

4
29

00562

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO DE LA ACUMULACION DE BETACIANINAS EN
Amaranthus hypochondriacus sp.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS (BIOQUIMICA)
p r e s e n t a
Q.F.B. MARIA LETECIPIA RAMIREZ

MEXICO, D.F.

1 9 9 3

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

CONTENIDO

	pág.
INDICE DE CUADROS Y FIGURAS	iv
ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	x
I. - INTRODUCCION	1
II. - REVISION DE LITERATURA	3
2.1. - BETACIANINAS	3
2.1.1. - Estructura química	3
2.1.2. - Distribución en la naturaleza	5
2.1.3. - Expresión genética	6
2.1.4. - Biosíntesis y degradación	6
2.1.5. - Factores que afectan su biosíntesis	9
2.1.5.1. - Luz	9
2.1.5.2. - Fitoreguladores	11
2.1.6. - Función biológica	12
2.2. - ESTRES DE DEFICIT DE AGUA	13
2.2.1. - Parámetros que regulan el estado hídrico de una planta	13
2.2.3. - Efecto del estrés en la producción de metabolitos secundarios	17
2.3. - PAPEL DE LA SACAROSA EN LA BIOSÍNTESIS DE METABOLITOS SECUNDARIOS	17
2.3.1. - Papel de la sacarosa como nutrimento	17
2.3.2. - Regulación del movimiento de azúcares (sacarosa)	18
2.3.3. - Papel de los azúcares en la producción de metabolitos secundarios	19
2.4. - AMARANTO	20
III. - HIPOTESIS Y OBJETIVOS	21
IV. - MATERIALES Y METODOS	23
4.1. - EXPLANTES	23
4.1.1. - Material biológico	23
4.1.2. - Estrés en explantes	23
4.1.3. - Medición del contenido relativo de agua	23
4.1.4. - Cuantificación de betacianinas en explantes	25

	Pág.
4.2.-PLANTULAS SIN RAIZ	25
4.2.1.- Esterilización de semillas.	25
4.2.2.-Incubación	25
4.2.3.-Implementación de la metodología para la determinación de betacianinas en plántulas	25
4.2.3.1.- Extracción y cuantificación de betacianinas	28
4.2.4.-Protocolo general de trabajo	27
4.2.5.-Medición del potencial osmótico de agua	28
4.2.6. Determinación del potencial osmótico de las plántulas.	28
4.2.7.- Determinación de proteínas.	28
4.2.8.- Ensayo de la actividad de la enzima decolorasa	29
4.2.8.1.-Obtención del extracto proteínico	29
4.2.8.2.-Obtención del extracto de pigmento (betacianina)	29
4.2.8.3.- Actividad enzimática	29
4.2.9.- Determinación de carbohidratos .	30
V.-RESULTADOS Y DISCUSION	31
5.1. Búsqueda de el modelo adecuado para el estudio de acumulación de betacianinas por estrés de potenciales osmóticos bajos en <i>Amaranthus</i> <i>hipochondriacus</i> L.	31
5.1.1. Explantes	31
5.1.2. Plántulas completas	34
5.1.3 Plántula sin raíz	37
5.2.- CONDICIONES QUE HACEN VARIAR LA CAPACIDAD DE RESPUESTA DE ACUMULACION DE BETACININAS EN PLANTULAS DE TRES DIAS DE EDAD, SIN RAIZ.	37
5.2.1. Selección del pH óptimo y del amortiguador de incubación	38
5.2.2.- Determinación de la concentración adecuada de tirosina	38
5.2.3. Temperatura de respuesta	38
5.2.4. Efecto de los estímulos luminosos sobre el sistema.	42
5.2.5.- Determinación del tiempo óptimo de respuesta a estrés después del estímulo luminoso	46

	Pág.
5.3.-PARAMETROS QUE HACEN VARIAR LA ACUMULACION DE BETACIANINAS (EN PLANTULAS AMARANTO DE TRES DIAS DE EDAD, SIN RAIZ), COMO RESPUESTA A LA PRESENCIA DE SOLUCIONES CON POTENCIALES OSMOTICOS BAJOS.	46
5.3.1. Evaluación del potencial hídrico original de las plántulas.	46
5.3.2. Efecto de sacarosa	48
5.3.3.- Participación de la sacarosa como soluto modificador del potencial osmótico.	48
5.3.3.1.- Respuesta a concentraciones bajas de sacarosa.	53
5.3.3.2.- Respuesta a concentraciones altas de sacarosa	56
5.5.3.3.- RESPUESTA A POTENCIALES OSMOTICOS CONSTANTES.	58
RESPUESTA A CONCENTRACIONES DE SACAROSA Y DE PEG AJUSTADOS A UN MISMO POTENCIAL OSMÓTICO.	58
EFECTO DE MANITOL Y SACAROSA A POTENCIAL OSMÓTICO CONSTANTE.	61
5.3.4.-PARTICIPACION DE LA SACAROSA EN LA ACUMULACION DE BETACIANINAS COMO APORTADOR DE FOTOSINTATOS.	63
DETERMINACION DE BETACIANINAS EN PRESENCIA DE GLUCOSA Y FRUCTOSA	66
MODELO DE LA PARTICIPACION DE ESTRES DE DEFICIT DE AGUA Y CARBOHIDRATOS EN LA ACUMULACION DE BETACIANINAS.	66
5.4.- CINETICA DE ACUMULACION DE BETACIANINAS EN CONDICIONES DE REPUESTA OPTIMAS	70
5.4.1. Cuantificación de betacianinas en función del tiempo de incubación.	70
5.4.2.- Papel de la enzima decolorasa en la acumulación de betacianinas	70
VI.- CONCLUSIONES	77
VII.- BIBLIOGRAFIA	78

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLA:	Pág.
1 Relación de densidades ópticas en la extracción de clorofilas de explantes de hojas de amaranto	24
2 Estabilidad de los diferentes extractos de betacianinas	26
3 Efecto de la temperatura de incubación sobre la acumulación de betacianinas.	42

FIGURAS:

1 Estructura de las betacianinas.	4
2 Esquema de biosíntesis de betacianinas.	7
3 Catabolismo enzimático y espontaneo de betacianinas.	8
4 Esquema de trabajo con el modelo experimental de plántulas	27
5 Respuesta en la acumulación de betacianinas y en el contenido relativo de agua de explantes en presencia de luz.	32
6 Respuesta de explantes de hojas en la acumulación de betacianinas y contenido relativo de agua en presencia de polietilen-glicol al 12%, incubadas en oscuridad.	33
7 Relación peso seco/peso fresco en explantes de siete semanas sometidos a estrés de déficit de agua en polietilen-glicol al 12% por diferentes períodos bajo luz u oscuridad.	35
8 Acumulación de betacianinas en explantes en función del contenido relativo de agua en presencia de luz o oscuridad.	36

- 9 Efecto de pH y del tipo de amortiguador sobre la acumulación de betacianinas en plántulas de *Amaranthus hypochondriacus* de tres días de edad desprovistas de raíz, sumergidas en amortiguador tris-tirosina y hepes-tirosina durante 24 h. 39
- 10 Efecto de pH con mezcla de amortiguadores (HEPES-TRIS) sobre la acumulación de betacianinas en plántulas de *Amaranthus hypochondriacus* de tres días de edad desprovistas de raíz, sumergidas en amortiguador hepes-tris-tirosina durante 24 h. 40
- 11 Efecto de diferentes concentraciones de tirosina sobre la acumulación de betacianinas en plántulas de *Amaranthus hypochondriacus* de tres días de edad desprovistas de raíz, sumergidas en amortiguador tris-tirosina durante 24 horas. 41
- 12 Respuesta sobre la acumulación de betacianinas en plántulas de *Amaranthus hypochondriacus* de tres días de edad desprovistas de raíz, sumergidas en amortiguador tris-tirosina durante 24 horas incubadas a diferentes periodos e intensidades de estímulos luminosos. 43
- 13 Acumulación de betacianinas a diferentes periodos de estímulos luminosos. 45
- 14 Acumulación de betacianinas en función del tiempo de incubación en plántulas de *Amaranthus hypochondriacus* de tres días de edad desprovistas de raíz, sumergidas en amortiguador tris-tirosina. 47
- 15 Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa en la acumulación de betacianinas en plántulas de *Amaranthus hypochondriacus* de tres días de edad desprovistas de raíz. 49

	pág.	
16	Esquema para determinar el papel de la sacarosa en la acumulación de betacianinas.	50
17	Ajuste de potencial osmótico en plántulas de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> de tres días de edad desprovistas de raíz después de 5 horas de estímulo luminoso en presencia de sacarosa.	51
18	Efecto de sacarosa sobre peso seco, peso fresco y longitud en plántulas de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> de tres días de edad desprovistas de raíz después de 5 horas de estímulo luminoso.	52
19	Acumulación de betacianinas en plántulas de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> de tres días de edad, desprovistas de raíz, después de 5 horas de estímulo luminoso bajo efecto de polietilén-glicol y concentraciones mínimas de sacarosa (20 mM).	54
20	Ajuste de potencial osmótico en plántulas de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> de tres días de edad desprovistas de raíz después de 5 horas de estímulo luminoso, en presencia de sacarosa 20 mM y concentraciones variables de PEG.	55
21	Acumulación de betacianinas bajo agentes estresantes PEG y manitol a concentración de 100 mM de sacarosa en plántulas de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> de tres días de edad desprovistas de raíz después de 5 horas de estímulo luminoso.	57

- 22 Ajuste de potencial osmótico en plántulas de *Amaranthus hypochondriacus* de tres días de edad desprovistas de raíz después de 5 horas de estímulo luminoso, en presencia de sacarosa 100 mM. 59
- 23 Respuesta de acumulación de betacianinas a ψ_{H_2O} constante ajustado con PEG-sacarosa o manitol-sacarosa, en plántulas de *Amaranthus hypochondriacus* de tres días de edad desprovistas de raíz, después de 5 horas de estímulo luminoso. 60
- 24 Ajuste osmótico a ψ_{H_2O} constante (0.449 MPa) ajustado con PEG-sacarosa o manitol-sacarosa en plántulas de *Amaranthus hypochondriacus* de tres días de edad desprovistas de raíz, después de 5 horas de estímulo luminoso. 62
- 25 Acumulación de carbohidratos en la plántula en presencia diferentes concentraciones de sacarosa en el medio de incubación, en plántulas de *Amaranthus hypochondriacus* de tres días de edad desprovistas de raíz después de 5 horas de estímulo luminoso. 64
- 26 Acumulación de carbohidratos solubles totales a ψ_{H_2O} constante ajustado con PEG-sacarosa o manitol-sacarosa en plántulas de *Amaranthus hypochondriacus* de tres días de edad desprovistas de raíz, después de 5 horas de estímulo luminoso. 65
- 27 Respuesta en la acumulación de betacianinas a la presencia de glucosa y fructosa en plántulas de *Amaranthus hypochondriacus* de tres días de edad desprovistas de raíz después de 5 horas de estímulo luminoso. 67

- 28 Efecto de glucosa, fructosa y sacarosa sobre peso fresco, peso seco a diferentes concentraciones, en plántulas de *Amaranthus hypochondriacus* de tres días de edad desprovistas de raíz después de 5 horas de estímulo luminoso. 68
- 29 Cinética de acumulación de betacianinas respecto al tiempo de incubación en soluciones de sacarosa a diferentes concentraciones. 71
- 30 Actividad de la enzima decolorante en función del tiempo de ensayo. 72
- 31 Cambios en la actividad específica de la enzima decolorante a diferentes concentraciones de sustrato. 74
- 32 Actividad de la enzima decolorante a diferentes periodos de incubación bajo diferentes concentraciones de sacarosa. 75

ABREVIATURAS

ABA	Acido abscisico.
CRA	Contenido relativo de agua.
MPa	Megapascales.
PEG	Polietilén-glicol.
Pf	Peso fresco.
Ps	Peso seco.
Pt	Peso turgente máximo.
Ψ_{H_2O}	Potencial de agua.
Ψ_M	Potencial de matriz.
Ψ_S	Potencial osmótico.
Ψ_T	Potencial de turgencia o de presión.

RESUMEN

En plantas de *Amaranthus hypochondriacus* se determinó el efecto de un tratamiento de sequía sobre la acumulación de amarantina, pigmento rojo de naturaleza glicosídica perteneciente a las betacianinas en los tres modelos estudiados; explantes, plántula y plántula sin raíz, se presentó una acumulación mayor de betacianinas bajo condiciones de déficit de agua.

En los explantes, la magnitud de la acumulación de amarantina fué dependiente de la presencia de luz continua y en plántulas se requirió de un estímulo luminoso de 5 hr de exposición a la luz, para que la respuesta se presentara.

Dentro de los factores que afectan la acumulación de metabolitos secundarios se determinó que la acumulación de betacianinas en el modelo de plántulas sin raíz varió dependiendo de: 1) el tiempo de exposición luminosa al que se sometieron las plántulas, 2) la concentración de tirosina en la solución de incubación de las plántulas, 3) la disponibilidad de sacarosa, 4) la sustancia utilizada para provocar el estrés y 5) la fuerza de éste.

Utilizando sacarosa como aportador de fotosintatos y generador de un potencial osmótico que causa estrés de déficit de agua, se encontró en plántulas un potencial osmótico original de -0.224 MPa, potenciales menores a este causan diferentes grados de estrés de déficit de agua y la acumulación de betacianinas en estas condiciones fué mayor teniendo un punto máximo de acumulación en sacarosa 200 mM (-0.449 MPa). En presencia de concentraciones variables de PEG y sacarosa 100 mM se presentó un aumento ligero de betacianinas, teniendo como punto óptimo el mismo potencial osmótico (-0.449 MPa). Con sacarosa 20 mM y diferentes concentraciones de PEG en el medio, no se presentó respuesta, probablemente debido a que la concentración de sacarosa no fué suficiente para estimular el sistema; con diferentes

concentraciones de manitol y en presencia de 20 mM o de 100 mM de sacarosa tampoco se presentó la respuesta probablemente por que manitol interfiere con el metabolismo.

Debido a la respuesta especial que se dió en presencia de sacarosa también se estudió la respuesta de acumulación de betacianinas en presencia de glucosa y fructosa resultando en ambos casos negativa. De esto se concluyó que el efecto de sacarosa es específico

En los estudios sobre la cinética de acumulación de betacianinas se observó que ésta se dió gradualmente, sin detectarse cambios en la actividad de la enzima decolorasa por lo que se presume que es la ruta biosintética la que controla los niveles de acumulación.

I.- INTRODUCCION

La búsqueda de condiciones óptimas de biosíntesis de algunos metabolitos secundarios es una de las áreas de estudio de la bioquímica entre otras razones por su importancia económica y utilidad práctica. De la misma forma los factores que regulan la producción de los metabolitos secundarios es relevante ya que al conocer esto, también se descubren sus condiciones óptimas de aparición, de acumulación y de degradación. Además se obtiene un entendimiento del papel fisiológico de estas sustancias dentro de la planta, contribuyendo de esta manera al conocimiento científico.

En nuestro país en la época prehispánica, el amaranto fue un cultivo básico el cual cayó en desuso debido a razones religioso-culturales durante la época de la colonia; en la actualidad se ha tratado de impulsar su consumo. Se sabe que esta planta tiene la capacidad de producir un pigmento rojo llamado amarantina, el cual puede acumularse tanto en las partes vegetativas como en la semilla.

De esta planta es el grano la parte que se utiliza más comunmente (alegría). Para lograr el aprovechamiento integral de la planta se requiere la utilización de la parte vegetativa. Como una alternativa se ha tratado de utilizar el follaje como alimento para el ganado, lo cual no ha tenido éxito por su alto contenido de oxalatos que causan daños al organismo. Como alternativa se propone la utilización de la planta como fuente de pigmentos rojos.

Algunos compuestos fitoquímicos se sintetizan y acumulan en mayores cantidades bajo condiciones de estrés por temperatura, por déficit de agua, por presencia de depredadores o por otras condiciones ambientales (Timmermann, Steelink y Loewus, 1984). Existen algunas evidencias que permiten predecir que en amaranto las betacianinas (amarantina) se acumulan más bajo estrés de déficit de agua (Elliot, 1979, Komamine, 1987a).

En nuestro país un gran porcentaje de las tierras utilizadas en la agricultura son de temporal, las cuales se ven sometidas frecuentemente a sequía sobre todo en las zonas semiáridas del país. En estas zonas se propone el amaranto como un cultivo alternativo, pero conjuntamente a la implantación del cultivo es necesario realizar investigación de su comportamiento bajo sequía y su utilización integral (Alejandre y Gómez, 1990).

Dados estos antecedentes nos planteamos estudiar la acumulación de betacianinas en *Amaranthus hypochondriacus* L. sometido a estrés de déficit de agua.

II.- REVISION DE LITERATURA

2.1.-Betacianinas

Las betacianinas pertenecen al grupo de pigmentos de las betalainas, a las cuales se les denominaba antiguamente antocianinas con nitrógeno, debido a las características semejantes de color entre ambos grupos ya que las betalainas presentan nitrógeno en su estructura mientras que las antocianinas no, perteneciendo ambas a grupos químicos muy diferentes (Piatelli, 1981), imparten una coloración rojo violeta a ciertas estructuras de las plantas que las sintetizan; estas plantas son de la familia de las centrospermas, (Piatelli y Minalde 1964a, 1964b).

2.1.1. Estructura química.

Las betacianinas son de naturaleza química glicosídica; existen más de 55 tipos de betacianinas conocidas, las cuales están constituidas por el aglicón llamado betanidina que tiene el anillo dihidroindol dihidropiridina (Fig 1), el cual tiene un carbono anomérico en posición 15. Cambios en en la isomería de estas posiciones da origen a la isobetanidina, la cual también se ha detectado como aglicón de las betacianinas, aunque se cree que podría ser un isómero formado durante la extracción de estos compuestos, ya que bajo ciertas condiciones altamente controladas de extracción solo se obtiene la betanidina. También se ha detectado como aglicón la betanidina descarboxilada en posición 2.

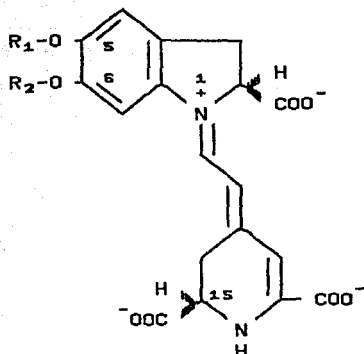


FIG.1. ESTRUCTURA DE LAS BETACIANINAS

	BETANIDINA	AMARANTINA	BETAINA
R ₁	H	GLU-	Ac GLU-GLU
R ₂	H	H	H

Los azúcares que pueden generar los glicósidos son: monosacáridos; ramnosa, glucosa, ácido glucurónico, disacáridos; constituidos por estos monosacáridos se pueden encontrar esterificados en posición 6 del aglicón.

Estos azúcares pueden encontrarse acilados con los ácidos: malónico, ferúlico, cumárico, sináptico, caféico y cítrico (Piatelli, 1981, Mabry 1984).

Dependiendo de los grupos radicales sustituyentes en las posiciones 5 y 6 se presenta un cambio ligero en el máximo de absorción de luz del pigmento, ya que éstos radicales interfieren con la resonancia de los anillos, de esta manera cada betacyanina tiene un punto de absorción máximo entre 534 y 550 nm de longitud de onda, siendo de 537 para la amarantina.

2.1.2.- Distribución en la naturaleza

Las betalaninas se encuentran en algunas plantas y algunos hongos. En el Orden de las centrospermas se han detectado dos familias que desarrollan pigmentaciones que se deben a la presencia de antocianinas, por lo que no solo las betalaninas pueden dar pigmentación a plantas de este Orden, sin embargo la presencia de betalaninas y antocianinas es mutuamente excluyente, es decir la pigmentación de la planta o se debe a antocianinas o a betalaninas.

La presencia de betacianinas se ha determinado en 37 especies de plantas pertenecientes a siete familias de las centrospermas (Piatelli 1964 a y b):

Amarantacea
Cactacea
Chenopodiacea
Mesembrianthemacea
Nyctaginacea
Phytolacaccea
Portulacacea

En algunas de las especies determinadas solo se encuentra un tipo de glicósido, aunque se detectan las formas isoméricas del aglicón, mientras que en otras especies se encuentran varios tipos de betacianinas en la misma planta. Como ejemplo está *Gomphrena globosa*, en la cual se encuentran hasta 11 tipos de betacianinas.

2.1.3. Expresión genética

La expresión de los genes que regulan la acumulación de las betacianinas se ha investigado en diferentes sistemas llegándose a las siguientes conclusiones:

1.- En callos de *Beta vulgaris* existe una variedad clonal que permite la expresión positiva o nula del pigmento, sin embargo, para el desarrollo del pigmento cuando la posibilidad es positiva, es necesaria la presencia de luz. (Girod y Zryd 1983).

2.-En *Amaranthus caudatus* la formación del color en el embrión es debido al control en un primer locus, sobre dos genes epistáticos complementarios que determinan la presencia del color; además existe un segundo locus que regula la expresión del pigmento (Kulakow, 1987).

2.1.4. Biosíntesis y degradación

1. Biosíntesis.

Generalmente las plantas que son capaces de sintetizar pigmentos son de metabolismo C_4 ó bien de tipo CAM (Mabry, 1980).

Con el uso de precursores radioactivos se ha determinado que la biosíntesis de betacianinas (Fig 2) parte de L-dopa la cual sufre un rompimiento entre las posiciones 4 y 5, convirtiéndose de esta manera en ácido betalámico, el cual se puede condensar con ciclodopa y originar la betanidina. Este fenómeno ha sido observado en varias familias de centrospermas (Mabry, 1984)

La glicosidación de las betacianinas puede realizarse sobre el precursor ciclodopa el cual se condensará posteriormente con el ácido betalámico formando la betacianina glicosilada. La betacianina puede también glicosidarse directamente (Sciuto et al., 1974)

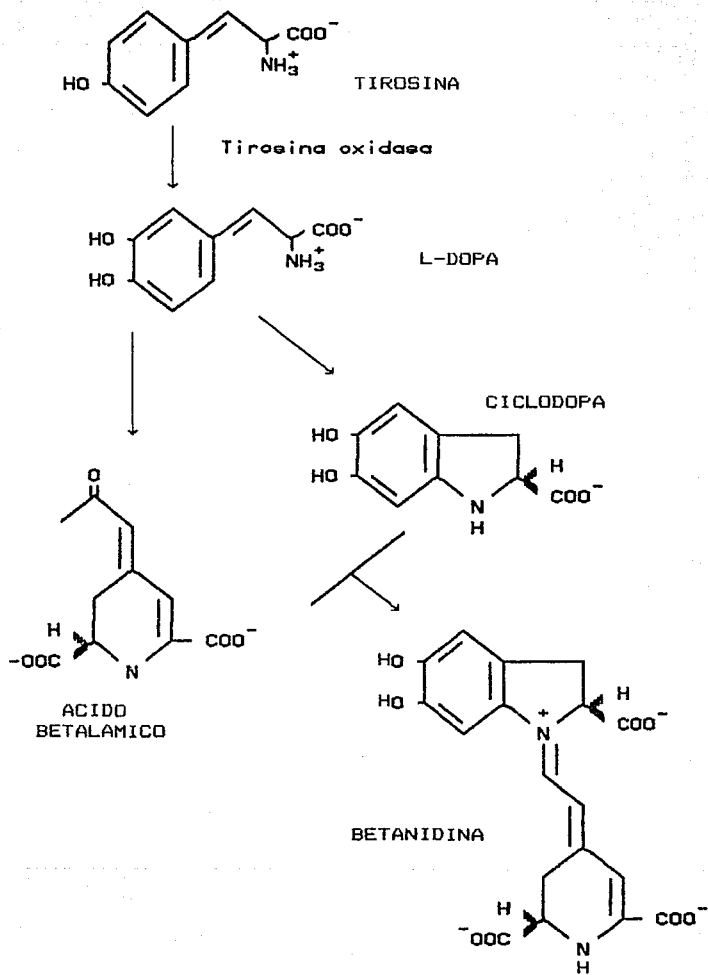


FIG 2.- ESQUEMA DE BIOSINTESIS DE BETACIANINAS

2.- Degradación.

Ha sido determinada una actividad enzimática de decolorasa para betacianina en *Amaranthus hypochondriacus* (Fig. 3), la cual presenta una actividad máxima a pH de 3.4, una K_m de 3.1×10^{-6} y la enzima es inhibida por la presencia de reductores y la falta de oxígeno (Elliot, Schultz y Cassar 1983b).

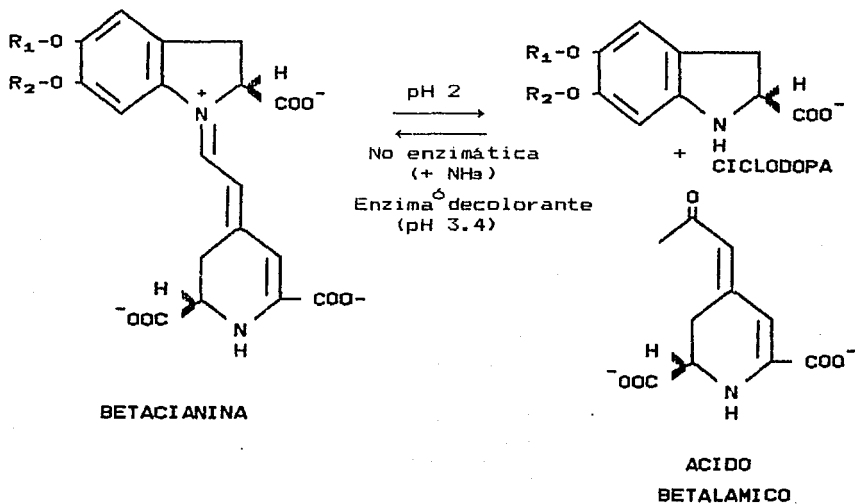


FIG 3.- CATABOLISMO ENZIMATICO Y ESPONTANEO DE BETACIANINA
(ELLIOT, 1983).

En epidermis de *Beta vulgaris* ha sido localizada una actividad decolorasa para betaxantinas y betacianinas con un pH óptimo de 3.4 (Shih y Wiley, 1981).

2.1.5.- Factores que afectan la biosíntesis de betacianinas.

2.1.5.1. Luz

Las respuestas fotomorfogénicas de las plantas son (Liscum, 1991):

- 1.- Respuestas mediadas por el fotoreceptor UV-B.
- 2.- Respuestas mediadas por fitocromo. Estas son reguladas por la incidencia de luz roja/rojo lejano. Este fotoreceptor también puede absorber luz azul y luz UV de longitud de onda cercana.
- 3.- Respuestas mediadas por el fotoreceptor azul/UV-A.

Estas respuestas tienen signos de transducción similares a algunas de las presentadas por el fitocromo, debido a la convergencia de sus signos de transducción (Sakary y Song, 1982). Las respuestas mediadas por el fotoreceptor azul/UV-A pueden ser de dos tipos:

A.- LFR o LER (low-fluence-rate reactions o low energy reaction). Reacciones de baja proporción de flujo luminoso. Son dependientes de la longitud de onda, se inducen con luz roja y se revierten con luz rojo lejano (Atrigge, 1990). Son dependientes del flujo luminoso, hasta que se ha llegado a un equilibrio y esta dependencia sigue la ley de la reciprocidad de Bunsen-Roscowe, donde la respuesta a la luz es dependiente únicamente del flujo total (velocidad de flujo X tiempo de radiación). El sostenimiento de la reacción es independiente del tiempo de radiación o de la velocidad de flujo, por lo que con periodos cortos de iluminación se puede estimular este tipo de respuesta mediante la captación de luz por parte del fitocromo.

B.- HFR o HER (high-fluence-rate reactions o high energy reaction). Reacción de tasa alta de flujo luminoso o reacciones de alta velocidad de flujo luminoso. Después de que el equilibrio fotoestacionario se ha alcanzado esta respuesta sigue siendo dependiente de la velocidad de flujo luminoso, en este caso la ley de la reciprocidad no se sostiene (Song, 1984).

En *Amaranthus tricolor* la síntesis de betacianinas puede ser estimulada por luz blanca, dando una respuesta de acumulación máxima a las 24 horas. Este estímulo puede ser inhibido por luz en el rojo lejano y esta inhibición es superada parcialmente por exposición a luz roja. La luz roja y rojo lejano también pueden estimular independientemente el sistema, siendo la respuesta mayor con luz roja que con la de rojo lejano, con lo cual se concluye que los dos sistemas HIR y LIR están mediando la respuesta (Piatelli, Giudici De Nicola y Castrogiovanni, 1969). El estímulo provocado por la luz puede ser inhibido por actinomicina D y puromicina, lo que sugiere que el estímulo de luz está actuando sobre la expresión a nivel de transcripción y de traducción (Piatelli, 1970b, Koheler, 1972). También ha sido estudiada desde este punto de vista la síntesis de betaxantinas en *Celosia plumosa*, llegándose a la conclusión de que ambos sistemas se comportan de la misma manera (Giudici De Nicola, Piatelli Castrogiovanni y Amico 1973a).

Débito a que la síntesis de clorofila también responde a estímulos luminosos, se buscó por medio del uso de diferentes inhibidores, la relación entre la síntesis de la clorofila y la de betacianinas. Aparentemente las vías y los estímulos necesarios para la síntesis de cada uno de estos compuestos son diferentes aunque tienen algunos puntos de convergencia (Giudici De Nicola et al 1973 a y b). Esta relación entre la biosíntesis de betacianinas y clorofila, es compleja ya que lumiflavina, inhibidor de la biosíntesis de clorofila, aumenta la acumulación de betacianinas en plantas en ausencia de estímulo luminoso y en aquellas que han recibido un estímulo a bajas irradiancias, mientras que la lumiflavina disminuye la acumulación de betacianinas en aquellas plántulas que han recibido un estímulo en el HIR o en el receptor de luz azul (Obrenovic, 1986).

2.1.5.2. Fitoreguladores.

CITOCININAS.- Desde hace varias décadas ha sido conocido el efecto de estímulo de acumulación de betacianinas en plántulas de *Amaranthus* sp como respuesta a la presencia de citocininas en oscuridad, lo cual ha servido como método biológico cuantitativo para la determinación de éstas (Biddington y Thomas, 1973). Al añadir citocininas al sistema de plántulas de amaranto estimulado por luz, Giudici De Nicola (1972 b) observó que se presenta un efecto aditivo. En estas condiciones, la luz rojo lejano inhibe parcialmente el efecto de síntesis. Con el uso de inhibidores se vió que ésta respuesta dual es regulada a diferentes niveles: transcripción, síntesis de proteínas y fosforilación cíclica (Piatelli, Giudici De Nicola, Castrogiovanni 1969, 70, 71; Giudici De Nicola et al, 1972 a, b y 1973 a, b y 1973 a, b y Obrenovic, 1986).

ACIDO ABCISICO.- En *Amaranthus caudatus* estimulado por luz y por citocinina se ha encontrado que ABA inhibe la respuesta de acúmulo de betacianinas por cualquiera de los dos estímulos, (Biddington y Thomas, 1977). Los compuestos fenólicos interfieren el efecto del ácido abscísico (Ray, Guruprasad y Laloraya, 1983).

La inhibición de acumulación de betacianinas por ácido abscísico podría ser ocasionada por el aumento de la actividad de la enzima decolorasa, o bien por una salida de las betacianinas de los tejidos. Se ha visto que el ácido abscísico aumenta la salida de este pigmento en hojas de *Iresina* sp, y en discos de betabel (Pustovoitova, 1987, 1988).

2.1.6. Función biológica.

1.- Respuesta a infecciones

a) Virales (Sosnova, 1971 y Mabry 1980), o Fúngicas.- Las semillas de betabel pigmentadas tienen mayor resistencia a infecciones causadas por el hongo *Phythium debaryum* que aquellas que no son pigmentadas. Cuando se crece este hongo en cultivo líquido se reduce su crecimiento en un 50% cuando al medio se agrega 50 ppm de betanina (Kimler, 1975 y Mabry, 1980).

b) Bacterianas.- Se ha encontrado que *Gomphrena celosioides*, tiene ligera acción antibacteriana contra microorganismos Gram positivos (Botha, 1986)

2.-Respuesta a daño físico.

Las respuestas señaladas anteriormente se pueden deber, parcialmente, al daño físico causado por la infección. Además, se ha visto que el trasplante ocasiona acúmulo de betacianinas, el cual puede ser causado por daño físico, (Velázquez, 1990).

3.- Respuesta a estrés hídrico.

Elliot (1979a) encontró en plántulas de *Amaranthus tricolor* que a CRA de 68% se produce un 50% más de betacianinas que a CRA de 82%. Sakuta (1987a) encontró en cultivo de células en suspensión que a potenciales osmóticos de -0.4 MPa producen más betacianinas que a -0.2 MPa a una misma concentración de sacarosa (88 mM).

4.-Respuesta al estado nutricional de la planta.

En cultivo de tejidos se demostró que la acumulación de betacianinas es mayor cuando existe un exceso de fuente carbonada, como la sacarosa, así como una relación óptima de nitrógeno (Sakuta et al, 1987 a y b)

2.2.- Estrés de déficit de agua.

2.2.1. Parámetros que determinan el estado hídrico de la planta.

La cantidad de agua que una planta puede demandar está dada por factores internos y externos a ésta. Estos factores están en función de los parámetros de potencial de agua, de difusión, de ósmosis y de electrósmosis entre el suelo y la planta.

A).--POTENCIAL OSMÓTICO DE AGUA (Ψ_{H_2O}):

Se define como la diferencia de energía por unidad de volumen entre el agua matricialmente unida, presionada, u osmóticamente constreñida y el agua pura, donde el agua tiende a fluir de zonas de donde se tenga un Ψ_{H_2O} mayor, a uno que sea menor (más negativo, ya que el agua pura tiene mayor energía que el agua con solutos).

El potencial de agua en un tejido o célula está dado por la suma de los potenciales, osmótico (Ψ_s), de presión o de turgencia (Ψ_r) y de matriz (Ψ_m), el cual puede ser expresado de la siguiente manera (Kaufman, 1981).

$$\Psi_{H_2O} = \Psi_s + \Psi_r + \Psi_m$$

El potencial gravitacional también puede ser considerado (Turner, 1981), aunque éste, al igual que el potencial de matriz puede ser excluido ya que es muy pequeño en comparación con los otros componentes.

El potencial de agua es diferente en cada parte de la planta, y es más negativo a medida que el órgano se aleja más del suelo (Baker, 1984). Esto permite que el agua fluya de la raíz a la hoja (atmósfera), y este flujo está determinado por un gradiente de Ψ_{H_2O} entre el suelo y el aire, a través de la planta.

B).-DIFUSION:

Es el movimiento de agua que involucra movimientos aleatorios y cuya magnitud está en función del área y del potencial químico. Este movimiento sigue un comportamiento dado por la expresión

$$J_v = L_p \cdot \Delta \Psi_{H_2O}$$

DONDE J_v = Flujo de agua por unidad de área ($m^3 m^{-2} seg^{-1}$).

L_p = Conductancia hidráulica ($m s^{-1} Pa^{-1}$).

$\Delta \Psi_{H_2O}$ = Diferencia de potencial de agua a través de la membrana.

C).- OSMOSIS:

Es el proceso de difusión a través de una membrana semipermeable cuyo movimiento depende de un potencial químico generado por una presión osmótica donde el potencial de soluto (Ψ_s) es la fuerza directora y está dado por el número de moléculas en solución, el volumen y la temperatura, de acuerdo a la siguiente relación.

$$\Psi_s = \frac{-nRT}{V}$$

Siendo el desarrollo de este potencial de gran importancia fisiológica, porque define la capacidad de la célula para tomar el agua de su medio determinando así su estado hídrico.

D).- ELECTROSMOSIS:

Cuando las moléculas están fijadas eléctricamente a una membrana, un gradiente de potencial puede inducir cambios en los flujos de agua. Se considera que este fenómeno es la fuerza que dirige el transporte de agua a través del floema.

La determinación del movimiento de agua desde el suelo a la atmósfera a través de los órganos de la planta está dada por el potencial de agua y la resistencia que presenta la planta en cada uno de los órganos. La siguiente expresión define el flujo del agua del suelo a la atmósfera a través de las plantas.

$$J_v = \Delta \Psi_{H_2O} / r$$

Donde r es la resistencia la cual sufre variaciones mínimas en comparación con la variación que sufre el potencial de agua.

2.2.2. Respuesta fisiológicas en estrés de déficit de agua

Turner (1986) señala que cuando la disponibilidad de agua en el suelo disminuye, ocurren una serie de cambios fisiológicos en la planta. Estos cambios se han clasificado como mecanismos que conducen a un "ESCAPE" del estrés de sequía y los que conducen a su "TOLERANCIA". Dentro de los primeros están la disminución del periodo vegetativo, enrollamiento y caída de hojas y baja conductancia estomática. Los mecanismos de tolerancia involucran disminución del potencial de agua

Diversos estudios clasifican a las respuestas fisiológicas de una planta al estrés de déficit de agua de una manera más detallada la cual se describe a continuación.

1.- Respuesta fisiológica general:

Se ha observado que una planta al ser sometida a estrés, disminuye su crecimiento medido como área foliar y tasa fotosintética. La disminución en la tasa fotosintética no solo se debe a menor utilización de la energía para producir nuevos metabolitos, sino también a una menor capacidad de captación de energía, comparada con la utilizada por la planta en condiciones no estresantes. Estas respuestas en general son a largo plazo y son dependientes de los fenómenos que a continuación se describen.

2.- Respuesta de los fitorreguladores:

Se ha determinado que cuando una planta se ve sometida a estrés se presentan cambios en la concentración de fitorreguladores, sobre todo la relación CITOCININAS-ABA.

Turner (1988) señala la importancia de la raíz como primer órgano sensor del déficit de agua; independientemente, también los cambios de turgencia y de concentración de fitorreguladores en las hojas juegan un papel importante. Propone que la interacción entre citocininas y ABA es lo que regula el comportamiento de la apertura de los estomas y el intercambio de gases en plantas sujetas a estrés.

3.- Respuesta osmótica

La osmoregulación y los incrementos en la elasticidad en las células son los fenómenos encargados de mantener la turgencia en los diferentes órganos de las plantas cuando están sometidas a estrés (Joly y Zaerr, 1987).

Hay una serie de estudios en los cuales se ha observado una acumulación de sustancias osmóticamente activas, ya sea por movilización o por síntesis de novo, acumulación que en algunos casos llega a mantener totalmente la presión de turgencia (Jones, Turner y Osmond, 1981). En general esto solo mantiene en cierto grado la turgencia (Turner, 1986), pudiéndose deber esto a dos fenómenos: a) disminución del potencial osmótico por acumulación de solutos ó b) por alta elasticidad del tejido (Jones et al, 1981).

El fenómeno que más frecuentemente ocurre es el de ajuste osmótico, y se ha determinado que éste se puede llevar a cabo en diferentes órganos y en diferentes especies (Jones et al, 1981, Morgan y 1984 Turner, 1986). La respuesta es diferente de acuerdo a los parámetros antes mencionados, además de la edad del órgano y otros factores ambientales como la temperatura, intensidad de luz, la concentración de CO₂ atmosférico, la intensidad del estrés, duración de éste y las condiciones ambientales preexistentes (Morgan, 1984).

Los metabolitos acumulados durante el estrés son de naturaleza química muy diversa y aunque predominan los azúcares y aminoácidos (Morgan, 1984, Schuab y Gaff, 1986 y Okazaki, Sakano y Tazawa 1987), también el potasio es de los osmolitos que aumentan su concentración en cantidades relativamente grandes (Jones et al 1981), los ácidos orgánicos como el málico y el cítrico o iones como nitrato y cloruro (Pitman, 1981, Morgan, 1984, y Berkowitz y Pier, 1987). A algunos de estos metabolitos se les ha dado un papel de protector de estructuras celulares (Selenioti, Nikolopoulos y Manetas, 1987).

2.2.3.- Efecto de estrés en la producción de metabolitos secundarios

Diferentes tipos de estrés provocan acumulación de ciertos metabolitos secundarios; por esto se dice que estos metabolitos pueden jugar un papel protector. Aunque la acumulación de metabolitos secundarios no sólo obedece a esta regla ya que en ciertos casos al aumento de metabolitos se les ha asignado un papel de mediadores de respuesta, transmisores de ésta y de adaptación a los diferentes condiciones ambientales que surgen durante el estrés (Wyn Jones, 1984), también los metabolitos secundarios pueden acumularse como respuesta al daño provocado por las condiciones adversas.

Se ha visto que algunos glicósidos cianogenéticos, glicosinolatos y otros compuestos azufrados, alcaloides y terpenoides se acumulan bajo condiciones de estrés de deficit de agua (Gershenzon, 1984).

2.3.- Papel de la sacarosa en la biosíntesis de metabolitos secundarios.

2.3.1. Papel de la sacarosa como nutrimento

Los carbohidratos son los metabolitos que almacenan primariamente la energía. El metabolismo y translocación de los carbohidratos es de gran importancia, ya que es la forma primordial para movilizar y distribuir la energía que se produce en la planta, esto depende del estado de desarrollo, edad de la planta, o estado fisiológico. La sacarosa es la forma más común en la que los azúcares son transportados (Lucas y Madore, 1988) aunque algunas especies translocan otros azúcares (Ziegler, 1975 citado por Canny 1984). La ventaja de transportar sacarosa es que este azúcar es más inerte que otros a las reacciones químicas del metabolismo ya que los complejos enzimáticos que la transforman están fuera de su alcance (Lucas y Madore, 1988).

En general los azúcares utilizan el floema para transportarse hacia los órganos que están en desarrollo, (Giaquinta, 1983, Hayer 1985, 1987 citado por Ho, 1988) a los cuales se les llama órganos demandantes, aunque también puede ser utilizado el apoplasto dependiendo del estado de desarrollo de la planta como son las primeras etapas de desarrollo (Canny, 1984). Los órganos que en un estado de desarrollo o ambiental fueron demandantes posteriormente se pueden convertir en fuente de fotosintatos.

El estudio de la manera en que la sacarosa es transportada ha presentado dificultades por la complejidad de los sistemas en que es posible estudiarla. Taner (1980), Heyser (1980) y Fritz (1983) (citados por Lucas y Madone, 1988) muestran evidencias de que la sacarosa se mueve como un cotransporte con protones.

Respecto a la absorción de azúcares por las células demandantes, lo más aceptado es que ésta puede llevarse a cabo de una manera bifásica. La primera fase se refiere a la toma de azúcar a bajas concentraciones, siendo un proceso saturante que requiere de energía, transporte activo y se lleva a cabo como un simporte sac/H^+ o como antiporte sac/K^+ . La segunda fase se refiere a la absorción del azúcar a concentraciones altas de sacarosa es un proceso lineal no saturante dependiente del gradiente de azúcar establecido. (Ho, 1988, Lucas y Madore, 1988 y Canny 1984)

2.3.2. Regulación del movimiento de azúcares (sacarosa)

La cantidad de azúcares que entra a una célula está dada por los siguientes factores:

- 1.- Potencialidad de la fuerza demandante dada por factores genéticos y de demanda metabólica del tejido (Cook y Evans, 1983).
- 2.- Estímulos hormonales. Se ha reportado que las giberelinas, auxinas y citocininas aumentan la fuerza demandante mientras que el ácido abscísico la puede aumentar o disminuir (Lucas y Madone, 1988).
- 3.- Mantenimiento de un gradiente de turgencia entre los órganos demandantes y fuentes mediados por una fuerza protón-motriz (Ho, 1988., Lucas y Madone, 1988, y Reinhold et al., 1984).

4.-Temperatura.- Las temperaturas cercanas a 50°C inhiben irreversiblemente la translocación, permitiendo paso únicamente el transporte por xilema. A temperaturas bajas cercanas a 0°C también se inhibe la translocación (Canny, 1984).

5.- Estrés de déficit de agua. Durante el estrés de déficit de agua hay un reajuste osmótico en el que en algunas ocasiones se ven involucrados los azúcares, por lo que este tipo de fenómeno altera los patrones de movilización y metabolismo de carbohidratos (Lucas y Madore, 1988; Canny 1984).

6.- Iones. Entre los iones más comúnmente estudiados se encuentra el potasio, el cual también puede tener un papel osmoregulador y provoca cambios en los flujos de carbohidratos, además también puede participar en la entrada de azúcares a la célula en un proceso de simporte (Canny 1984).

2.3.3.- Papel de los azúcares en la producción de metabolitos secundarios

En cultivo de tejidos normalmente se utiliza una concentración de 2% a 3% de sacarosa. Un cambio en la cantidad de éste azúcar determina la producción de compuestos fitoquímicos (Discomo y Towers 1984). En tejidos de células de *Phytolacca americana* una concentración de 180 mM de sacarosa es la más adecuada para que se acumule una mayor cantidad de betacianinas (Sakuta et al, 1987a). Efectos similares han sido observados en tejidos en suspensión de células de *Cataranthus roseus*, al incrementar la concentración de sacarosa de 4% a 10% aumenta la acumulación de antocianinas (Knobroch et al, 1982).

También se ha estudiado el efecto de la fuente de carbono la concentración de metabolitos secundarios. Así, se ha determinado que en tejidos celulares de *Populus* sp, sacarosa, glucosa y fructosa en el medio de cultivo fueron asimilados; sin embargo la acumulación de antocianinas fué mayor en presencia de sacarosa mientras que el almidón la inhibió (Matsumoto et al, 1973).

Discomo (1984) ha propuesto que los azúcares al ser utilizados generan una serie de metabolitos que al igual que

interaccionan con el metabolismo básico de las rutas de producción de metabolitos secundarios, también tienen la capacidad de cambiar la cinética de acumulación, estimulando o inhibiendo enzimas de las rutas biosintéticas.

2.4. Amaranto

El amaranto es una planta herbácea anual, utiliza la vía C_4 para asimilar el CO_2 y aunque es mesofítica puede crecer en ambientes con baja disponibilidad de agua (Alejandro y Gómez 1986) por lo que podemos suponer que presenta algunos mecanismos de resistencia a sequía. Tiene un uso eficiente de agua de 300 Kg de agua transpirada/kg de materia seca producida (Fitter y Hay, 1983)

La semilla de amaranto es considerada un pseudocereal con alta riqueza proteínica, contiene de 15 a 16% de proteína (Wu Leug, Busson Jardin, 1968), y de ésta un 6% es lisina (Downtown, 1973). En la actualidad a pesar de su buena composición esta semilla es poco utilizada.

Al ser sometida esta planta a estrés de déficit de agua, ésta presenta un punto de marchitez permanente al 37% de CRA y un punto de daño celular a 42% de CRA (Del Rio Portilla, 1988). A un grado de marchitez moderado, se recuperan rápidamente con el suministro de agua. Esto hace suponer que amaranto tiene capacidad de realizar ajustes osmóticos en condiciones de déficit de agua, esto hace de el amaranto un modelo propicio para los estudios de estrés de déficit de agua.

Estas plantas son pigmentadas debido a la presencia de amarantina, cuya incidencia ha sido determinada desde las primeras etapas de desarrollo. La presencia de estos pigmentos y las características de respuesta del amaranto a estrés de déficit de agua nos permiten utilizarla como modelo de estudio de los mecanismos de desarrollo de pigmentos en condiciones de déficit de agua.

III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

HIPOTESIS

El estrés de déficit de agua provoca una serie de cambios en los procesos bioquímico-fisiológicos en las plantas. Los cambios bioquímicos incluyen movilización de iones, fotosintatos y algunos metabolitos secundarios, así como la síntesis de otras nuevas sustancias como metabolitos secundarios y sustancias osmóticamente activas con un papel protector o de regulación (Gershenzon, 1984). Estos cambios bioquímicos conllevan a cambios en el potencial osmótico (Morgan, 1984) el cual puede determinar el comportamiento.

De acuerdo a lo anterior se propone la siguiente hipótesis:

El estrés por de déficit de agua puede provocar una mayor acumulación de betacianinas en *Amaranthus Hypochondriacus*. La magnitud de esta respuesta está condicionada por las variaciones en la duración del periodo de estrés, el aporte de carbohidratos y el potencial osmótico.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Documentar el efecto de estrés por déficit de agua sobre la acumulación de betacianinas por acción de diversos agentes osmóticos y diferente aporte carbonado.

Objetivos particulares:

1.- Buscar un modelo experimental apropiado (estado de desarrollo de plantas de amaranto) para el estudio de la acumulación de betacianinas bajo estrés osmótico.

2.- Determinar las condiciones experimentales (pH, concentración de tirosina, temperatura e intensidad luminosa) que hacen variar la capacidad de acumulación de betacianinas en el modelo experimental elegido.

3.- Evaluar la respuesta de acumulación de betacianinas bajo diferentes potenciales osmóticos y concentraciones de carbohidratos.

4.- Conocer la cinética de acumulación de betacianinas en condiciones de estrés osmótico.

IV. MATERIALES Y METODOS

Para el desarrollo del presente estudio se utilizaron primordialmente dos modelos experimentales, uno con explantes y otro con plántulas de *Amaranthus hypochondriacus* L. variedad revancha tipo mercado obtenida en Campo experimental del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Chapingo, México (donada por el Ing. Eduardo Espitia).

4.1. Explantes

4.1.1. Material biológico

Se utilizaron hojas totalmente expandidas de plantas de 7 semanas de edad cultivadas en macetas de 1 kg de suelo orgánico. En la maceta se sembraron 6 semillas; después de una semana de crecimiento se dejó la planta más vigorosa. Las plantas crecieron en condiciones de invernadero con fotoperíodo de 12-14 horas y temperatura ambiente (18°-30°C).

4.1.2. Tratamiento de los explantes apotenciales osmóticos bajos

Las hojas maduras se cortaron desde el pecíolo, el cual fue sumergido en una solución al 12% de PEG 6000 ($\Psi_{H_2O} = -0.46$ Mpa). Los explantes se dejaron en estas condiciones durante 2, 4, 6, 8, 10 y 24 horas a tres grupos de muestras con nueve explantes cada una se les midió el CRA y se congelaron a -70°C para después determinar su contenido de betacianinas.

4.1.3.- Medición del CRA

A los explantes después de los tratamientos anteriores se les determinó el CRA para evaluar el estrés de déficit de agua que sufrió el explante. Esta operación se realizó cortando en la parte media de la superficie de la hoja un segmento circular de 5 mm de diámetro con un orador, a este segmento circular se le determinó el peso inicial o PESO FRESCO, posteriormente se puso en una cámara con atmósfera saturada de agua por espacio de 4 h, en oscuridad (para minimizar la fotosíntesis), después de este período se determina el PESO TURGENTE MAXIMO. Este material se conservó a una temperatura de 60°C en una estufa al vacío

(aproximadamente de 8-12 hr) hasta alcanzar el peso constante para determinar su PESO SECO. El CRA se calculó de acuerdo a Slavík (1974) de la siguiente manera:

$$CRA = \frac{Pf - Ps}{Pt - Ps} \times 100$$

4.1.4. Quantificación de betacianinas en explantes.

Al material molido se eliminan le las clorofilas mediante extracciones con etanol 96° y centrifugaciones (5 min a 7000 xg) tres veces consecutivas. Las betacianinas se extrajeron en agua y se cuantificaron por su absorbencia a 537 nm. Las lecturas se relacionaron con el coeficiente de extinción molar (6.04×10^4 Dop/mol) para conocer su concentración.

Como control de la posible coextracción de betacianinas durante las extracciones etanólicas, en los extractos se determinó la pérdida de absorbencia a 537 nm colateralmente a la extracción de clorofila (tabla 1).

En esta determinación se partió de un grupo de plántulas que se dividió en cuatro lotes a los cuales se les practicó: 0 (control), 1, 2, o 3 extracciones y se determinó las absorbencias señaladas. Se observa que la perdida de betacianinas es mínima comparada a la clorofila extraída.

Tabla 1. Relación de densidades ópticas en la extracción de clorofilas de explantes

EXTRACCION	ABSORBENCIA	
	537 nm	663nm
CONTROL	0.303	0.510
1RA	0.288	0.230
2DA	0.273	0.108
3RA	0.265	0.040

4.2. Plántulas sin raíz.

La determinación de betacianinas en plántulas de amaranto de tres días de edad sin raíz ha sido ampliamente estudiada para la cuantificación de citocininas (Elliot, 1983a) por lo que este modelo parece adecuado para el desarrollo de betacianinas por otros estímulos.

4.2.1.- Desinfección superficial de semillas y condiciones de crecimiento

Las semillas se lavaron con agua destilada y desionizada, después se les trataron 1) con alcohol al 70% durante 2 minutos y 2) con una solución al 0.25% de hipoclorito de sodio por 5 minutos 3) las semillas desinfectadas se enjuagaron 4 o 5 veces con agua destilada y desionizada esteril y se colocaron sobre papel filtro en cajas Petri (100 x 15 mm) esterilizadas o bien en cajas de plástico sobre servilletas de papel (sanitas) húmedas. Las cajas con las semillas se colocaron en incubadora a 27°C en oscuridad durante 72 h.

4.2.2.- Incubación

A las plántulas se les cortó la raíz desde la parte inferior del hipocotilo y se colocaron en cajas Petri sobre papel filtro inmerso en amortiguador de incubación (tris-HCl y tirosina 2.5 mM) con las sustancias a probar

4.2.3. Implementación de la metodología para la determinación de betacianinas en plántulas

Esta determinación es diferente a la utilizada en explantes ya que las plántulas presentan un mínimo de clorofila en relación a la cantidad de betacianinas, por lo cual no se consideró necesario eliminar las clorofilas, además el tejido de las plántulas es muy frágil por lo que no se necesita homegenizar de la misma manera.

Después de la incubación de 24 h. se lavaron las plántulas con agua destilada y desionizada para eliminar las sustancias externas en las cuales se encontraban incubadas, y se congelaron

a -70°C . Posteriormente se molieron y se descongelaron a chorro de agua, sometiéndolas a un proceso de congelar y descongelar 3 veces consecutivas con la finalidad de romper las estructuras celulares para liberar el pigmento para su posterior cuantificación.

Elliot (1983b) reportó un método de medición por extracción con ácido acético el cual resultó poco reproducible, ya que las betacianinas se degradan enzimáticamente al pH dado por el ácido, por lo que se buscó un nuevo método más estable, el cual consiste en precipitar las proteínas con TCA. Así, se partió de un extracto de 50 plántulas el cual presentó la lectura inicial reportada (tabla 2), el extracto TCA-TEMPERATURA AMBIENTE se dejó en el espectrofotómetro y se tomó la absorbencia cada 5 minutos durante 20 minutos. La otra parte se dejó en hielo se tomó la lectura a los 20 minutos. Resultó ser un extracto estable a la decoloración.

Tabla 2. Estabilidad de los diferentes extractos de betacianinas a 537 nm de longitud de onda

CONDICIONES	TIEMPO (minutos)				
	0	5	10	15	20
TCA-HIELO	0.235	N.D.*	N.D.*	N.D.*	0.231
TCA- T.AMBIENTE	0.235	0.233	0.233	0.229	0.226
AC. ACETICO	0.309	N.D.*	N.D.*	N.D.*	0.210

N.D.* .- No Determinado.

4.2.3.1. Extracción y cuantificación de betacianinas

Las plántulas se molieron añadiendo 1.0 ml de agua destilada y desionizada, y la preparación se filtró y se centrifugó a 5000 xg. El sobrenadante se llevó a 10% de ácido tricloro-acético, se agitó en vortex y se centrifugó a 3 000 xg durante 13 minutos leyendo la absorbencia del sobrenadante a una longitud de onda de 537 nm. Esta lectura se correlacionó con el coeficiente de extinción de las betacianinas (6.04×10^4 D.op/mol) para determinar su concentración.

4.2.4. Protocolo general de trabajo.

Mediante la caracterización del comportamiento del modelo (capítulo de resultados y discusión, fig 8,9,10 y 11) se eligió el siguiente esquema de trabajo:

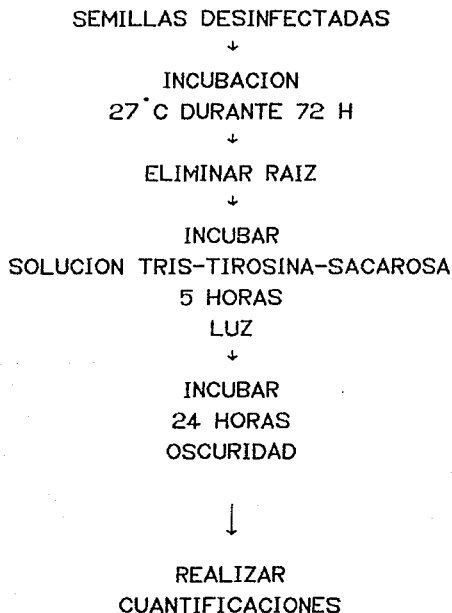


FIG 4: Esquema general de trabajo

4.2.5.- Medición del potencial hídrico de las plántulas

Esta determinación se realizó por dos métodos:

1.- Método de volumen constante (Salisbury, 1983). El material se incubó en soluciones de diferente concentración de un osmolito, sacarosa, manitol o sorbitol y se midió el aumento o pérdida de peso del material después de haber llegado al equilibrio con la solución. Estos cambios en peso se graficaron contra el potencial osmótico de la solución en la que se incubó el material y al cruce de las abscisas se obtuvo el potencial hídrico original del tejido.

2.- Método de Chardakov (Salisbury 1983). El material se incubó en soluciones de diferente densidad hasta alcanzar su equilibrio osmótico, por pérdida o ganancia de líquido. Sobre la solución resultante del equilibrio, se colocó una gota de una mezcla que tuviese la densidad original de la solución de incubación y un colorante contraste, la gota con el colorante descendió o se mantuvo en la superficie de la solución equilibrada dependiendo del cambio de densidad al que se llegó durante la incubación. De esta manera se determinó el rango de potencial de agua al que llegó el material biológico.

4.2.6.- Determinación del potencial osmótico de las plántulas

Se utilizó el método de la Cámara de Presión (Turner, 1981). Las plántulas se lavaron con agua destilada para eliminar el exceso de osmolitos presentes en la solución de incubación y después se congelaron rápidamente a -70°C para molerlas. Con el extracto acuoso que de ellas se liberó se humedeció un papel filtro de 6 mm de diámetro aproximadamente que se colocó en la cámara psicrométrica (Wescor C-52) para dejar equilibrar ésta por espacio de 30 minutos. Posteriormente se determinó el voltaje transmitido por la cámara utilizando un microvoltímetro Wescor HR331 y se tomó la lectura a punto de rocío.

4.2.7. Determinación de proteínas

Esta determinación se hizo de acuerdo al método de Peterson (1977).

4.2.8. Ensayo de la actividad de la enzima decolorasa

4.2.8.1. Obtención del extracto proteínico

El material se molió en un mortero enfriado a -20°C , se añadió amortiguador de citratos 0.1 M pH 3.4 en relación 1:2 peso/volumen, posteriormente se molió en politrón por espacio de 30 segundos 3 veces consecutivas a baja velocidad.

4.2.8.2. Obtención del extracto de pigmento (betacianina)

Este se obtuvo a partir de betabel. Se hizo un extracto moliendo el tejido con un mínimo de agua, filtrando después a través de 4 capas de gasa. La preparación se centrifugó por espacio de 15 minutos a 20 000 xg a 4°C , el sobrenadante se llevó a 10% de ácido tricloroacético, Después de 10 minutos (tiempo para que se desnaturalicen las proteínas y precipiten), se centrifugó nuevamente a 20000 xg a 4°C y se eliminó el precipitado. Posteriormente el ácido tricloroacético se eliminó del sobrenadante mediante extracciones con éter etílico tomando como punto de referencia el pH inicial y el éter etílico se eliminó por extracción al vacío.

Una muestra alicuota de este extracto se diluyó lo necesario para alcanzar una concentración apropiada tomando la lectura a 537 nm de longitud de onda para de esta manera determinar la concentración original de las betacianinas utilizando el coeficiente de extinción correspondiente.

4.2.8.3. Actividad enzimática

El ensayo se realizó mezclando 2 ml de extracto proteínico (50-125 ug de proteína) en amortiguador de citrato pH 3.4 y 1 ml de extracto diluido del sustrato (16 nM de betacianina) en el mismo amortiguador. Se siguió la reacción midiendo la disminución de absorbencia a 537 nm a una temperatura de 25°C . (Elliot 1984). La actividad se calculó por la pendiente obtenida.

4.2.8. Determinación de carbohidratos

OBTENCION DEL EXTRACTO. El extracto de azúcares solubles se obtuvo de acuerdo a Peña y Ortega (1991). El Tejido fresco se fijó con alcohol al 96% hirviendo 5 min, se molió y después se realizaron tres extracciones con etanol al 80% en ebullición. Posteriormente se concentraron eliminando el etanol por evaporación.

1.- Para azúcares reductores totales este extracto se hidrolizó con HCL 1.125 N en ebullición por 2.5 h. Las proteínas se eliminaron añadiendo ácido fosfotúngstico al 10% (Wolframato de sodio 10%-ácido sulfúrico 0.33 M 1:1) dejando 12 hr en refrigeración. El sedimento se separó centrifugando 30 min 3000 xg. El sobrenadante se neutralizó con carbonato de sodio. A este extracto se le cuantificaron los azúcares por el método de Nelson.

2.- Para azúcares reductores directos se siguió el mismo procedimiento de eliminación de proteínas y de cuantificación.

V.- RESULTADOS Y DISCUSION

La acumulación de algunos metabolitos secundarios es un fenómeno que ha sido observado en diferentes especies (Gershenson, 1984). Elliot (1979b) reporta que cuando las plántulas de amaranto tienen diferentes contenidos de agua al inicio de una inducción de acumulación de betacianinas, por citocininas, se presenta una mayor cantidad de betacianinas en condiciones de déficit de agua. Sakuta (1987a) reporta que en cultivo de células en suspensión existe una mayor acumulación de betacianinas tanto por célula como por gramo de tejido seco cuando crece este material en soluciones con mayor concentración de osmolitos.

Ante estos antecedentes como primer objetivo se planteó buscar un modelo biológico en el que como respuesta a potenciales osmóticos bajos acumulara betacianinas tratando de simular condiciones de estrés de déficit de agua.

5.1. Búsqueda de el modelo adecuado para el estudio de acumulación de betacianinas por estrés de potenciales osmóticos bajos en *Amaranthus hypochondriacus* L.

Dos posibles modelos experimentales se propusieron para determinar el efecto de estrés osmótico bajo sobre la acumulación de betacianinas en amaranto. Estos modelos fueron explantes de hojas maduras de amaranto y plántulas de tres días de edad sin raíz, ésta emite señales al resto de la planta teniendo una respuesta, la cual puede confundirse con la respuesta a potencial osmótico bajo para las células que es nuestro objetivo.

5.1.1. Explantos

Se aprecia en las fig. 5 y 6 que la cinética de acumulación de betacianinas a lo largo del tiempo, o en función del agua que perdió el tejido fué diferente en luz y en la oscuridad.

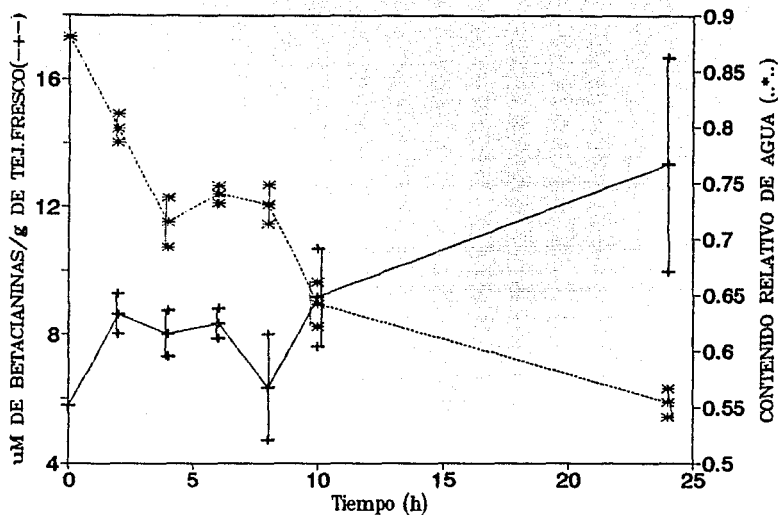


FIG. 5.- RESPUESTA EN LA ACUMULACION DE BETACIANINAS Y EN EL CONTENIDO RELATIVO DE AGUA DE EXPLANTES SUMERGIDOS EN UNA SOLUCION AL 12% DE POLIETILEN GLICOL 6000 POR DIFERENTES PERIODOS, EN PRESENCIA DE LUZ. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos con tres repeticiones.

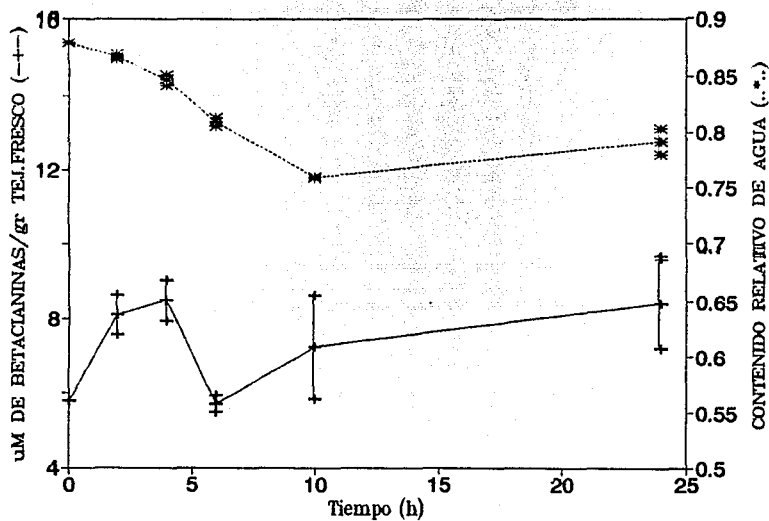


FIG. 6.- RESPUESTA DE EXPLANTES DE HOJAS EN LA ACUMULACION DE BETACIANINAS Y CAMBIOS EN EL CONTENIDO RELATIVO DE AGUA A DIFERENTES PERIODOS DE ESTRES EN UNA SOLUCION DE POLIETILEN-GLICOL AL 12%, EN OSCURIDAD. Cada punto representa tres experimentos independientes con tres repeticiones cada uno.

Así mismo la pérdida de agua a las 24 h de estrés fué mayor en presencia de luz, donde llegó a ser de 50%, mientras que en oscuridad sólo llegó al 78 % de CRA. (Fig 5 y 6). Una transpiración mayor del tejido bajo luz provocó que CRA disminuyera más rápidamente comparativamente a lo que sucedió en oscuridad, además la incidencia de luz provocó que continuara la fotosíntesis, lo que trajo como consecuencia una acumulación de sustancias que generaron un aumento en el peso seco, de tal manera que el incremento en la relación peso fresco/peso turgente se vió afectada (fig 7), contribuyendo esto a una disminución en el CRA, (dándose un aumento en peso seco y peso fresco más no un aumento en el agua retenida). La respuesta que se nota evidentemente real es el aumento de betacianinas bajo luz al inicio y a tiempos de 12 a 24 horas (fig. 5).

La figura 8 muestra el contenido de betacianinas como función del CRA. Cierta tendencia es aparente en la luz mientras que en la oscuridad los resultados fueron más erráticos.

Las betacianinas se acumularon en mayor cantidad en condiciones de estrés a potencial osmótico bajo en explantes de hojas maduras de planta de amaranto, bajo luz.

5.1.2. Plántulas completas

En plántulas completas se determinó si existía la acumulación mayor de betacianinas sometidas a estrés. Se presentó una respuesta positiva (0.010 nmoles/hipócotilo en el control y .0146 nmoles en las plántulas estresadas). Este modelo no parece muy conveniente para nuestro fin ya que las respuestas que se presentaron pudieron deberse a estímulos endógenos por sensibilidad de la raíz al estrés de déficit de agua. Esto puede alterar la concentración de fitoreguladores que cambia la concentración de betacianinas (Elliot 1979a), esta respuesta interfiere con la respuesta que buscamos dada en presencia de soluciones con potenciales osmóticos bajos, lo cual es el objetivo de este trabajo.

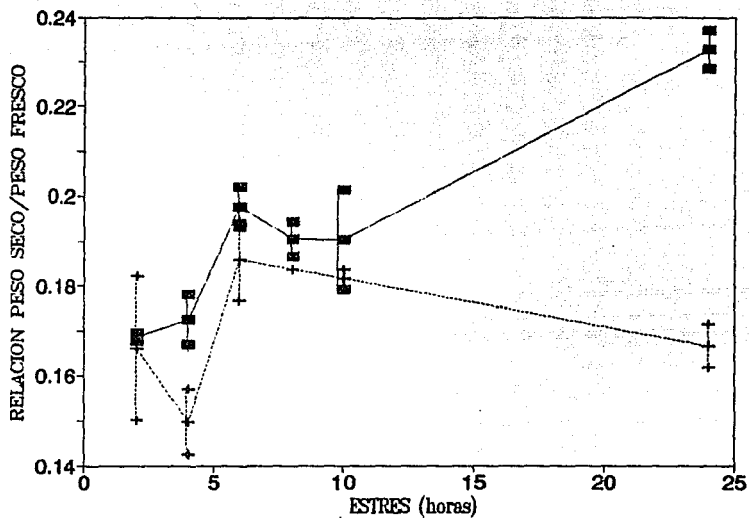


FIG. 7.-RELACION PESO SECO/PESO FRESCO EN EXPLANTES DE 7 SEMANAS SOMETIDOS A ESTRES DE DEFICIT DE AGUA EN UNA SOLUCION DE POLIETILEN-GLICOL AL 12% POR DIFERENTES PERIODOS EN PRESENCIA DE LUZ (- ■ -) U OSCURIDAD (...+...). Los datos corresponden a las determinaciones realizadas para las figuras 5 y 6.

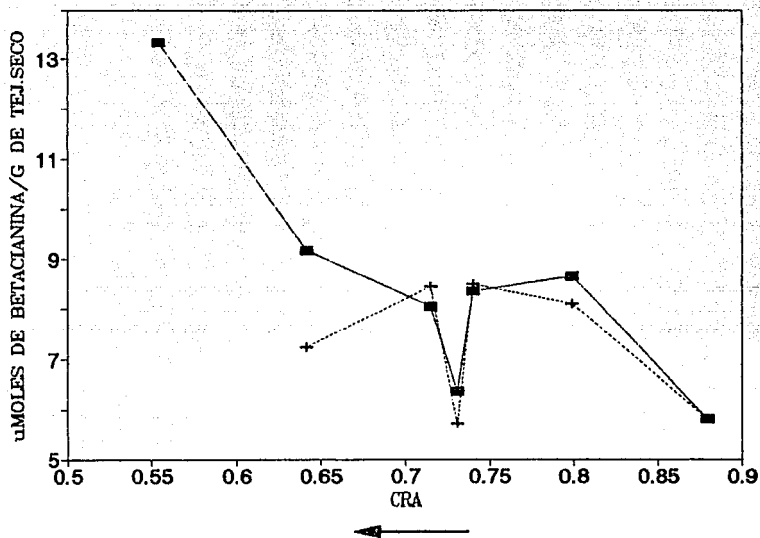


FIG. 8- ACUMULACION DE BETACIANINAS EN EXPLANTES EN FUNCION DEL CONTENIDO RELATIVO DE AGUA EN PRESENCIA DE LUZ (- ■ -) U OSCURIDAD (..+..).

5.1.3 Plántula sin raíz

Ya determinada la respuesta en plántula completa se estudiaron las características en plántula sin raíz. Este modelo presentó las ventajas de poder añadirle sustancias exógenas como iones, azúcares y otros compuestos en el medio de incubación y poder ver el efecto de estas sustancias dentro de las plántulas, con estas sustancias se trató de simular posibles condiciones de respuesta osmótica independiente de los fitoreguladores en el modelo elegido.

El bioensayo usado por Elliot (1979a) para cuantificar citocininas consiste en plántulas crecidas 3.5 días a 27°C a las cuales se les corta la raíz y se sumergen en la solución de ensayo determinando la concentración de betacinas alcanzada.

La región meristemática tiene citocininas (Horgan, 1984), posiblemente para evitar la interferencia de estos fitoreguladores en la respuesta de acumulación de betacinas por estrés osmótico, se realizaron determinaciones de betacinas en hipocotilos bajo diferentes condiciones de pH, amortiguadores, y potenciales osmóticos, detectandose que no hubo producción de betacinas en ninguno de los casos.

5.2.- CONDICIONES QUE HACEN VARIAR LA CAPACIDAD DE RESPUESTA DE ACUMULACION DE BETACININAS EN PLANTULAS DE TRES DIAS DE EDAD, SIN RAIZ.

Con el fin de estudiar los posibles parámetros que regulan la producción de betacinas, en el modelo de plántulas sin raíz, se planteó como segundo objetivo determinar bajo qué condiciones la respuesta era máxima. Las variables que fue necesario controlar en este modelo experimental, fueron: pH, concentración de tirosina (aminación precursor), presencia de iones y potencial osmótico de la solución.

5.2.1. Selección del pH óptimo y del amortiguador de incubación

Para el bioensayo de citocininas en *Amaranthus caudatus*, Elliot (1979b) reportó un pH de 6.8 en amortiguador Hepes. La figura 9 describe la respuesta de acumulación de betacianinas con diferentes amortiguadores y a diferente pH. El pH óptimo fue de 8.2 en amortiguador TRIS.

Con el fin de determinar si la respuesta observada se debió al tipo de amortiguador ó el pH, ambos amortiguadores se mezclaron y se verificó que el pH óptimo fue de 8.2 y el amortiguador más apropiado es de Tris (Fig. 10). Los puntos con pH más básico de 8.2 no se consideraron ya que se le añadieron iones de K^+ (KOH para ajustar el pH del amortiguador), los cuales aumentan la acumulación de betacianinas (Elliot 1979b).

5.2.2.- Determinación de la concentración adecuada de tirosina

La tirosina es el metabolito precursor de la biosíntesis de betacianinas (Mabry, 1980), por lo que fue necesario añadirla al sistema con el fin de que no fuera un factor limitante en su producción (Elliot, 1979a). Para determinar la concentración óptima de tirosina a la cual se daba una acumulación máxima de betacianinas se realizó una curva de concentración (Fig. 11) y se determinó que la respuesta óptima se da a una concentración de 2.5 mM. No fue posible alcanzar concentraciones más altas que ésta.

5.2.3. temperatura de respuesta

Se observa en la tabla 3 un punto máximo de acumulación de betacianinas. Como ésta temperatura de respuesta óptima (37°C) pudiese estar causando estrés de alta temperatura se decidió trabajar a una temperatura más baja (27°C), que consideramos es la temperatura ambiental promedio.

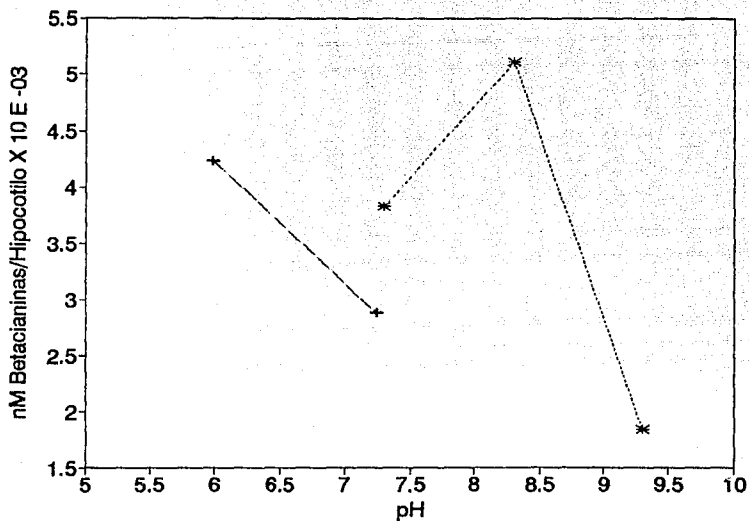


FIG. 9.- EFECTO DE pH Y DEL TIPO DE AMORTIGUADOR SOBRE LA ACUMULACION DE BETACIANINAS EN PLANTULAS DE *Amaranthus hypochondriacus* DE TRES DIAS DE EDAD DESPROVISTAS DE RAIZ, SUMERGIDAS EN AMORTIGUADOR TRIS (...*) O HEPES(- + -) DURANTE 24 h. Cada punto corresponde a un experimento con tres repeticiones.

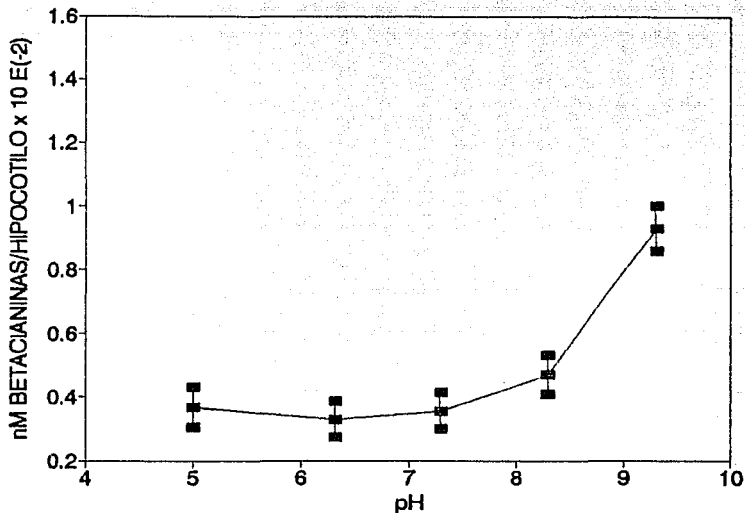


FIG. 10.- EFECTO DE pH CON MEZCLA DE AMORTIGUADORES. SOBRE LA ACUMULACION DE BETACIANINAS EN PLANTULAS DE *Amaranthus hypochondriacus* DE TRES DIAS DE EDAD DESPROVISTAS DE RAIZ, SUMERGIDAS EN AMORTIGUADOR HEPES-TRIS-TIROSINA DURANTE 24 h. Cada punto corresponde a un experimento con tres repeticiones.

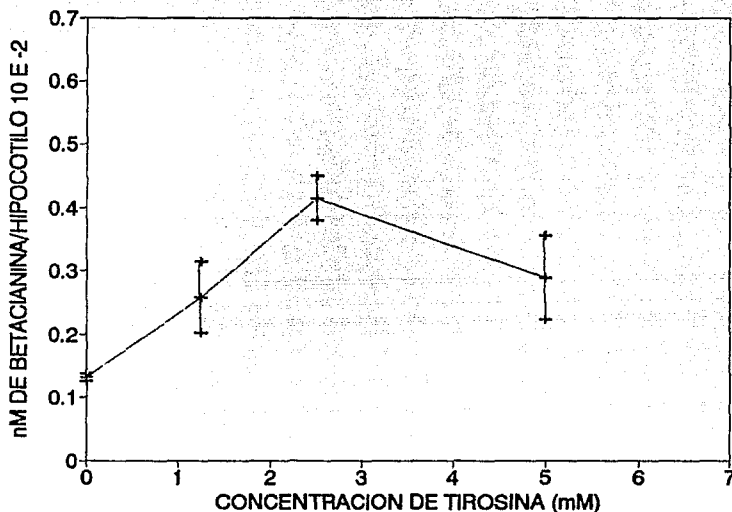


FIG. 11.- EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TIROSINA SOBRE LA ACUMULACION DE BETACIANINAS EN PLANTULAS DE *Amaranthus hypochondriacus* DE TRES DIAS DE EDAD DESPROVISTAS DE RAIZ, SUMERGIDAS EN AMORTIGUADOR TRIS-TIROSINA DURANTE 24 HORAS. Cada punto corresponde a un experimento con tres repeticiones.

Tabla 3. Efecto de la temperatura de incubación sobre la acumulación de betacianinas.

TEMPERATURA	nm DE BETACIANINAS/HIPOCOTILO
10	0.5 ± 0.03
27	1.5 ± 0.05
37	3.0 ± 0.08
40	0.2 ± 0.05
45	0.11 ± 0.033

NUEVE CAJAS PETRI CADA UNA CON 30 PLANTULAS SIN RAIZ EN LAS SE INCUBARON CONDICIONES ESTANDAR TOMANDO GRUPOS DE TRES CAJAS PARA CADA UNA DE LAS TEMPERATURAS PROBADAS. POSTERIORMENTE SE DETERMINO EL CONTENIDO DE BETACIANINAS.

5.2.4. Efecto de los estímulos luminosos sobre el sistema.

La luz estimula la acumulación de betacianinas (Piatelli, 1969), en este trabajo se observó que sin un estímulo luminoso no se presenta acumulación de betacianinas por lo que se dedujo que ésta radiación es necesaria. Se estudió cómo el tiempo e intensidad de la radiación influyen conjuntamente sobre la acumulación de betacianinas.

Diferentes grupos de plántulas se expusieron a luz solar durante periodos: 5, 15 y 30 minutos, posteriormente se incubaron bajo luz de lampara incandescente o en oscuridad hasta completar 24 h. A otros lotes se les dio 15, 30 y 60 minutos de exposición a la luz de lampara (de 100 Watts de intensidad) incubándose de la misma forma que los lotes anteriores (Fig. 12). Se observó que a tiempos cortos de exposición luminosa la cantidad de betacianinas que se acumulan después de la incubación a las 24 horas es menor que en periodos más prolongados de exposición a la luz. Periodos de 5 a 10 minutos presentan una acumulación de betacianinas más baja que de 30 a 60 minutos, independientemente de la intensidad de luz.

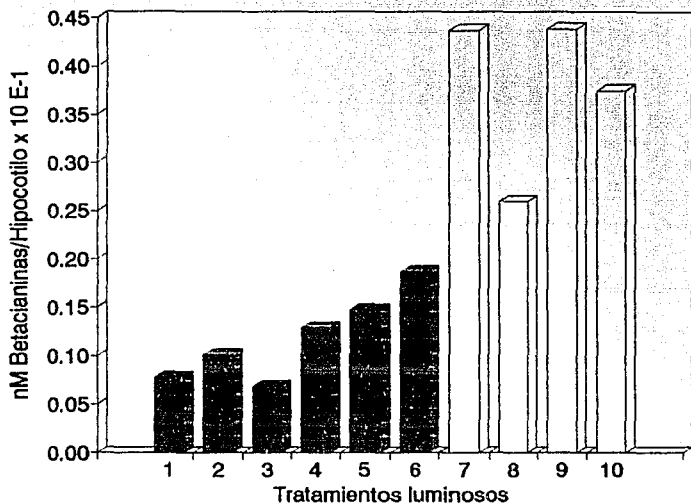


FIG. 12.- RESPUESTA SOBRE LA ACUMULACION DE BETACIANINAS EN PLANTULAS DE *Amaranthus hypochondriacus* DE TRES DIAS DE EDAD DESPROVISTAS DE RAIZ, SUMERGIDAS EN AMORTIGUADOR TRIS-TIROSINA DURANTE 24 h. ESTAS FUERON INCUBADAS A DIFERENTES PERIODOS E INTENSIDADES DE ESTIMULOS LUMINOSOS. Las condiciones fueron: 1, 2 y 3 estimuladas durante 5, 15 y 30 minutos con luz solar después incubados en oscuridad hasta completar 24 h. 4, 5 y 6 se estimularon con 30, 60 y 90 minutos con luz de lampara de 100 Watts e incubados en oscuridad a completar 24 h. De 7,8 y 9 se estimularon con 5, 15 y 30 minutos de luz solar y se incubaron con luz de lampara hasta completar 24 h, 10 solo se dejo bajo luz de lampara continua.

Se observó que hubo una acumulación lineal, en función del tiempo de estímulo luminoso independiente de la intensidad de la radiación, luz de lámpara o sol. Tiempos prolongados de radiación sólo presentaron las desviaciones típicas de respuesta en cuanto a la capacidad de la plántula para sintetizar el pigmento. Observando el tratamiento 7 (plántulas incubadas bajo luz de lámpara las 24 horas), se determinó que la luz continua produjo una respuesta máxima.

En base a estos resultados se decidió buscar el tiempo óptimo de respuesta bajo luz para la acumulación de betacianinas bajo condiciones estándar, sin estrés, (Fig. 13). La acumulación fue proporcional al tiempo de incidencia de luz (100 Watts) sobre el sistema. Entre 5 y 6 horas se presentó una respuesta considerable por lo que este periodo se tomó como el tratamiento más apropiado, ya que cinco horas de estímulo fueron suficientes, aunque la exposición de las plántulas por periodos de más de 5 h presentaron una respuesta ligeramente mayor.

La luz estimula el fitocromo en el tipo de respuestas HIR; al respecto Piatelli (1969), reportó que la acumulación de betacianinas en respuesta a la incidencia de luz se debe a dos fenómenos el estímulo de HIR y de LIR. Nosotros con nuestros experimentos observamos que para que se dé el fenómeno de acumulación de betacianinas por estrés pudiese ser necesario que se estimule el sistema de HIR, ya que con tiempos cortos de iluminación el sistema no responde.

Sakuta (1987a), encuentra mayor acumulación de betacianinas en cultivo de células de *Phytolacca americana* en concentraciones altas de sacarosa (88 mM). La irradiación recibida por las plántulas genera una acumulación de fotosintatos que puede ser la condición necesaria para que se incremente la cantidad de betacianinas.

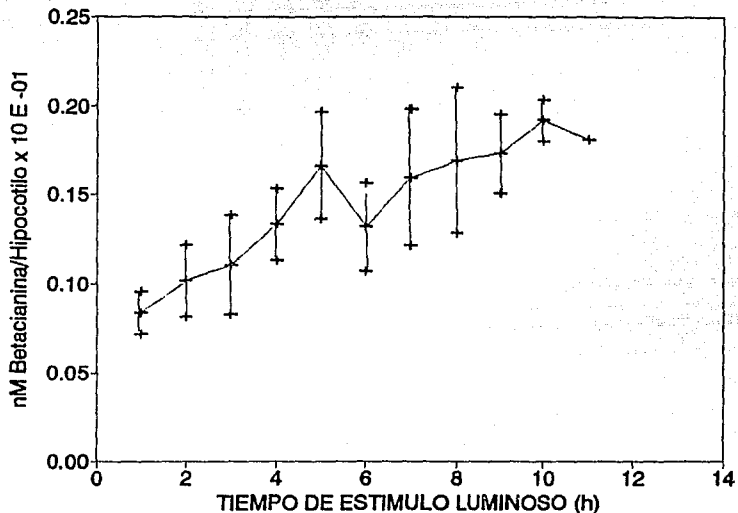


FIG. 13.- ACUMULACION DE BETACIANINAS A DIFERENTES PERIODOS DE ESTIMULOS LUMINOSOS. Se incubaron plántulas desprovistas de raíz en amortiguador tris-tirosina pH 8.2 dejandose bajo exposición de luz de lampara (100 Watts) por los periodos señalados y después se incubaron en oscuridad hasta completar 24 horas desde el inicio del experiento. Cada punto corresponde a dos experimentos con tres repeticiones.

5.2.5.- Determinación del tiempo óptimo de respuesta a estrés después del estímulo luminoso

Después de elegir un lapso de 5 horas de radiación luminosa como el más apropiado para estimular el sistema, se determinó el periodo de incubación en oscuridad para permitir el desarrollo de la respuesta. En la figura 14 podemos observar que entre 20 y 30 horas se llega a un estado estacionario de acumulación de betacianinas, pareciéndonos adecuado elegir un tiempo de 24 horas de incubación como el apropiado para observar los resultados.

5.3.-PARAMETROS QUE HACEN VARIAR LA ACUMULACION DE BETACIANINAS (EN PLANTULAS DE AMARANTO DE TRES DIAS DE EDAD, SIN RAIZ), COMO RESPUESTA A LA PRESENCIA DE SOLUCIONES CON POTENCIALES OSMOTICOS BAJOS.

Para exponer las plántulas a estrés de déficit de agua (potencial osmótico bajo), se eligieron: sacarosa, PEG y manitol para diferenciar su efecto osmótico-estresante de su papel en el metabolismo (Slavik, 1977) y de esta manera cumplir con el objetivo de evaluar la respuesta de acumulación de betacianinas bajo diferentes potenciales osmóticos.

5.3.1. Evaluación del potencial hídrico original de las plántulas.

Al evaluar el potencial hídrico inicial de las plántulas por a) el método de Chardakoff (Salisbury, 1978), se obtuvo un valor entre 0.20 y 0.25 MPa de potencial hídrico, y por b) el método de volumen constante (Salisbury, 1978), se encontró que el potencial hídrico fué de -0.224 MPa, valor que se usó como referencia

De estos resultados se infirió que la incubación de las plántulas en soluciones de concentraciones mayores de 100 mM ($\Psi_w = -0.224$ MPa) de solutos monoiónicos generaron estrés de déficit de agua.

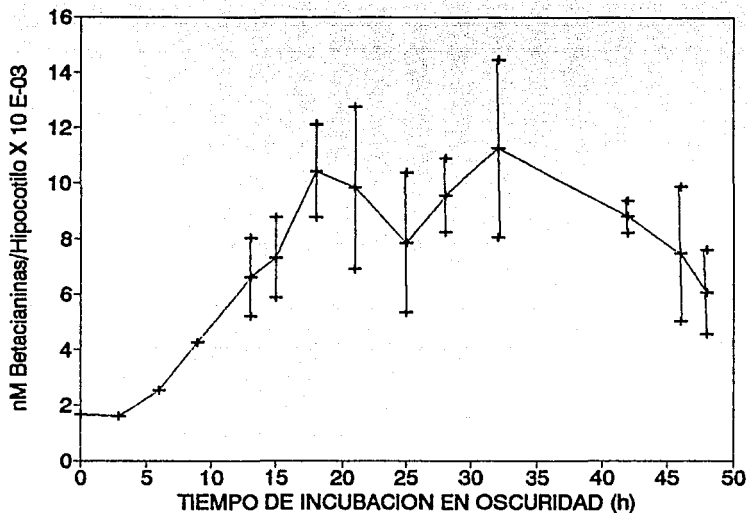


FIG. 14.- ACUMULACION DE BETACIANINAS EN PLANTULAS DE *Amaranthus hypochondriacus* DE TRES DIAS DE EDAD DESPROVISTAS DE RAIZ, SUMERGIDAS EN AMORTIGUADOR TRIS-TIROSINA. A las plántulas se les dió un estímulo de 5 horas de luz y después se incubaron bajo oscuridad por los tiempos señalados. Cada punto corresponde a tres determinaciones en un mismo experimento.

Las plántulas estresadas presentaron poco vigor, por lo que se decidió incubarlas en concentraciones crecientes de sacarosa como osmolito generador de potenciales hídricos bajos que producen estrés.

5.3.2. Efecto de sacarosa

Para investigar el efecto de sacarosa sobre el sistema, se determinó la acumulación de betacianinas como función de la concentración de sacarosa (Fig. 15), la máxima acumulación se observó a una concentración de sacarosa de 200 mM. ($\Psi_w = -0.449$ MPa). A concentraciones más bajas la respuesta fue errática, y a concentraciones más elevadas se inhibió la respuesta.

Entre 75 y 200 mM de sacarosa, se observó una respuesta lineal, proporcional a la concentración de sacarosa. En función de la revisión de literatura esta respuesta puede resultar de los siguientes factores:

- 1.- Acumulación de metabolitos secundarios, en este caso betacianinas, por un alto aporte energético (Gershenzon, 1984)
- 2.- Efecto osmoprotector de la sacarosa (Koster y Leopold, 1988), el cual permitiría un estado fisiológico óptimo.
- 3.- Acumulación de metabolitos por el estrés de déficit de agua generado por el potencial osmótico en la solución.

Para esclarecer el efecto de la sacarosa en la acumulación de betacianinas se realizó el estudio presentado en el esquema de la fig 16.

5.3.3.- Participación de la sacarosa como soluto modificador del potencial osmótico.

La figura 17 muestra el potencial osmótico alcanzado en función de la concentración de sacarosa en el medio. Se presentó una respuesta lineal y proporcional hasta una concentración de 400 mM de sacarosa.

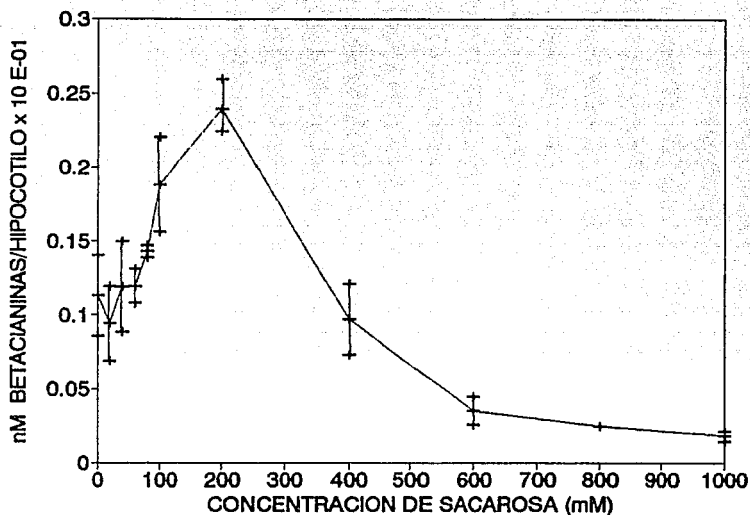


FIG. 15.- EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SACAROSA EN LA ACUMULACION DE BETACIANINAS EN PLANTULAS DE *Amaranthus hypochondriacus* DE TRES DIAS DE EDAD DESPROVISTAS DE RAIZ. Las plántulas ya desprovistas de raíz fueron estimuladas por 5 horas bajo luz y después se incubaron en amortiguador tris-tirosina pH 8.2 y diferentes concentraciones de sacarosa. Cada punto corresponde a 4 experimentos independientes con tres repeticiones.

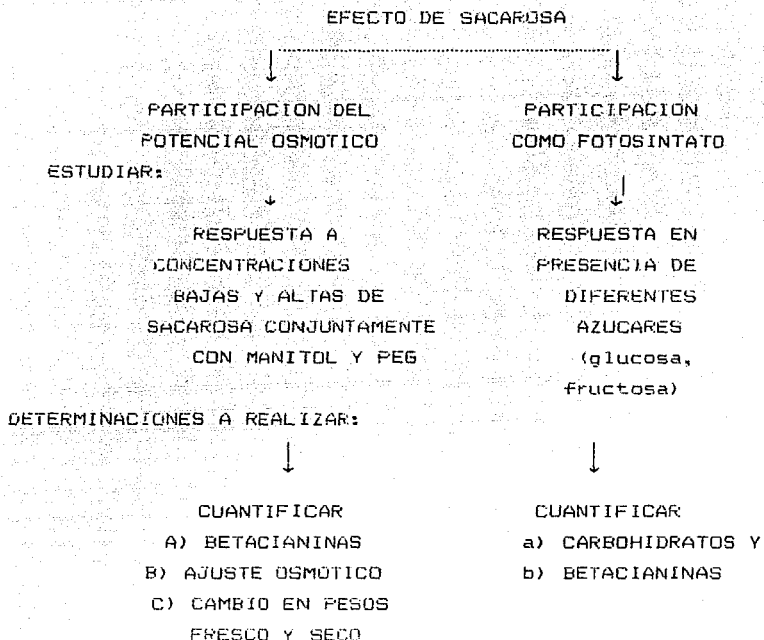


Fig. 16 Esquema para determinar el papel de sacarosa en la acumulacion de betacianinas.

Al determinar el efecto de sacarosa sobre el peso seco y el peso fresco y longitud de las plántulas (Fig. 18), se encontró que entre 0 y 100 mM de sacarosa se presentó un incremento lineal en peso fresco y seco; entre 100 y 200 mM de sacarosa se observó un aumento sólo en el peso seco. Concentraciones mayores de 200 mM causaron una disminuci3n en el crecimiento. La longitud de las plántulas mostraron un comportamiento semejante al del peso fresco.

Debido a que el potencial osm3tico inicial en las plántulas fué de -0.124 MPa se considera que de 20 a 100 mM de sacarosa no se produjo estr3s de déficit de agua y los pesos seco y fresco aumentaron linealmente con el incremento en sacarosa en el medio de incubacion, concentraciones mayores aparentemente generaron

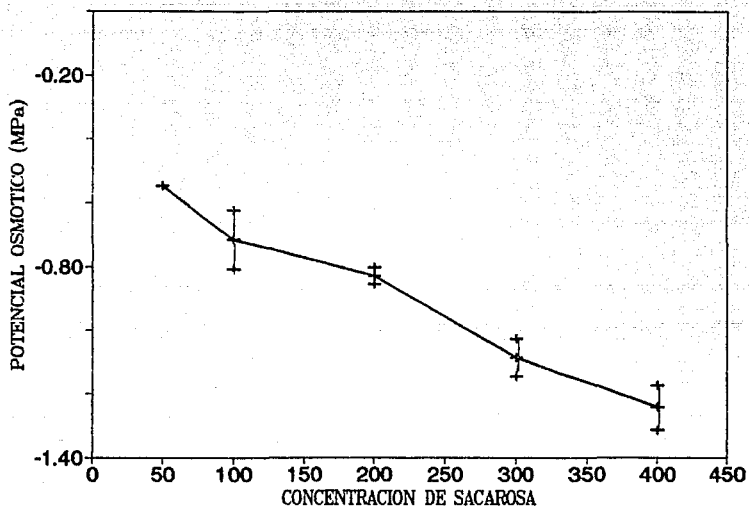


FIG. 17.- AJUSTE DE POTENCIAL OSMOTICO EN PLANTULAS DE *Amaranthus hypochondriacus* DE TRES DIAS DE EDAD DESPROVISTAS DE RAIZ DESPUES DE 5 HORAS DE ESTIMULO LUMINOSO. Estas fueron puestas en a diferentes concentraciones de sacarosa. Cada punto corresponde a el promedio de tres determinaciones con dos repeticiones cada uno.

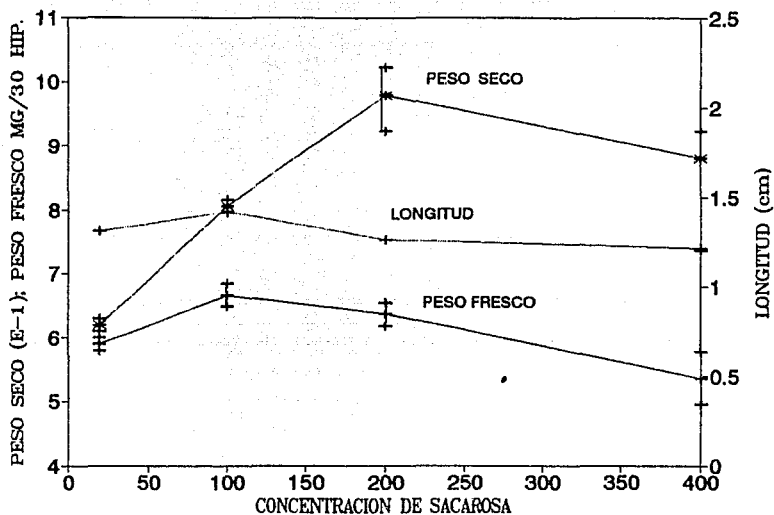


FIG. 18.- EFECTO DE SACAROSA SOBRE PESO SECO, PESO FRESCO Y LONGITUD EN PLANTULAS DE *Amaranthus hypochondriacus* DE TRES DIAS DE EDAD DESPROVISTAS DE RAIZ DESPUES DE 5 HORAS DE ESTIMULO LUMINOSO.

estrés para las plántulas, puesto que no hubo incremento en el peso fresco. Sin embargo a estas concentraciones (de 100 a 200 mM de sacarosa), continuó dándose un aumento de peso seco, probablemente como resultado de la acumulación de osmolitos.

La respuesta de las plántulas en los diferentes parámetros determinados (betacianinas, pesos fresco y seco y longitud), tuvo un rango de potencial osmótico en el medio (de -0.192 a -0.561 MPa) en el cual se presenta positiva.

Para diferenciar los factores que pudiesen participar en la respuesta en sus concentraciones óptimas de sacarosa (75 - 250 mM), se realizaron los siguientes experimentos con PEG y manitol, conjuntamente con dos concentraciones de sacarosa: 20 mM con el fin de proporcionar suficientes carbohidratos para que se supere parcialmente el bajo vigor de las plántulas y 100 mM en el caso de que la concentración de 20 mM no fuera suficiente para superar el déficit energético.

5.3.3.1.- Respuesta a concentraciones bajas de sacarosa.

La acumulación de betacianinas en presencia de 20 mM de sacarosa, tuvo un punto máximo a 0.35 % de PEG (Fig. 19), lo cual corresponde a un potencial hídrico de -0.24 MPa. La acumulación de betacianinas fué sólo de un 10% respecto al control.

Para estas condiciones se determinó también el potencial osmótico (Fig. 20), resultando de 0.05 MPa el cambio de potenciales entre las condiciones control y las de estrés osmótico.

A concentraciones bajas de sacarosa (Fig. 19) no se presentó acumulación de betacianinas a ninguna concentración manitol por lo cual se considero que no hay respuesta bajo ningún agente que produce estrés de déficit de agua (PEG o manitol).

Respecto al ajuste osmótico, la respuesta presentada bajo estas condiciones, en PEG, es mínima, llegando a ser de -0.61 MPa en una solución de potencial osmótico de -0.91 MPa, en el medio,

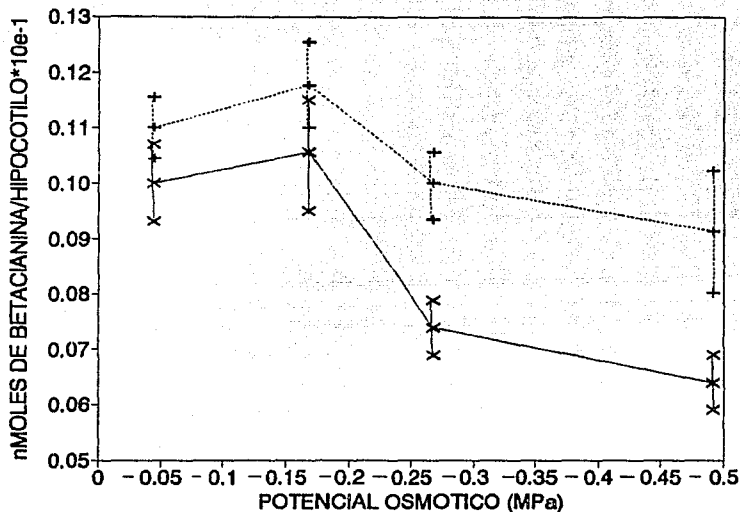


FIG. 19.- ACUMULACION DE BETACIANINAS EN PLANTULAS DE *Amaranthus hypochondriacus* DE TRES DIAS DE EDAD, DESPROVISTAS DE RAIZ, DESPUES DE 5 HORAS DE ESTIMULO LUMINOSO Y BAJO EFECTO DE AGENTES ESTRESANTES PEG (..+..) Y MANITOL (-x-) A CONCENTRACIONES MINIMAS DE SACAROSA (20 mM). La concentración de PEG se ajustó a una concentración (%) tal que genera un potencial osmótico señalado. Cada punto corresponde a tres experimentos independientes con tres repeticiones.

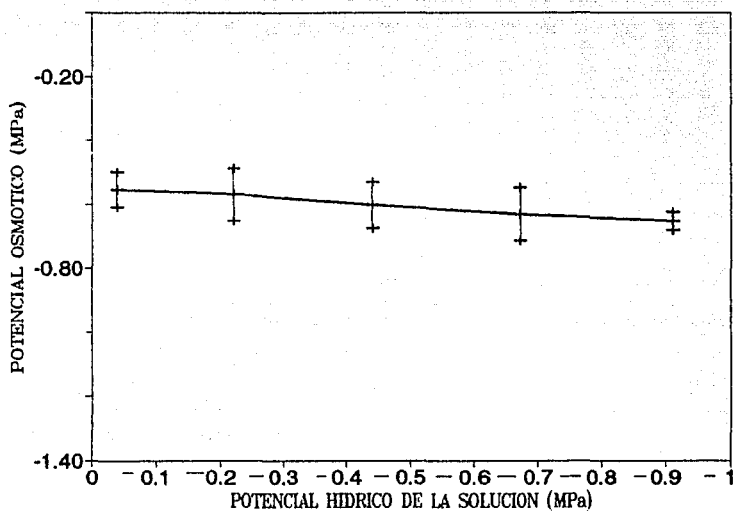


FIG. 20.- AJUSTE DE POTENCIAL OSMOTICO EN PLANTULAS DE *Amaranthus hypochondriacus* DE TRES DIAS DE EDAD DESPROVISTAS DE RAIZ DESPUES DE 5 HORAS DE ESTIMULO LUMINOSO. Estas fueron puestas en presencia de sacarosa 20 mMolar y diferentes concentraciones de PEG las cuales proporcionan el potencial señalado. Cada punto corresponde a el promedio de tres determinaciones con dos repeticiones cada uno.

mientras que en presencia de sacarosa sola (Fig. 17) el potencial osmótico baja a -1.2 MPa bajo las mismas condiciones de estrés (-0.91 Mpa).

Respecto a la hipótesis planteada estos resultados pudiesen implicar la necesidad de un aporte carbonado alto para que la acumulación de betacianinas se lleve a cabo.

5.3.3.2.- Respuesta a concentraciones altas de sacarosa

Cuando las plántulas se sometieron a un exceso de sacarosa (Fig. 21) el punto máximo de acumulación de betacianinas se encontró a un potencial osmótico más elevado entre, 0.5 y 0.75 % de PEG el cual corresponde a un potencial osmótico de 0.449 Mpa.

La presencia de una concentración de 100 mM de sacarosa en el medio y manitol (Fig 21), se produjo una respuesta positiva de acumulación de betacianinas casi nula.

En la Fig. 21 observamos que la acumulación máxima de betacianinas se dio a una concentración de 100 mM del agente osmótico sumado a la sacarosa 100 mM; o sea, a una concentración de 200 mM de osmolitos totales en el medio (-0.449 MPa), lo cual coincide con la respuesta en presencia de sacarosa sola (Fig. 15). En este caso el agente osmótico produjo una respuesta positiva de 20% más de acumulación de betacianinas, aunque ésta fué mínima comparada con la respuesta dada en presencia de sacarosa únicamente, la cual llegó a un 100% de incremento (Fig 15).

El potencial osmótico en el cual se da la respuesta máxima es de -0.449 MPa que equivale a una concentración de 200 mM de un osmolito monoiónico, en este caso dada por 100 mM del azúcar (-0.224 MPa) y otro tanto de PEG. De estos resultados podemos corroborar que alrededor de -0.449 MPa se encontró el punto óptimo de respuesta a estrés. La determinación de peso seco (Fig. 18) en diferentes concentraciones de sacarosa sola apoya ésta hipótesis ya que también la respuesta máxima de acumulación de osmolitos se encontró en este potencial osmótico o concentración de sacarosa.

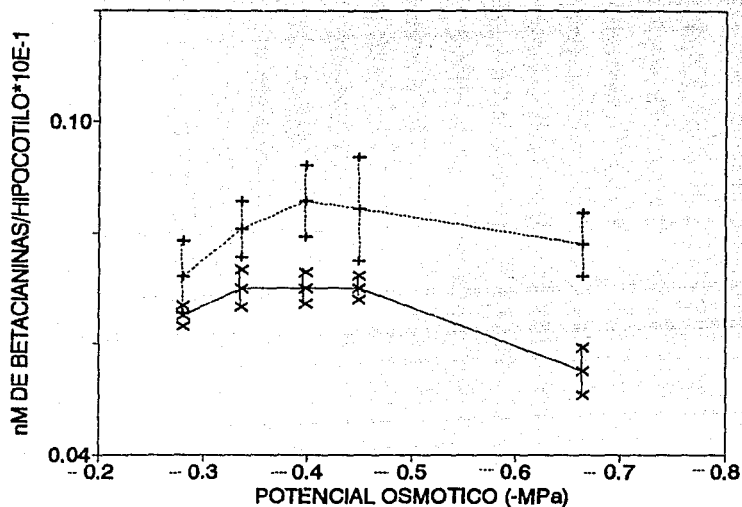


FIG 21.- ACUMULACION DE BETACIANINAS EN PLANTULAS DE *Amaranthus hypochondriacus* DE TRES DIAS DE EDAD DESPROVISTAS DE RAIZ DESPUES DE 5 HORAS DE ESTIMULO LUMINOSO, BAJO AGENTES ESTRESANTES PEG (...+...) Y MANITOL (-x-) A CONCENTRACION DE 100 mM DE SACAROSA. La cantidad de PEG se ajustó bajo los criterios de la gráfica anterior. Cada punto equivale a dos experimentos independientes con tres repeticiones.

En presencia de manitol y sacarosa 100 mM como concentración de azúcar basal (Fig. 21), la respuesta que se obtuvo fué menor que la obtenida con PEG. El manitol es una molécula soluble que puede penetrar a la planta y tener un efecto de interferencia con la síntesis de betacianinas ya que este puede participar en el metabolismo de las plántulas (Slavik, 1977).

Esta respuesta, en presencia de manitol y sacarosa 100 mM, tuvo un punto máximo de acumulación de betacianinas a potenciales osmóticos mas altos de -0.22 MPa, el cual corresponde a una solución de 75-100 mM de un osmolito con grado de disociación de uno, lo cual queda en el rango de potencial de agua donde se da la respuesta óptima de acumulación de betacianinas en presencia de PEG y sacarosa 100 mM.

El ajuste osmótico puede ser otro indicador de la respuesta positiva al estrés, por lo que se determinaron los potenciales osmóticos que se alcanzan en presencia de PEG y sacarosa 100 mM (Fig. 22). Se observó que alrededor del punto máximo de acumulación (-0.39 - -0.48 MPa) se dió también el ajuste osmótico mayor como respuesta al potencial osmótico del medio. Se consideró esto como una prueba positiva más a favor de que alrededor de -0.44 MPa se dió la respuesta máxima de acumulación de betacianinas a potenciales osmóticos bajos (generadores de estrés de déficit de agua) en este modelo.

5.5.3.3.- Respuesta a potenciales osmóticos constantes.

RESPUESTA A CONCENTRACIONES DE SACAROSA Y PEG AJUSTADOS A UN MISMO POTENCIAL OSMOTICO:

En la (Fig. 23) se observó un aumento lineal en el contenido de betacianinas respecto a la concentración de sacarosa hasta 120 mM, concentraciones mas altas presentaron la misma acumulación.

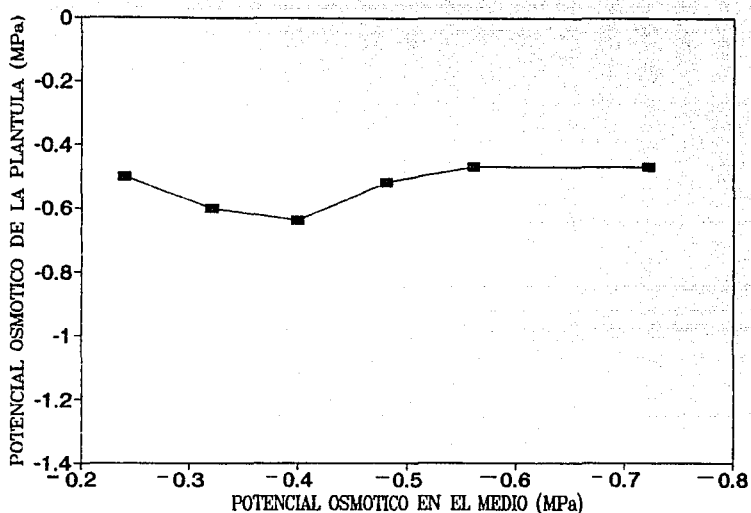


FIG. 22.- AJUSTE DE POTENCIAL OSMOTICO EN PLANTULAS DE *Amaranthus hypochondriacus* DE TRES DIAS DE EDAD DESPROVISTAS DE RAIZ DESPUES DE 5 HORAS SE ESTIMULO LUMINOSO, EN PRESENCIA DE SACAROSA 100 mM Y CONCENTRACIONES VARIABLES DE PEG HASTA ALCANZAR EL POTENCIAL OSMOTICO SEÑALADO. Cada punto equivale a dos experimentos independientes con dos repeticiones.

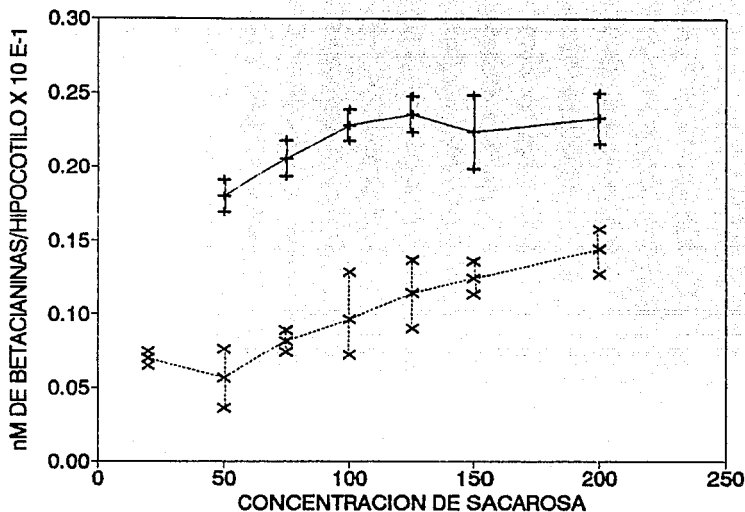


FIG. 23.- RESPUESTA DE ACUMULACION DE BETACIANINAS A ψ_{s2} CON PEG-SACAROSA (+) O MANITOL-SACAROSA (.X.), EN PLANTULAS DE *Amaranthus hypochondriacus* DE TRES DIAS DE EDAD DESPROVISTAS DE RAIZ, DESPUES DE 5 HORAS DE ESTIMULO LUMINOSO LAS PLANTULAS SE INCUBARON EN EL MEDIO HASTA COMPLETAR LAS 24 h. La concentración de sacarosa en el sistema está completada a un potencial osmótico de 0.449 Mpa con PEG (lo cual corresponde a una concentración de 200 mM). Cada punto equivale a tres experimentos independientes con tres repeticiones

EFFECTO DE MANITOL Y SACAROSA A POTENCIAL OSMÓTICO CONSTANTE.

En presencia de manitol se observó que la respuesta de acumulación de betacianinas fue lineal respecto a la concentración de sacarosa (Fig. 23), aunque en su magnitud fue mucho más baja que en los casos anteriores, 0.014 nMoles de betacianina/hipocotilo como concentración máxima de acumulación para este caso. La respuesta de ajuste de potencial osmótico (Fig. 24) presentó características similares a la respuesta de betacianinas.

Al utilizar manitol como agente generador de estrés y ajustar a un mismo potencial hídrico, no se presentó respuesta en función del potencial hídrico ya que las concentraciones obtenidas de betacianinas fueron muy bajas (0.006 - 0.014 nMoles/hipocotilo) comparadas con las obtenidas con sacarosa-PEG (0.018 - 0.022 nMoles de betacianinas/hipocotilo, Fig 23). La respuesta se presentó lineal en función de la concentración de sacarosa pero esto pudo ser debido al efecto protector de sacarosa ante condiciones adversas como lo reporta Koster (1988) para otros sistemas.

Los resultados obtenidos en las plántulas de amaranto de tres días de edad sin raíz fueron similares a los obtenidos por Sakuta (1987b) en cultivos de células en suspensión de *Phytolacca americana*. Sakuta encontró que a concentraciones crecientes de sacarosa y ajustadas a un mismo potencial osmótico (-0.7 MPa) con manitol, la respuesta es lineal respecto a la concentración de sacarosa, hasta una concentración de 98 mM. Aunque los modelos utilizados sean tan diferentes ambos tienen un punto máximo de respuesta tanto en concentración mínima de sacarosa, como en potencial hídrico.

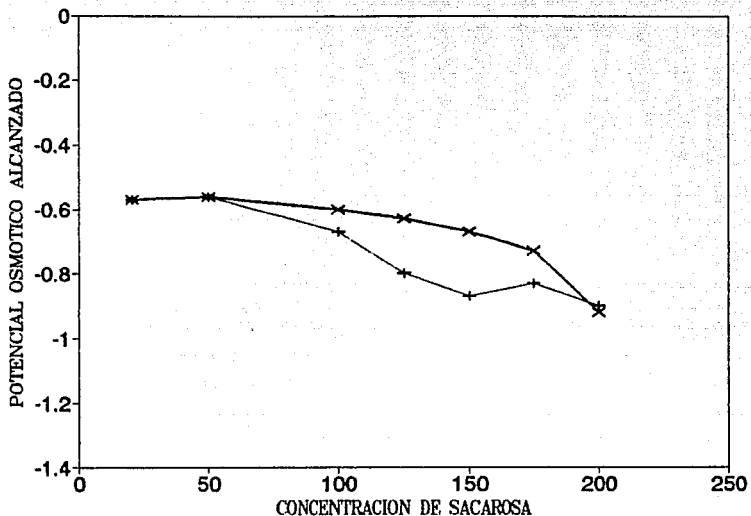


FIG. 24.- AJUSTE OSMOTICO A ψ_{H_2O} CONSTANTE (-0.449 MPa AJUSTADO CON PEG (-+-) O MANITOL (-x-) A CONCENTRACIONES VARIABLES DE SACAROSA) EN PLANTULAS DE *Amaranthus hypochondriacus* DE TRES DIAS DE EDAD DESPROVISTAS DE RAIZ, DESPUES DE 5 HORAS DE ESTIMULO LUMINOSO E INCUBADAS POSTERIORMENTE POR 24 h. Cada punto corresponde a un experimento con dos repeticiones.

5.3.4.-PARTICIPACION DE LA SACAROSA COMO APORTADOR DE FOTOSINTATOS EN LA ACUMULACION DE BETACIANINAS .

Si se comparara la magnitud del incremento de acumulación de betacianinas en plántulas de *Amaranthus hypochondriacus* de tres días de edad sin raíz, en presencia de sacarosa, con la que se obtuvo a ese mismo potencial hídrico en presencia de sacarosa y PEG, la diferencia de respuesta fué de un 40 a un 100% de incremento. La sacarosa pues tiene un papel adicional al de proporcionar un potencial osmótico, como puede ser el de proporcionar un considerable aporte energético (Ackerson, 1981, Okazaki et al, 1987, Osuna, 1987, Schwab y Gaff, 1986, Spyropoulos, 1982 y Morgan 1984). A fin de comprobar esta posibilidad, se determinó la concentración de azúcares alcanzada en la plántula en presencia de diferentes concentraciones de sacarosa en el medio (Fig. 25)

La cantidad de sacarosa calculada por gramo de tejido fresco en las plántulas incubadas en condiciones de sacarosa baja (20 mM), fué de 6 μ g y disminuyó ligeramente cuando estas se incubaron a concentraciones mas altas de sacarosa (fig. 25). Esto descarta la posibilidad de que fuera la presencia de sacarosa interna (en la plántula), lo que provocó el aumento de betacianinas. De las posibilidades presentadas también se descartó que se presentara un efecto osmoprotector en este caso.

La respuesta de acumulación de carbohidratos reductores directos fue proporcional a la concentración de sacarosa en el medio, al igual que carbohidratos totales (fig 24), lo cual indicó que a medida que la respuesta de acumulación de betacianinas fué positiva existió una mayor disponibilidad de fotosintatos reactivos, que pudieron ser glucosa y fructosa. Esto sugiere que cuando entró la sacarosa a los tejidos de la plántula se pudo hidrolizar en sus componentes, glucosa y fructosa.

Se determinó también la concentración de azúcares solubles totales en respuesta a estrés de déficit de agua bajo potencial osmótico constante en presencia de PEG o manitol ajustados a -0.449 MPa. (fig 26). Se observó que los rangos de acumulación

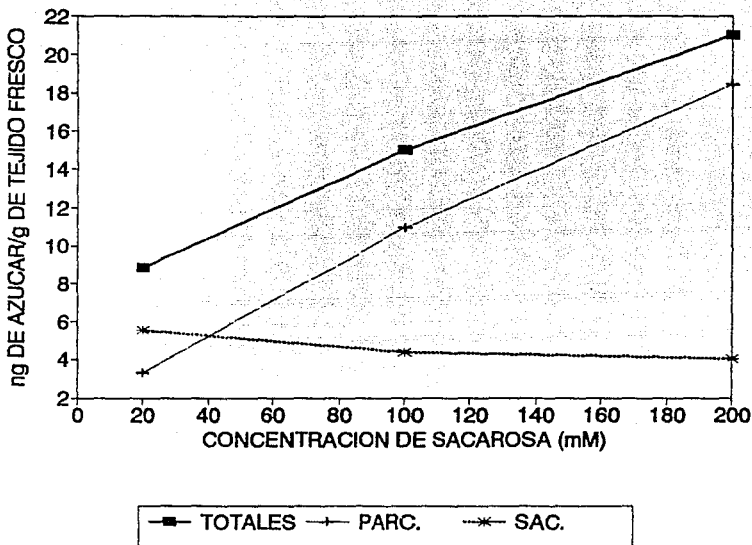


FIG. 25.- ACUMULACION DE CARBOHIDRATOS EN LA PLANTULA EN PRESENCIA DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SACAROSA EN EL MEDIO DE INCUBACION, EN PLANTULAS DE *Amaranthus hypochondriacus* DE TRES DIAS DE EDAD DESPROVISTAS DE RAIZ DESPUES DE 5 HORAS DE ESTIMULO LUMINOSO. Las plántulas sin raíz fueron incubadas bajo diferentes concentraciones de sacarosa después de un estímulo de 5 horas de luz y las determinaciones realizadas fueron carbohidratos reductores totales (x), reductores directos (+) y su diferencia se asume como sacarosa (*). Cada punto corresponde a un experimento con tres repeticiones.

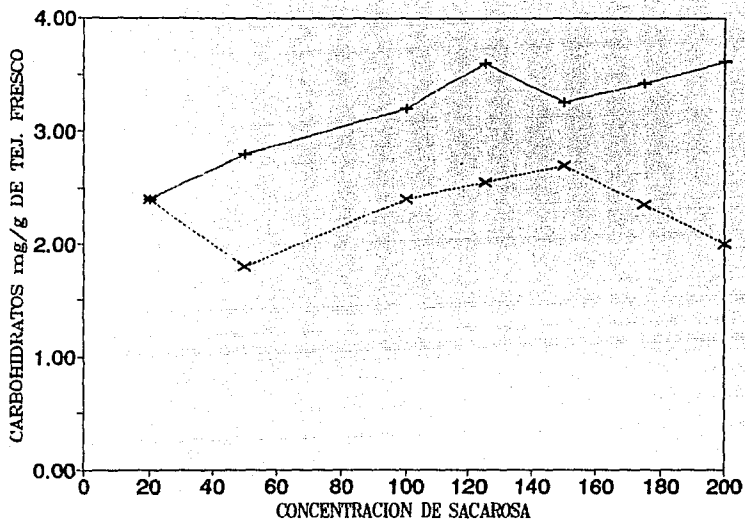


FIG. 26.- ACUMULACION DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES TOTALES A ψ_{H_2O} CONSTANTE AJUSTADO CON PEG-SACAROSA (+) O MANITOL-SACAROSA (x), EN PLANTULAS DE *Amaranthus hypochondriacus* DE TRES DIAS DE EDAD DESPROVISTAS DE RAIZ, DESPUES DE 5 HORAS DE ESTIMULO LUMINOSO INCUBADAS POSTERIORMENTE 24 h EN OSCURIDAD. Cada punto corresponde a un experimento con dos repeticiones.

máxima de azúcares solubles (Fig 26), son paralelos a la acumulación de betacianinas (fig 23) en condiciones similares. Esto presenta una evidencia positiva de que la disponibilidad de carbohidratos, contribuyó a que se presentara una acumulación mayor de betacianinas.

La acumulación de carbohidratos solubles (fig 26) fue proporcional al potencial osmótico alcanzado (fig 24). Debido a este paralelismo podemos pensar que la acumulación de carbohidratos es una de las respuestas posibles en el ajuste osmótico en *Amaranthus hypochondriacus* como respuesta a estrés de déficit de agua, como sucede en otras especies vegetales (Morgan, 1984).

DETERMINACION DE BETACIANINAS EN PRESENCIA DE GLUCOSA Y FRUCTOSA

Se determinó la acumulación de betacianinas como función de concentraciones crecientes de glucosa y de fructosa pensando que estos azúcares pueden también proporcionar el carbono necesario para la síntesis de betacianinas. Se encontró que la respuesta (Fig. 27) no se presenta ni con el mismo patrón, ni en la misma magnitud que con sacarosa (Fig. 15).

La acumulación de betacianinas en presencia de fructosa fue nula y esto correspondió a las medidas de crecimiento en peso fresco y peso seco en donde tampoco hubo respuesta (Fig 28). Esta falta de crecimiento puede ser la causa de que no se presentara una respuesta positiva.

La respuesta con glucosa fue positiva y ligera hasta 100 mM (fig. 27), probablemente porque en este caso este azúcar si puede dar un aporte energético a las plántulas, lo que se tradujo en crecimiento, medido como peso fresco (fig. 28).

MODELO DE LA PARTICIPACION DE ESTRES DE DEFICIT DE AGUA Y CARBOHIDRATOS EN LA ACUMULACION DE BETACIANINAS.

La respuesta en los diferentes modelos estudiados pudo deberse a cambios en la disponibilidad de los carbohidratos

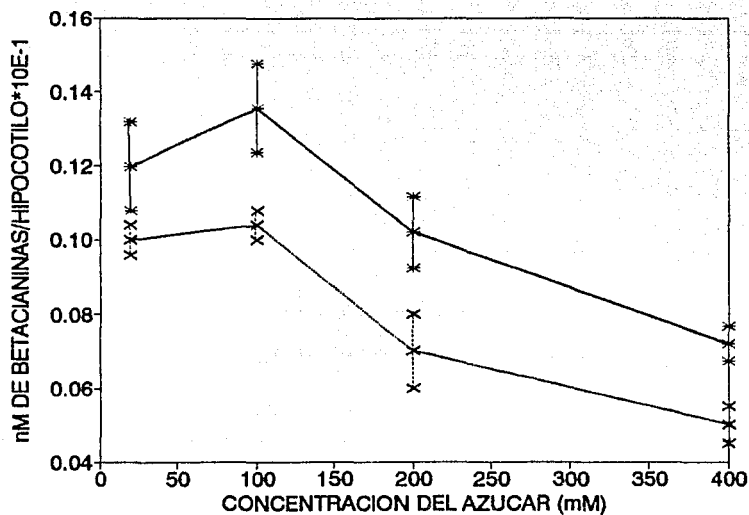


FIG. 27.- RESPUESTA EN LA ACUMULACION DE BETACIANINAS EN PRESENCIA DE GLUCOSA (*) O FRUCTOSA (+) EN PLANTULAS DE *Amaranthus hypochondriacus* DE TRES DIAS DE EDAD DESPROVISTAS DE RAZ DE RAIZ DESPUES DE 5 HORAS DE ESTIMULO LUMINOSO. Las plántulas fueron incubadas en oscuridad por 24 horas en presencia de los azúcares señalados. Cada punto corresponde a 3 experimentos independientes con tres repeticiones.

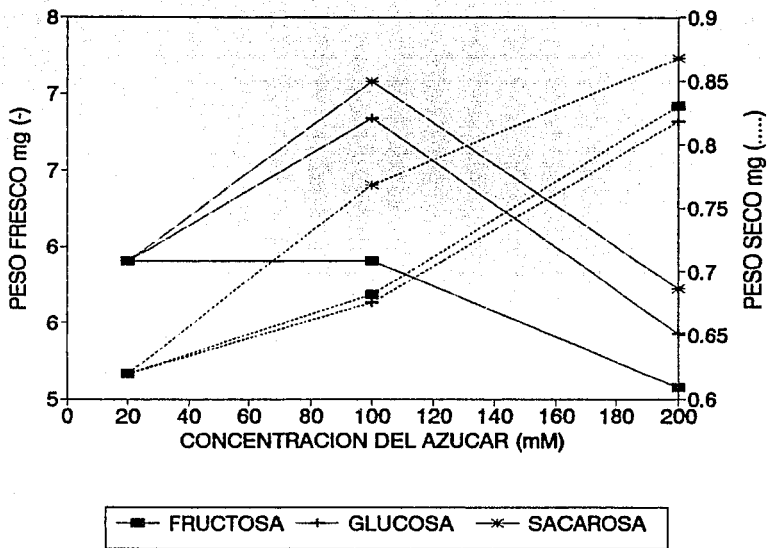
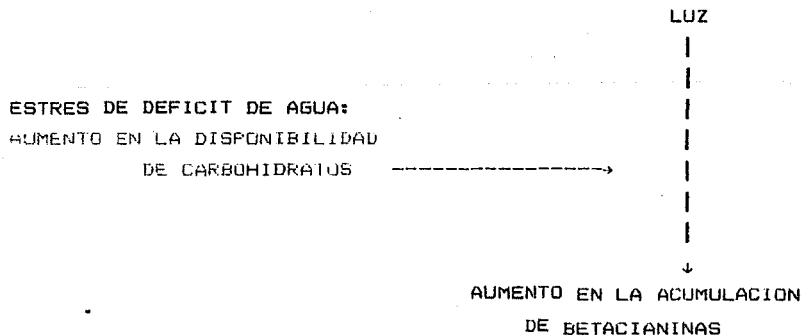


FIG. 28.- EFECTO DE DIFERENTES AZUCARES SOBRE PESO FRESCO, PESO SECO A DIFERENTES CONCENTRACIONES. EN PLANTULAS DE *Amaranthus hypochondriacus* DE TRES DIAS DE EDAD DESPROVISTAS DE RAIZ DESPUES DE 5 HORAS DE ESTIMULO LUMINOSO. Las plántulas se trataron como en los experimentos anteriores y se incubaron con los azúcares señalados. Cada punto corresponde a dos experimentos independientes con tres repeticiones cada uno.

causados por el estrés (Jones 1981). En plántulas completas, la raíz puede promover por medio de estímulos hormonales la movilización de reservas de los cotiledones. En plántulas sin raíz que han recibido el "estímulo" de cinco horas de luz, éste pudo proporcionar una cantidad básica de carbohidratos para la biosíntesis de metabolitos secundarios. En plántulas incubadas en un medio con sacarosa, este azúcar proporciona la potencialidad para la síntesis de betacianinas como sucede para otros metabolitos secundarios (Discomo y Towers, 1984).

Relacionando estas características en plántulas con lo encontrado en explantes (Fig 7), existe la posibilidad de que en este caso las respuestas fueron mediadas por potasio y/o carbohidratos. Morgan (1984) indica que estos compuestos pueden movilizarse o cambiar sus concentraciones acumulándose como osmoreguladores en estrés. Otra evidencia que apoya esta hipótesis es que la presencia de potasio y potenciales osmóticos altos provoca un aumento en la acumulación de betacianinas en plántulas sin raíz de *Amaranthus caudatus* (Elliot 1979 a y b).

Debido a la influencia de estos parámetros sobre la acumulación de betacianinas se propuso el siguiente modelo de comportamiento:



5.4.- CINÉTICA DE ACUMULACION DE BETACIANINAS EN CONDICIONES DE RESPUESTA OPTIMAS

Como último objetivo se propuso conocer la cinética de acumulación de betacianinas en estrés osmótico por lo que se procedió a estudiar su acumulación y cuantificar la actividad de la enzima decolorasa a lo largo del tiempo, y conocer si es la vía degradativa o la ruta biosintética la que está regulando la acumulación de betacianinas observada.

5.4.1. Cuantificación de betacianinas en función del tiempo de incubación.

Como lo muestra la figura 29, la concentración de betacianinas se incrementó linealmente durante el periodo experimental a las tres concentraciones de sacarosa probadas. La concentración a la que se llega en las condiciones antes mencionadas, pudo deberse a dos fenómenos, un aumento de la biosíntesis, o bien una disminución de la degradación.

5.5.2.- Papel de la enzima decolorasa en la acumulación de betacianinas

Elliot (1984) realizó un estudio sobre la enzima decolorasa de las betacianinas y encontró que tiene un pH óptimo de 3.4. Con este método se trabajó obteniéndose una cinética de reacción que presenta inhibición en un periodo corto de tiempo llegando a inactivarse totalmente (Fig 30). Elliot no reporta este tipo de inhibición sin embargo menciona que dependiendo de la concentración de proteína que se ponga en el ensayo tiene un periodo de retardamiento para que se presente su actividad, de lo cual se supone que esta enzima, ó complejo de enzimas, tiene una cinética no Michaeliana cuyas variantes se presentan de acuerdo a las condiciones de extracción y en el sistema que se estudie.

Para poder realizar nuestro estudio se decidió tomar la pendiente de los primeros 30 segundos de actividad enzimática como la actividad de la enzima en las condiciones del ensayo. Para establecer las concentraciones necesarias de sustrato se determinó la velocidad en función de concentraciones variables de sustrato

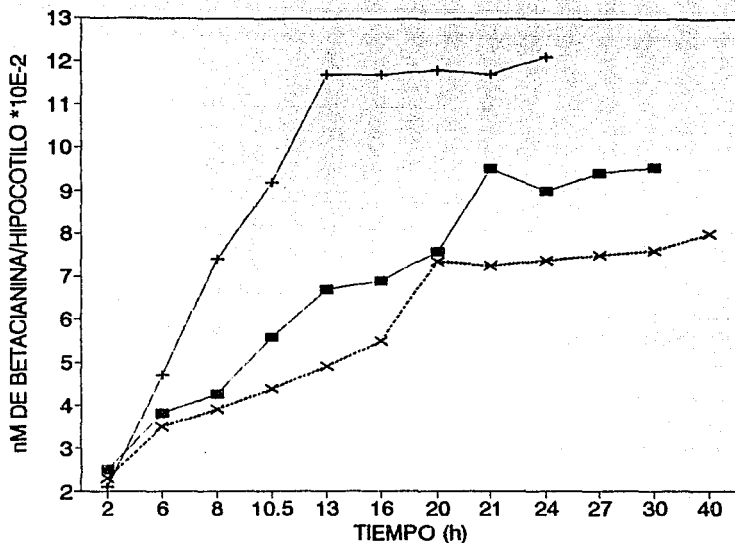


FIG. 29.- CINETICA DE ACUMULACION DE BETACIANINAS EN SOLUCIONES DE SACAROSA: (+.) 400 mM; (■) 20 mM; (x) 200 mM. El tiempo considerado es desde que las plántulas se comenzaron a cortar dándoseles 5 horas de incubación bajo luz y el resto bajo oscuridad. Cada punto representa dos determinaciones independientes con tres repeticiones.

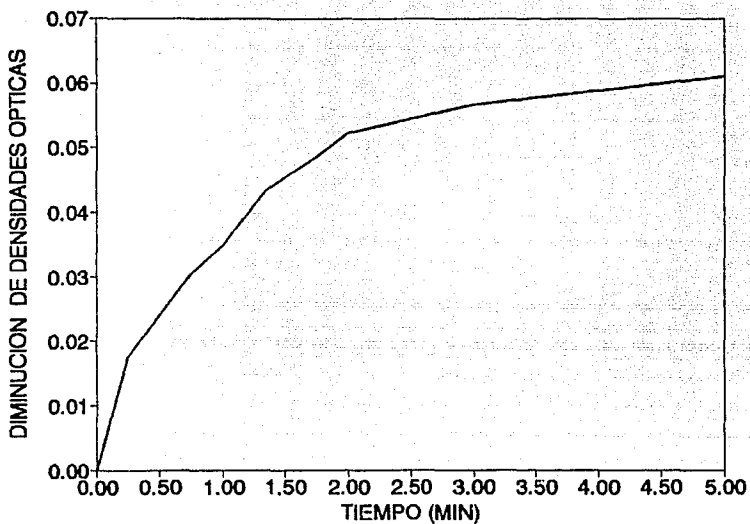


FIG. 30.- ACTIVIDAD DE LA ENZIMA DECOLORANTE EN FUNCION DEL TIEMPO DE ENSAYO. La concentración de sustrato proporcionada es 5 veces la K_m reportada por Elliot et al (1983b) y 50 mg de proteína.

(Fig. 31), donde a 7 nMoles de betacianina el sistema se encontró saturado por lo que se utilizaron 15 nMoles de sustrato por ensayo (que corresponden a 1.6 densidades ópticas de absorbencia), para asegurar que el sistema estuviese saturado de sustrato.

Se determinó la actividad específica de la enzima decolorasa (Fig 31) a las 15 y 24 hrs de incubación de las plántulas en la diferentes concentraciones de sacarosa ya que en estos tiempos se presentó diferente estado de cinética de acumulación (fig 29).

Se observó que los cambios presentados con altas y bajas concentraciones de sacarosa, no fueron significativos, de lo cual pudo inferir que es la ruta biosintética la que podría regular la concentración de betacianinas presentada en las diferentes condiciones estudiadas.

De la respuesta observada en ambos modelos (explantos y plántulas), se pudo concluir que el potencial osmótico bajo, como agente productor de estrés de déficit de agua, fue lo que produjo una mayor acumulación de betacianinas, cuya intensidad varió dependiendo del agente osmótico y concentraciones de azúcares utilizadas. Esto aporta una evidencia a favor de la hipótesis planteada.

Esta mayor acumulación de betacianinas no solo fué función del potencial osmótico sino también fué influenciada por la presencia de luz, la naturaleza de este fenómeno queda aún por resolverse. La luz puede provocar un aumento en la acumulación de carbohidratos o puede estimular a fotoreceptores a alta intensidad luminosa. Por los resultados obtenidos en el modelo de plántulas queda probado que la presencia de cantidades altas de fotosintatos (100 mM de sacarosa) causaron como respuesta una mayor acumulación de betacianinas después de un período de estímulo luminoso, que pudo provocar una acumulación mayor de azúcares vía fotosíntesis. Sería necesario probar el papel de este estímulo en la respuesta.

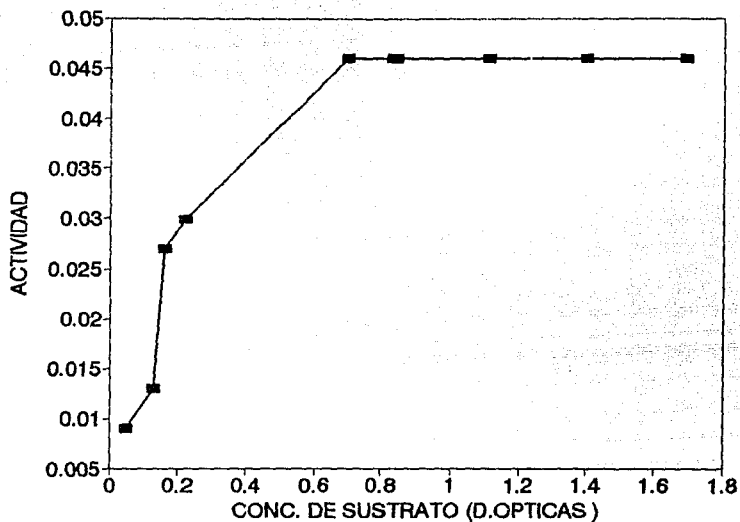


FIG. 31.- CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LA ENZIMA DECOLORANTE A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SUSTRATO. EN PLANTULAS DE *Amaranthus hypochondriacus* DE TRES DIAS DE EDAD DESPROVISTAS DE RAZ DE RAIZ DESPUES DE 5 HORAS DE ESTIMULO LUMINOSO. Ver materiales y métodos .

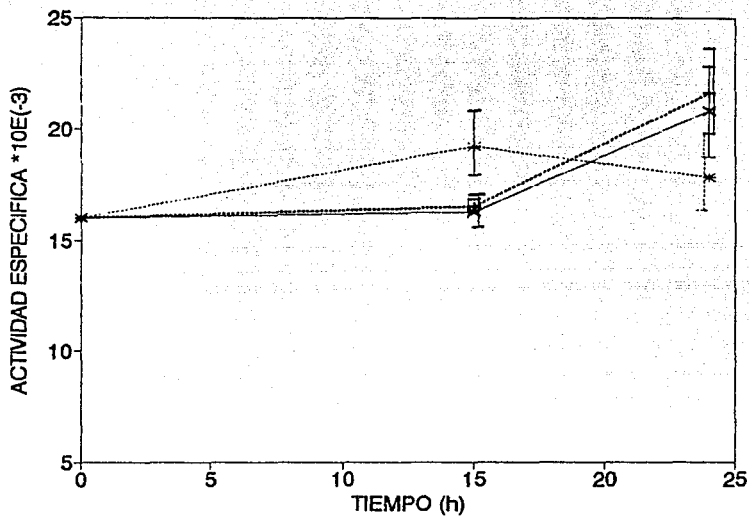


FIG. 32.- ACTIVIDAD DE LA ENZIMA DECOLORANTE EN PLANTULAS DE *Amaranthus hypochondriacus* DE TRES DIAS DE EDAD DESPROVISTAS DE RAZA INCUBADAS EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SACAROSA DESPUES DE 5 HORAS DE ESTIMULO LUMINOSO HASTA COMPLETAR 34 h. (las concentraciones fueron (---^---) 300 mM; (...+...) 100 mM; (_x_) 20 mM.

En plántulas de tres días de edad desproviatas de raíz, modelo elegido para continuar con nuestros objetivos, los niveles alcanzados a las 24 h dependen del potencial osmótico de la solución, del agente productor de estrés (PEG o manitol), y de la concentración de carbohidratos en el medio (20, 100 mM o concentraciones variables de sacarosa). De las conclusiones de este objetivo, evaluar la respuesta bajo diferentes potenciales osmóticos y concentraciones de carbohidratos, se prueba que efectivamente el potencial osmótico y el aporte carbonado tienen influencia sobre la acumulación de betacianinas como se enuncia en la hipótesis de este trabajo.

Los experimentos realizados para conocer la cinética de acumulación de betacianinas prueban que esta fue paulatina, independientemente del nivel al que se llegue, y que la relación en que dio en el tiempo fue debida a la regulación en la biosíntesis ya que la actividad enzimática decolorante no cambia significativamente en el tiempo durante el periodo estudiado.

El comportamiento observado en ambos modelos apoya la hipótesis planteada.

CONCLUSIONES

1.- En explantes se presentó una acumulación de betacianinas por estrés de déficit de agua, la cual se vió favorecida por la luz.

2.- En plántulas de tres días de edad, con un estímulo luminoso de 5 horas, también se presentó mayor acumulación de betacianinas en condiciones de sequía (potenciales osmóticos bajos).

En presencia de sacarosa, la cual proporciona fotosintatos al sistema, las plántulas sin raíz acumularon más betacianinas bajo un potencial osmótico de -0.449 MPa (en condiciones de déficit de agua).

En condiciones similares de potencial osmótico producido por manitol o PEG juntamente con sacarosa, no se dió el mismo aumento que con sacarosa sola de lo que se infiere que sacarosa presentó un efecto especial.

3.- Con otros azúcares: glucosa y fructosa tampoco causaron la misma respuesta de acumulación de betacianinas que sacarosa sola, aunque sí la misma tendencia en el cambio de peso fresco y seco.

4.- La acumulación de betacianinas se dió gradualmente con respecto al tiempo de estrés.

Bajo las condiciones estudiadas, no hubo cambios en actividad de la enzima decolorasa, lo que sugiere que es la ruta de biosíntesis la que regularía la acumulación de betacianinas.

5.- Por los resultados de estos experimentos se encontró un modelo en el que se puede estudiar como influyen la luz, la fuente de fotosintatos y el potencial osmótico en la acumulación de amarantina.

6.- Los resultados de los experimentos apoyan la hipótesis planteada.

BIBLIOGRAFIA

- ALEJANDRE, I.G. y GOMEZ, L.F. 1986 Cultivo del amaranto en Mexico. editado por Universidad Autonoma de Chapingo.
- ATRIGE T.H. 1990. Light and plant responses. Ed. Eduard Arnorld N.Y.
- BAKER 1984 Water relations en Advanced Plant Physiology. Ed. Plenum Press
- BERLI, J., SIEG.S., STRACK.D., BOKERN.M., y HARMS.H. 1986 Production of betalains by suspension cultures of *Chenopodium rubrum*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 5: 163-174.
- BEN ZIONI, A., ITAI, C. y VAADIA, Y. 1972. Water and salt stress. kinetin and protein synthesis in tobacco leaves. Plant Physiol. 42: 361-365.
- BIDDINGTON, N.L. Y THOMAS, T.H. 1973. A modified *Amaranthus* betacyanin bioassay for the rapid determination of cytokinins in plant extracts. Planta 111: 183-186.
- BILYK, A. 1979. Extractive fractionation of betalaines. J. Food Sci. 41:1249-1251.
- BLEISS W y EHWALD R. 1987. Relation between growth and osmoregulation in wheat coleoptiles. Biochem. Physiol. Pflanzen. 182: 143-151.
- CANNY, M.J. 1984 Translocation of nutrients and hormones . En Advanced plant physiology. Eds: pp 277-297.
- COOK, M.G. y EVANS, L.T. 1983 The roles of sink, size and location in the partitioning of assimilates in wheat ears. Aust. J. Plant Physiol. 10: 313-327.
- DEL RIO PORTILLA, M. A. 1988. El contenido relativo de agua: Caracteristicas en *Amaranthus hypochondriacus* L. Tesis de licenciatura. ENEP Zaragoza, México.
- DISCOMO F y TOWERS G.H.H. 1984. Stress and plant secondary metabolism in cultured plant cells. En: Phytochemical adaptations to stress. Timmerman, B.N., Steelink, C. y Loewus, F.A. Eds. Vol. 18 de Recent advances in phytochemistry. Plenum Press. pp 97-196.
- ELLIOT, D.C. Y MURRAY, A. 1975. Evidence against an involvement of cyclic nucleotides in the induction of betacyanin synthesis by cytoquinins. Biochem. J. 146: 333-337.

ELLIOT, D.C. 1979a. Analysis of variability in amaranthus bioassay for cytokinins. Effects of water stress on benzyladenine and fusicocin-dependent responses. Plant Physiol. 63: 269-273.

-----, 1979b. Ionic regulation for cytokinin-dependent betacyanin synthesis in *Amaranthus* seedlings. Plant Physiol. 63: 264-268.

-----, 1982. Inhibition of cytokinin action and heat-aging induced potential for cytokinin action by inhibitors of mem

-----, 1983a. Inhibition of cytokinin-regulated responses by calmodulin-binding compounds. Plant Physiol. 72: 215-218.

-----, SCHUTZ, G.C., CASSAR, R.A. 1983b. Betacyanin decolorizing enzyme in *Amaranthus tricolor* seedlings. Phytochem. 22: 383-387.

GERSHENZON, J. 1984. Changes in the leaves of plant secondary metabolite production under water and nutrient stress. En phytochemical adaptations to stress. Timmermann, B. N., Steelink, C. y Loewus, F. A. Eds. Vol. 18 de Recent advances in phytochemistry. Plenum Press. pp 273-302.

GIROD, P.A. y ZRYD P. 1983. Clonal variability and light induction of betalain synthesis in red beet cell cultures. Plant Cell Rep. 6: 27-30.

GIUDICI DE NICOLA, M., PIATELLI, M., CASTROGIOVANNI, V. y MOLINA, C. 1972a. The effect of short-term irradiation on kinetin-induced amaranthin synthesis in *Amaranthus tricolor* seedlings. Phytochem. 11: 1005-1010.

-----, -----, ----- y AMICO V. 1972b. The effects of light and kinetin on amaranthin synthesis in relation to phytochrome. Phytochem. 11: 1011-1017.

-----, -----, y AMICO, V. 1973a. Photocontrol of betaxanthin synthesis in *Celostia Plumosa* seedlings. Phytochem. 12: 353-357.

-----, -----, 1973b. Effect of continuous far red on betaxanthin and betacyanin synthesis. Phytochem. 12: 2163-2166.

-----, AMICO, V. y PIATELLI, M. 1974. Effect of white and far red light on betalain formation. Phytochem. 13: 439-442.

Ho, L.C. 1988. Metabolism and imported sugars in sink organs in relation to sink strength. Ann Rev. Plant. Physiol. 39: 355-78.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- HUBAC, C., GUERRIER, D. y BOUSQUET, U. 1986. Effect of far red on malate and potassium contents in cotton leaves: Relation to drought resistance. *Physiol. Plant.* 66: 37-40.
- HUANG, A.S. y VONELBE, J.H. 1986. Stability comparison of two betacyanine pigments: amaranthine and betanine. *J. Food Sci.* 51: 670-674.
- y -----, 1987. Effect of pH on the degradation and regeneration of betaine. *J. Food Sci.* 52: 1689-1693.
- ITAI, C. Y VAADIA, Y. 1965. Kinetin-like activity in root exudate of water stressed sunflower plants. *Physiol. Plant.* 18: 941-944
- Y----- 1971. Cytokinin activity in water stressed shoots. *Plant Physiol.* 47: 87-90.
- JOLY, R.J. y ZAERR, J.B. 1987. Alteration of Cell-Wall content and elasticity in Douglass-Fir during periods of water deficit. *Plant Physiol.* 83: 418-422.
- JONES, M.M., TURNER, N.C. y OSMOND, C.B. 1981. Mechanisms of drought resistance. En *The physiology and biochemistry of drought resistance in plants*. Paleg, L.G. y Aspinall D. Eds. Academic Press. pp 15-37.
- KAUFMANN, M. R. 1981. water relations during drought. En *The physiology and biochemistry of drought resistance in plants*. L. g. Paleg y D. Aspinall. Academic Press Ed. pp 348-386.
- KOHLER, K.H. 1972. Action of inhibitors of protein and nucleic acid synthesis on light-dependent and kinetin-stimulated betacyanin synthesis. *Phytochem.* 11: 127-131.
- KOSTER, K.L. y LEOPOLD, C.A. 1988. Sugars and desiccation tolerance in seeds. *Plant Physiol.* 88: 829-832.
- KULAKOW, P.A. 1987. Genetics of grain amaranthus-II. The inheritance of determinance, panicle, orientation dwarfism and embrion colorin *Amaranthus caudatus*. *J. Hered.* 78: 293-297.
- LUCAS, W.J. y MADORE, M.A. 1988. Recent advances in sugar transport. En *The biochemistry of the plants*. Jack Preiss Ed. Academic Press Inc. pp 35-84.
- MARRY, T.J. 1980. Betalains. *Encyclopedia of plant physiology. secondary plants products* 8 pp

- MERIN, U., GADEL, S., POPEL, G., BERNSTEIN, S., y ROSENTHAL, I. 1987. Thermal degradation kinetics of prickly-pear fruit red pigment. *J. Food Sci.* 52: 485-486.
- MILBORROW B.V. 1981 Acid abscisic and others hormones. En *The physiology and biochemistry of drought resistance in plants*. L. G. Paley y D. Aspinall, Academic Press Ed. pp 348-386.
- MORGAN, J.M. 1984. Osmoregulation and water stress in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35: 299-319.
- OBRENOVIC, S. 1986. Effects of calcium-magnesium chelators, SKF 525A and rotenone on phytochrome-mediated betacyanin formation in *Amaranthus* seedlings. *Physiol. Plant.* 67: 626-629.
- OKAZAKI, Y., SAKANO, K., TAZAWA, M. 1987. Turgor regulation in a brackish water charophyte, *Lamprothamnium succinctum*. III. Changes in cytoplasmatic free aminoacids and sucrose contents during turgor regulation. *Plant Cell Physiol.* 28: 663-669.
- OZUNA, G.J.A. 1987 Analisis de carbohidratos de la planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) bajo riego sequia. Tesis maestría en ciencias. Centro de Botanica Colegio de Postgraduados.
- PASCH, J.H. y VONELBE, J.H. 1979. Betaine estability in buffered solutions containing organic acids, metal cations, antioxidants or sequestrants. *J. Food Sci.* 44: 72-81.
- PETERSON, G.L. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry* 83: 346-356.
- PIATELLI, M. y MINALE, L. 1964a. Pigments of centrospermae-I Betacyanins from *Phyllocactus hybridus* hort and *Opuntia ficus-indica* mill. *Phytochem.* 3: 307-311.
- , 1964b. Pigments of centrospermae-II. distribution of betacyanins. *Phytochem.* 3: 547-557.
- , GIUDICI DE NICOLA, M. y CASTROGIOVANNI, V. 1969. Photocontrol of amaranthin synthesis in *Amaranthus tricolor*. *Phytochem.* 8: 731-736.
- , 1981 The Betalains: Structure, Biosynthesis, and chemical taxonomy. En *The biochemistry of plants*. A comprehensive treatise. P.K. Stumpf and E.E. Conn Ed. Academic Press N.Y. pp 557-572.
- PIER P.A. y BERKOWITZ, G.A. 1987 Modulation of water stress effects on fotosynthesis by altered leaf K^{+} . *Plant Physiol.* 85: 655-661.

Slavick 1974. Methods of studying plant water relations. Ecological studies 9. Publishing House of the Czechoslovak. Academic of Sciences. Praga.

SOUTHGATE 1976. Determination of food carbohydrates. Applied Science publishers. L.T.D. Ed.

SPEARS, R. 1988. Developments in food colourings: The natural alternatives. *Lib. Tech.* 6: 283-288.

TIMMERMANN, B. N., STEELINK, C., LOEWUS, F. A. 1984. Phytochemical adaptations to stress Plenum Press N.Y.

TURNER, N.C. 1981. Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status. *Plant and Soil* 58: 339-366.

TURNER, N.C. 1986. Adaptation to water deficits: A changing perspective. *Aus. J. Plant Physiol.* 13: 175-190.

VELAZQUEZ, M.I. 1990. Cambio en la concentración de betacianinas bajo estrés hídrico y salino en *Amaranthus* sp. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias U.N.A.M.

VONELBE, J.H., HUI SY., MAINO, I. y GABELMAN, W.H. 1972. Quantitative analysis of betacyanins in red table beets (*Beta vulgaris*). *J. Food Sci.* 37: 932-934.

-----, KLEMENT, J.T., AMUNDSON, C.H., CASSENS, R.G. y LINDSAY, R.C. 1974. Evaluation of betacyanin pigments as sausage colorants. *J. Food Sci.* 39: 128-132.

-----, SCHWARTZ, S.J. y HILDENBRAND, E.E. 1981. Loss and regeneration of betacyanin pigments during processing of red beets. *J. Food Sci.* 46: 1713-1715.

WELLER, T.A. y LASURE, L.L. 1981. Betalains in beet root tissue culture. *J. Food Sci.* 47: 162-163.

WYN JONES, R.G. 1984. Phytochemical aspects of osmotic adaptation. En *Phytochemical adaptations to stress*. Plenum Press N. Y.