de antocianinas.
- b) Existe una diferencia de respuesta ante distintos factores ambientales tanto en las distintas variedades, como en las distintas partes de una misma plántula.
- c) Se requiere de una intensidad mínima de luz para la iniciación de la síntesis de antocianinas, abajo de la cual no es posible la producción de antocianinas ni aún en las variedades más sensibles.
- d) La presencia de azúcares solubles también puede favorecer en cierto grado la síntesis de antocianinas en tejidos de hojas, como se vió en el experimento con pedazos de hojas.
- e) La temperatura si es un factor que afecta la producción del pigmento -

en hojas. Pero la idea original de la posible correlación entre la producción del color en hojas y de bajas temperaturas, puede deshecharse casi totalmente, ya que en los tratamientos bajo condiciones controladas con plántulas de sorgo en donde se usaron temperaturas nocturnas en un rango de 0° a 15° C durante las noches, estas no fueron una causa para una mayor producción de pigmento, sin embargo, pudo observarse que las temperaturas diurnas usadas en un rango de 15° a 40°C si tienen efecto en la producción del color, de acuerdo con el comportamiento de las distintas variedades.

Existe un rango de temperaturas diurnas de 20° a 35° C en el que se ve incrementada la producción del pigmento.

Aunque en la mayoría de los experimentos sólo hubo una repetición en las que se encontraron diferencias en los valores obtenidos para un mismo tratamiento, el patrón de comportamiento fue el mismo, es decir se observó siempre un incremento en producción de pigmento en el mismo rango de temperatura.

Así, de los datos obtenidos, se deduce que la síntesis de antocianinas está limitada por factores como son: intensidad de luz, temperatura y concentración de azúcares solubles.

Sin embargo, ninguno de estos factores puede explicar la diferencia cuantitativa que se encontró entre las repeticiones de un mismo tratamiento bajo las mismas condiciones, como es el caso particular del tratamiento de ocho variedades que se sometieron varias veces a un fotoperíodo de 12 horas y temperatura diurna de 40° C, del que se obtuvieron para cada repetición de cada variedad distintos resultados

con una gran diferencia entre ellos.

Podría pensarse, que durante la germinación de las semillas es el momento en que de alguna forma factores ambientales predisponen a las plántulas para manifestar una mayor o menor sensibilidad hacia la síntesis de estos compuestos. Ya que mientras las plántulas alcanzaban el tamaño requerido para los tratamientos permanecieron bajo condiciones de laboratorio, estas estaban expuestas a vapores ambientales y en ocasiones - cambios de temperatura tanto en el día como en la noche.

En relación a la posible diferencia en comportamiento de plantas a más bajas altitudes, en las que se supone no habría producción de pigmento, se tomaron de la literatura datos meteorológicos de dos lugares a distintas altitudes, para compararlos con los datos obtenidos. Los datos se muestran en la siguiente tabla:

TABLA DE TEMPERATURAS REGISTRADAS EN LOS MESES DE: MAYO, JUNIO Y JULIO EN CUAUTLA Y TEXCOCO.

	Temperatura diaria media °C	Temperatura promedio máxima diaria °C	Temperatura promedio mínima diaria °C
Cuatla (1302 m snm)			
Mayo	24.7	32.6	10.7
Junio	23.1	30.5	15.2
Julio	22.3	29.5	15.8
Texcoco (2249 m snm)			
Mayo	19.1	27.8	10.5
Junio	18.4	25.2	11.7
Julio	17.6	24.2	10.9

En términos de temperaturas e intensidades de luz, que en los - dos lugares debe ser superior a la intensidad mínima necesaria, ambos lugares serían propicios para la producción del pigmento en las distintas variedades. Pero ya que no se sabe cual sería el comportamiento de las plantas a una intensidad de luz mayor a la usada en las cámaras de crecimiento bajo - las distintas condiciones de temperatura, no es posible asegurar que tal diferencia no existe.

No obstante, la aparición de antocianinas en hojas debe estar relacionada con una función bien definida, que podría pensarse que es una respuesta de la planta para adaptarse a circunstancias ambientales.

APENDICE

TABLA A Observaciones diarias del incremento del color púrpura en hojas de plántulas de once variedades de sorgo, de 8 días de edad fueron expuestas directamente a la luz solar, después de haber permanecido en el laboratorio. (Exposición de ocho horas diarias aproximadamente).

Día:	1			2			3			4			5			6			7			
VARIEDAD	C	V	H	C	V	H	C	V	H	C	V	H	C	V	H	C	V	H	C	V	H	
1310	++			++	++		+++	++	+	+++	++	++	+++	++	++	+++	++	+++	+++	++	++	++
2046	+			++	+		+++	++	+	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	++	++	+++
1274	++			++	+		+++	+	+	+++	+	++	+++	+	++	+++	++	+++	+++	++	++	+++
Otomf	+			+			++	+		+++	+	+	+++	+		+++	+	++	++	+	+	+
1806	+			++	+		++	+	+	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	++	++	++
Te-71	-			-			-			-			-			-			-			
Te-Bird	-			-			-			-			-			(+)			(+)			
Erel-707	-			-			-			-			-			-			-			
8311	+			+	+		++	++	+	+++	++	+	+++	++		+++	++	(+)	+++	+++	+	
Dekalb-F	+	+		++	+		+++	++		+++	++		+++	++		+++	++		+++	++	+	
1093	-			+			++	+		++	+		++	+		+	+		++	++	+	

(+) muy poco color
 + un grado de color
 - no hay color

C= coleoptilo

V= vaina

H= hojas

TABLA B Observaciones diarias del incremento del color púrpura en hojas de plántulas de once variedades de sorgo, de 10 días de edad fueron expuestas a la luz directa del sol, - después de haber permanecido en el laboratorio.

Día:	1			2			3			4			5			6		
VARIEDAD	C	V	H	C	V	H	C	V	H	C	V	H	C	V	H	C	V	H
1310	+	+	+	+++	++	++	++	++	+	++	++	+	+++	++	(+)	+++	++	++
2046	++	+	+	+++	++	++	++	++	+	+++	++	+	+++	++	(+)	+++	++	++
1274	++			++	+	+	++	+	(+)	++	+	(+)	++	++	(+)	+++	++	+
Otomf	+	+		++	+		++	+		++	+		++	+		++	+	+
1806	++	+		+++	+	+	+++	++	+	+++	++	+	+++	++	+	+++	++	+
Te-71	-			-			-			-			-			-		
Te-Bird	(+)			(+)			-			-			-			-		
Exel-707	-			-			-			-			-			-		
8311	++	+		+++	++	(+)	+++	++		+++	+		+++	++	(+)	+++	+++	+
Dekalb-F	+	+		++	++	(+)	++	+		+++	++	+	+++	++	+	+++	++	+
1093	+			++	+		++	+		++	+		++	+		++	+	(+)

Estas variedades sirvieron como CONTROL para las observaciones del desarrollo del pigmento, en el tratamiento de disminución de luz incidente mediante el uso de capas de gasa en lotes de las mismas variedades.

C= coleoptilo

V= vaina

H= hojas

(+) muy poco color
 + un grado de color
 - no hay color

TABLA C Observaciones diarias del incremento del color púrpura en hojas de plántulas de once variedades, de 10 días de edad fueron expuestas a la luz solar cubiertas con 4 capas de gasa, después de haber permanecido en el laboratorio.

Dfa:	1			2			3			4			5			6		
	V	H	C	V	H	C	V	H	C	V	H	C	V	H	C	V	H	
1310	++	+	+	+++	++	+	+++	++	+	+++	+	(+)	+++	++	+	+++	++	+
2046	++	+		+++	++	+	+++	++	+	+++	++	+	+++	++	+	+++	++	+
1274	++	(+)		++	+		+++	+		+++	+		+++	+		+++	+	
Otomf	+	+		++	+		+++	+		+++	(+)		+++	(+)		+++	++	++
1806	+	+		+++	+		++	(+)		+++	+		+++	+		+++	++	+
Te-71	-			-			-			-			-			-		
Te-Bird	-			(+)			(+)			-			-			-		
Exel-707	-			-			-			-			-			-		
8311	++	+		+++	+	(+)	+++	++	(+)	+++	++	(+)	+++	++	(+)	+++	++	(+)
Dekalb-F	++	++		+++	++	(+)	+++	++	(+)	+++	++	(+)	+++	++	(+)	+++	++	(+)
1903	+	+		++	+		++	+		++	+		+++	++		+++	++	

(+) poco color

C= coleoptilo

V= vaina

H= hojas

+ un grado de color

- no hay color

TABLA D Observaciones diarias del incremento del color púrpura en hojas de plántulas de once variedades de sorgo, de 10 días de edad, fueron expuestas a la luz solar cubiertas con 8 capas de gasa, después de haber permanecido en el laboratorio.

Día:	1			2			3			4			5			6		
VARIEDAD	C	V	H	C	V	H	C	V	H	C	V	H	C	V	H	C	V	H
1310	**	+		++	+	(+)	++	+		++	+		+++	++		+++	++	+
2046	++	+		++	+	+	++	+	+	++	+	(+)	++	++	+	+++	++	+
1274	+	+		++	+		+	+		++	+		++	+		++	+	
Otomf	+	+		++	+		++	+		++	+		++	+		++	+	
1806	++	+		++	+		++	+		++	+		++	+		++	+	
Te-71	-			-			-			-			-			-		
Te-Bird	-			-			-			-			-			-		
Exel-707	-			-			-			-			-			-		
8311	++	+		++	+		++	+		+++	+	(+)	+++	+	(+)	+++	++	(+)
Dekalb-F	++	+		++	+		++	+	(+)	+++	+	(+)	+++	++	(+)	+++	++	(+)
1903	(+)			(+)			(+)			(+)			+			+	+	

(+) muy poco color

+ un grado de color

- no hay color

C= coleoptilo

V= vaina

H= hojas

TABLA E Observaciones diarias del incremento del color púrpura en hojas de plántulas de once variedades de sorgo, de 10 días de edad, fueron expuestas a la luz solar cubiertas - con 16 capas de gasa, después de haber permanecido en el laboratorio.

Dfa:	1			2			3			4			5			6		
VARIEDAD	C	V	H	C	V	H	C	V	H	C	V	H	C	V	H	C	V	H
1310	++	+		++	+	(+)	+	+		++	+		++	+		++	+	(+)
2046	++	+		++	+		++	++		++	+		++	+		++	+	
1274	+			++			+			+			+			+		
Otomf	+	(+)		+	(+)		++	(+)		+	(+)		+			+		
1806	+	+		++	+		++			+	(+)		++	+		++	+	
Te-71	-			-			-			-			-			-		
Te-Bird	-			-			-			-			-			-		
Exel-707	-			-			-			-			-			-		
8311	(+)			++	+		++	+		+	+		++	+		++	+	
Dekalb-F	+	+		++	+		++	++		++	+		++	++		++	+	
1903	+			+			+			+			+			+		

(+) muy poco color C= coleoptilo V= vaina H= hojas
 + un grado de color
 - no hay color

TABLA F

VALORES OBTENIDOS EN LOS TRATAMIENTOS DE TEMPERATURA DIURNA PARA LAS
 VARIEDADES: 1310, 1093 y Te-Bird, A ALTA INTENSIDAD DE LUZ (50,000
 lux).

TEMPERATURA:	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C
VARIEDAD 1310						
$\mu\text{g/g}(\text{peso fresco})$	199. 119	113 109	588 380	375 440 236 291	194 188 376 328	165 122
$\mu\text{g/planta}$	4 3	4 4	12 11	9 12 14 15	11 11 7 7	3 3
VARIEDAD 1093						
$\mu\text{g/g}(\text{peso fresco})$	4 12	0.3 0	146 181	204 133 115 185	33 30 110 38	31 30
$\mu\text{g/planta}$	0.2 0.3	0 0	5 5	6 9 8 6	6 3 2 1	1 1
VARIEDAD Te-Bird						
$\mu\text{g/g}(\text{peso fresco})$	0 0	0 0	43 25	40 27 70 63	8 5 52 47	10 4
$\mu\text{g/planta}$	0 0	0 0	2 0.8	4 3 3 2	3 3 0.4 0.3	0.4 0.1

TABLA G

VALORES OBTENIDOS EN LOS TRATAMIENTOS DE TEMPERATURA DIURNA PARA LAS
 VARIEDADES: 1310, 1093 y Te-Bird, A BAJA INTENSIDAD DE LUZ (18,000
 lux).

TEMPERATURA:	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C
VARIEDAD 1310						
µg/g(peso fresco)	11 9	13	56 64	15 13 33 27	10 15 23 15	7
µg/planta	0.3 0.3	0.4	1 2	0.9 0.9 0.5 0.6	1 0.5 0.4 0.7	0.2
VARIEDAD 1093						
µg/g(peso fresco)	0	0	8 7	5 7 2	6 2 1	0
µg/planta	0	0	0.3 0.2	0.1 0.3 0.4	0.1 0.4 0	0
VARIEDAD Te-Bird						
µg/g(peso fresco)	0	0	7 7	0	0	0
µg/planta	0	0	0.3 0.3	0	0	0

TABLA II

VALORES OBTENIDOS DE LOS TRATAMIENTOS CON TEMPERATURA NOCTURNA PARA LAS VARIEDADES: 1310, 1093 y Te-Bird, A ALTA INTENSIDAD DE LUZ (- 50,000 lux) Y TEMPERATURA DIURNA CONSTANTE DE 30°C.

TEMPERATURA:	0°C	5°C	10°C	15°C
VARIEDAD 1310				
$\mu\text{g/g}$ (peso fresco)	376	210	347	679
	376	243	330	482
	468	274		
	417			
$\mu\text{g/planta}$	12	8	13	21
	11	9	12	17
	15	9		
	15			
VARIEDAD 1093				
$\mu\text{g/g}$ (peso fresco)	34	86	48	90
	65	36	61	136
	100	38		
	98	54		
$\mu\text{g/planta}$	1	4	2	6
	2	2	4	7
	5	2		
	4	3		
VARIEDAD Te-Bird				
$\mu\text{g/g}$ (peso fresco)	4	30	14	18
	6	6	18	17
	7			
$\mu\text{g/planta}$	0.2	0.1	0.6	0.8
	0.2	1	0.9	0.7
	0.6			

TABLA I

VALORES OBTENIDOS DE LOS TRATAMIENTOS CON TEMPERATURAS NOCTURNAS PARA LAS VARIETADES: 1310, 1093 y Te-Bird, A EAJA INTENSIDAD DE LUZ (18,000 lux) Y TEMPERATURA DIURNA CONSTANTE DE 30°C.

TEMPERATURA:	0°C	5°C	10°C	15°C
VARIEDAD 1310				
$\mu\text{g/g}$ (peso fresco)	117 131 118 82	100 78 79 98	134 150	92 136
$\mu\text{g/planta}$	4 4 3 3	3 3 2 2	5 5	5 3
VARIEDAD 1093				
$\mu\text{g/g}$ (peso fresco)	7 6 7 20	14 4 6	15 11	15 12
$\mu\text{g/planta}$	0.3 0.3 0.3 1	0.7 0.2 0.2	0.8 0.4	0.8 0.7
VARIEDAD Te-Bird				
$\mu\text{g/g}$ (peso fresco)	0	0	0	0
$\mu\text{g/planta}$	0	0	0	0

TABLA J (continuación)

TEMPERATURA:	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C
VARIEDAD 1548						
$\mu\text{g/g}$ (peso fresco)	16	200	370 410	277	154	165 25 336 132
$\mu\text{g/planta}$	0.4	8	14 13	11	3	5 0.3 10 5
VARIEDAD 1609						
$\mu\text{g/g}$ (peso fresco)	13	171	392 294	133	57	58 4 120 34
$\mu\text{g/planta}$	0.5	6	15 7	6	1	2 0 3 1
VARIEDAD 1806						
$\mu\text{g/g}$ (peso fresco)	34	439	739 592	606	600	318 107 354 218
$\mu\text{g/planta}$	0.9	14	28 20	28	11	11 1 11 7
VARIEDAD 2008						
$\mu\text{g/g}$ (peso fresco)	0	32	0 3	4	4	7 0 4 7

TABLA J (continuación)

TEMPERATURA:	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C
VARIEDAD 2008						
μg/ planta	0	1	0 0.1	0.1	0.1	0.2 0 0.1 0.2
VARIEDAD 2046						
μg/g(peso fresco)	101	614	727 701	589	283	73 36 411 253
μg/planta	3	27	34 27	28	8	2 0.6 15 9

TABLA K

VALORES OBTENIDOS PARA OCHO VARIEDADES DURANTE TRATAMIENTOS DE TEMPERATURAS DIURNAS A BAJA INTENSIDAD DE LUZ (18,000 lux).

TEMPERATURA:	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C
VARIEDAD 1274						
$\mu\text{g/g}(\text{peso fresco})$	6	115	102	75	137	53
$\mu\text{g/planta}$	0.1	3	3	2	3	2
VARIEDAD 1310						
$\mu\text{g/g}(\text{peso fresco})$	0	159	76	80	20	53
$\mu\text{g/planta}$	0	4	2	3	0.4	1
VARIEDAD 1335						
$\mu\text{g/g}(\text{peso fresco})$	0	130	81	85	29	50
$\mu\text{g/planta}$	0	3	2	2	0.5	1
VARIEDAD 1548						
$\mu\text{g/g}(\text{peso fresco})$	0	27	43	118	18	53
$\mu\text{g/planta}$	0	0.8	2	6	0.4	1
VARIEDAD 1609						
$\mu\text{g/g}(\text{peso fresco})$	0	38	33	40	5	8
$\mu\text{g/planta}$	0	1	2	1	0.1	0.2
VARIEDAD 1806						
$\mu\text{g/g}(\text{peso fresco})$	0	81	103	122	4	33
$\mu\text{g/planta}$	0	2	3	5	1	0.9
VARIEDAD 2008						
$\mu\text{g/g}(\text{peso fresco})$	0	3	0	0	0	0

TABLA K (continuación)

TEMPERATURA:	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C
VARIEDAD 2008						
ng/planta	0	0.1	0	0	0	0
VARIEDAD 2046						
ng/g(peso fresco)	0	257	165	193	42	73
μg/planta	0	9	8	9	1	2

BIBLIOGRAFIA

1. Bonner, J. and Varner, J.E.
Plant Biochemistry
Academic Press
N.Y. (1965).
2. Craker, L.E., Standley, L.A. and Starbuck, M.J. (1971). Ethylene control of anthocyanin synthesis in sorghum. *Plant Physiol.* 48, 349-352.
3. Dedio, W., Kaltsikes, P.J. and Larter, E.N. (1969). The anthocyanins of Secale cereale. *Phytochemistry.* 8 , 2351-2352.
4. Downs, R.J. and Siegelman, H.W. (1963). Photocontrol of anthocyanin synthesis in Milo seedlings. *Plant Physiol.* 38, 25-30.
5. Fong, R.A. Weeb, A.D. and Kepner, R.E. (1974). Acylated anthocyanins in a hybrid vitis variety. *Phytochemistry.* 13 , 1001-1004.
6. Francis, F.J. and Harborne, J.B. (1966). Anthocyanins and flavonol glycosides of magnolia flowers. *Amer. Soc. Hort. Sci.* 89, 657-665.
7. Fuleki, T. and Francis, F.J. (1967). Lead acetate as chromogenic - reagent for anthocyanins. *Phytochemistry.* 6 , 1161-1163.
8. Fuleki, T. and Francis, F.J. (1967). Standards for quantitative - analysis of anthocyanins. *Amer. Soc. Hort. Sci.* 91 , 894-98.
9. Fuleki, T. and Francis, F.J. (1967). A new developing solvent for - paper chromatography of various phenolic compounds, sugars and amino acids. *J. Chromatog.* 26 , 404-411.
10. Fuleki, T. and Francis, F.J. (1968). Quantitative methods for anthocyanins. 1. Extraction and determination of total anthocyanin in - cranberries. *J. Food Sci.* 33 , 72-77.

11. Fuleki, T. and Francis, F.J. (1968). Quantitative methods for anthocyanins. 2. Determination of total anthocyanin and degradation index for cranberry juice. *J. Food Sci.* 33, 78-83.
12. Fuleki, T. and Francis, F.J. (1968). Quantitative methods for anthocyanins. 3. Purification of cranberry anthocyanins. *J. Food. Sci.* 33, 266-274.
13. Goodwin, T.W. (ed).
Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments.
Academic Press
London (1965).
14. Harborne, J.B. (1958). Spectral methods of characterizing anthocyanins. *Biochem. J.* 70, 22-28.
15. Harborne, J.B. (1958). The chromatographic identification of anthocyanin pigments. *Journal of Chromatography.* 1, 473-488.
16. Harborne, J.B. and Hall, E. (1964). Plant Polyphenols - XIII. The systematic distribution and origin of anthocyanins containing branched trisaccharides. *Phytochemistry.* 3, 453-463.
17. Harborne, J.B.
Comparative Biochemistry of the flavonoids.
Academic Press
N.Y. (1967).
18. Kohashi, J. (1965). Studies on the biosynthesis of anthocyanins in Zea mays L. Ph. D. Thesis. Harvard University.
19. Ku, Ping-Kuang and Mancinelli, A.L. (1972). Photocontrol of anthocyanin synthesis. *Plant. Physiol.* 49, 212 - 217.

20. Less, D.H. and Francis, F.J. (1971). Quantitative methods for anthocyanins. *J. Food Sci.* 36 , 1056-1059.
21. Martin, F.W. (1970). Compounds of stigmatic surface of Zea mays L. *Ann. Bot.* 34 , 835-842.
22. Murty, B.R. and Ram, J. (1966). Pattern of anthocyanin pigment in a world collection of sorghum. I. *J. Genet. P.* 26, 246-254.
23. Pollock, H.G., Vickery, R.K. Jr. and Wilson, K.G. (1967). Flavonoid pigments in Mimulus cardinalis and its related species. I. Anthocyanins. *Amer. J. Bot.* 54 , 695-701.
24. Sakellarides, H.C. and Luh, B.S. (1974). Anthocyanins in barberry - grapes. *J. Food Sci.* 39 , 329-333.
25. Stafford, H.A. (1965). Flavonoids and related compounds in the first internode of Sorghum vulgare pers. in darkness and light. *Plant - Physiol.* 40 , 130-138.
26. Stafford, H.A. (1966). Regulatory mechanisms in anthocyanin biosynthesis in first internodes of Sorghum vulgare: effect of presumed inhibitors of protein synthesis. *Plant Physiol.* 41 , 953-961.
27. Steward, F.C. (ed).
Plant Physiology. Vol. III. Inorganic Nutrition of Plants.
Academic Press
N.Y. (1963).
28. Tanchev, S.S. and Timberlake, C.F. (1969). Anthocyanins in leaves of Cotinus coggygria. *Phytochemistry.* 8 , 2367-2369.
29. Taylor, A.O. and Rowley, J.A. (1971). Plants under climatic stress. *Plant Physiol.* 47 , 713-718.

30. Van Buren, J.P., Hrazdina, G. and Robinson, W.B. (1974). Color of - anthocyanin solutions expressed in lightness and chromaticity terms. J. Food Sci. 39 , 325-327.
31. Vince, D. (1968). Growth and anthocyanin synthesis in excised sorghum internodes. Planta. 82 , 261-279.
32. Zucker, M. (1972). Light and enzymes. Ann. Rev. Plant Physiol. 23 , 133-156.