

139
20.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**AISLAMIENTO DE LINEAS CELULARES
DE Beta vulgaris PRODUCTORAS DE
BETALAINAS**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

ONTIVEROS JIMENEZ AURORA X.

MEXICO, D. F.

1994

**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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS

AISLAMIENTO DE LINEAS CELULARES
DE Beta vulgaris PRODUCTORAS DE
BETALAINAS

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
BIOLOGO
PRESENTA

ONTIVEROS JIMENEZ AURORA X.

MEXICO, D. F. 1994

El presente trabajo de tesis se realizó en el departamento de Biotecnología del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del M. en C. Mario Rodríguez Monroy. Como parte de los proyectos 92372 y 934313 apoyados por la Dirección de Estudios de Posgrado e Investigación del I. P. N.

Este trabajo es como un rompecabezas porque está formado por muchas piezas (Familias Bravo, Jiménez A., Jiménez P., Jiménez R., Portillo, Ontiveros, Rodríguez y Vera), las cuales son igual en importancia porque cada una moldeó una parte de mi vida, el rompecabezas seguirá creciendo, pero todas estas piezas ya son parte de esta proeza.

- Quiero agradecerles a Irma, Marcela, Alma A., Aurelia, Isidro y Francisco por su compañía y amistad las cuales lograron amenizar el mundo Ceprobiano.

- A mis amigos de siempre Lourdes y Jorge.

- Y a todos aquellos que de una u otra forma contribuyeron a la realización de este trabajo.

I N D I C E

| | | Pag. |
|---------|---|------|
| | ABREVIATURAS..... | i |
| | INDICE DE CUADROS Y FIGURAS..... | ii |
| I | RESUMEN..... | 1 |
| II | INTRODUCCION..... | 3 |
| III | ANTECEDENTES..... | 5 |
| III.1 | Metabolitos secundarios y colorantes..... | 5 |
| III.2 | Cultivo de células vegetales para la obtención de metabolitos secundarios..... | 9 |
| III.3 | Betalainas..... | 13 |
| III.4 | Biosíntesis de Betalainas..... | 18 |
| III.4.1 | Formación del ácido betalámico y biosíntesis de Betaxantinas..... | 21 |
| III.4.2 | Biosíntesis de betacianinas..... | 23 |
| III.4.3 | Factores que afectan la biosíntesis de betalainas.... | 26 |
| III.5 | Cultivo de células vegetales para la producción de Betalainas..... | 29 |
| IV | OBJETIVOS | 39 |
| V | MATERIALES Y METODOS | 41 |
| V.1 | Materiales | 41 |
| V.1.1 | Material biológico..... | 41 |
| V.1.2 | Medios de cultivo..... | 41 |
| V.1.3 | Condiciones de incubación de los cultivos | 42 |
| V.2 | Metodología | 42 |
| V.2.1 | Acondicionamiento y desinfestación de | |

| | Pag |
|---|-----|
| las semillas | 42 |
| V.2.2 Germinación y obtención de plántulas..... | 44 |
| V.2.3 Inducción de callo..... | 45 |
| V.3 Cinética de crecimiento y producción de betalaínas de callo..... | 45 |
| V.4 Extracción y cuantificación de pigmentos | 46 |
| V.5 Selección de líneas celulares. | 46 |
| V.6 Establecimiento de los cultivos madre en suspensión..... | 48 |
| V.7 Cinéticas de crecimiento de los cultivos en suspensión..... | 48 |
| V.8 Cromatografía en capa fina de los pigmentos | 51 |
| V.8.1 Cromatografía en capa fina en capas de celulosa | 51 |
| V.8.2 Cromatografía en capa fina en placas de silica gel .. | 52 |
| VI RESULTADOS Y DISCUSION..... | 53 |
| VI.I Establecimiento de los cultivos <i>in vitro</i> | 53 |
| VI.2 Cinética de crecimiento y producción de betalaínas de callos de <i>B. vulgaris</i> | 54 |
| VI.3 Selección de líneas celulares..... | 56 |
| VI.3.1 Establecimiento de las líneas celulares..... | 56 |
| VI.3.2 Estabilidad de los fenotipos..... | 58 |
| VI.3.3 Composición del pigmento de las líneas celulares seleccionadas..... | 65 |
| VI.4 Cinéticas de crecimiento, consumo de nutrientes y producción de betalaínas en los cultivos en suspensión de <i>B. vulgaris</i> | 69 |

| | | |
|--------|---|----|
| VI.4.1 | Cinética de crecimiento, consumo de nutrientes y producción de Betalaínas de células anaranjadas de <i>B. vulgaris</i> con 0.1 mg/l de cinetina | 69 |
| VI.4.2 | Cinética de crecimiento, consumo de nutrientes y producción de Betalaínas de células anaranjadas de <i>B. vulgaris</i> con 0.01 mg/l de cinetina..... | 72 |
| VI.4.3 | Cinética de crecimiento, consumo de nutrientes y producción de Betalaínas de células rojas de <i>B. vulgaris</i> con 0.1 mg/l de cinetina..... | 76 |
| VI.4.4 | Cinética de crecimiento, consumo de nutrientes y producción de Betalaínas de células rojas de <i>B. vulgaris</i> con 0.01 mg/l de cinetina..... | 79 |
| VII | Caracterización de los pigmentos por cromatografía en capa fina..... | 83 |
| VII.1 | Cromatografía en capa fina en placas de celulosa..... | 83 |
| VII.2 | Cromatografía en capa fina de sílica gel..... | 85 |
| VIII | Conclusiones..... | 88 |
| IX | Bibliografía..... | 90 |

ABREVIATURAS USADAS

| | |
|----------------|--|
| AN | Anaranjado |
| 2,4-D | Acido 2,4 diclorofenoxiacético |
| 6-BAP | 6-Bencilaminopurina |
| B1 | Betalainas |
| Bc | Betacianinas |
| Bx | Betaxantinas |
| B ₅ | Medio de cultivo de Gamborg y col.(1968) |
| C.E.E. | Comunidad de estados europeos |
| Cin | Cinetina |
| DOPA | L-3,4 dihidroxifenilalanina |
| Dopamina | 3,4 dihidroxifeniletilamina |
| F.D.A | Administración de Alimentos y Drogas de E.U.A |
| gPS/l | Gramos de peso seco por litro |
| HCA | Acido hidroxicinámico |
| mgB1 | Miligramos de betalainas |
| MG | Medio de cultivo para la inducción de callos con 0.1 mg de 2,4-D y 0.1 mg de cinetina por litro. |
| MM | Medio de cultivo para mantener los callos con 0.02 mg de 2,4-D y 0.1 mg de cinetina por litro. |
| MS1 | Medio de cultivo en suspensión con 0.1 mg de cinetina y 0.02 mg de 2,4-D por litro. |
| MS2 | Medio de cultivo en suspensión con 0.01 mg de cinetina y 0.02 mg de 2,4-D por litro. |

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

| | Pag. |
|---|------|
| Cuadro 1. Colorantes orgánicos naturales permitidos para uso alimentario en México..... | 8 |
| Figura 1. Estructura general y tipos de betalainas..... | 15 |
| Figura 2. Probable ruta metabólica para la biosíntesis de betalainas..... | 19 |
| Cuadro 2. Cultivos de células vegetales que muestran la formación de betalainas..... | 31 |
| Cuadro 2. Continuación..... | 32 |
| Cuadro 3. Líneas celulares altamente productoras que se han mantenido estables a través del tiempo..... | 34 |
| Figura 3. Metodología general para el aislamiento de líneas celulares de <i>Beta vulgaris</i> | 43 |
| Figura 4. Metodología para la evaluación del crecimiento y la producción de betalainas..... | 47 |
| Figura 5. Cinética de crecimiento y producción de betalainas de callo de <i>Beta vulgaris</i> | 55 |
| Figura 6. Fenotipos de las líneas celulares de <i>Beta vulgaris</i> | 57 |
| Figura 7. Micrografía de células de <i>Beta vulgaris</i> | 57 |
| Figura 8. Primera evaluación de la estabilidad de los fenotipos de <i>B. vulgaris</i> | 60 |

| | |
|--|----|
| Figura 9. Segunda evaluación de la estabilidad de los fenotipos de <i>B. vulgaris</i> | 60 |
| Figura 10. Tercera evaluación de la estabilidad de los fenotipos de <i>B. vulgaris</i> | 62 |
| Figura 11. Cuarta evaluación de la estabilidad de los fenotipos de <i>B. vulgaris</i> | 62 |
| Cuadro 4. Resumen de la estabilidad y frecuencias de los fenotipos de las líneas celulares de <i>Beta vulgaris</i> durante siete meses de cultivo <i>in vitro</i> | 64 |
| Figura 12. Espectro de absorción de los diferentes fenotipos de <i>Beta vulgaris</i> | 66 |
| Figura 13. Producción de betalainas de algunos fenotipos de <i>B. vulgaris</i> | 66 |
| Figura 14. Cinética de células AN de <i>B. vulgaris</i> en suspensión con cinetina 0.1 mg/l y 2,4-D 0.02 mg/l | 70 |
| Figura 15. Cinética de células AN de <i>B. vulgaris</i> en suspensión con cinetina 0.01 mg/l y 2,4-D 0.02 mg/l | 73 |
| Cuadro 5. Parámetros cinéticos de los cultivos en suspensión de fenotipo anaranjado de <i>B. vulgaris</i> | 75 |
| Figura 16. Cinética de células R de <i>B. vulgaris</i> en suspensión con cinetina 0.1 mg/l y 2,4-D 0.02 mg/l | 77 |

| | |
|---|----|
| Figura 17. Cinética de células R de <i>B. vulgaris</i> en suspensión con cinetina 0.01 mg/l y 2,4-D 0.02 mg/l | 80 |
| Cuadro 6. Parámetros cinéticos de los cultivos en suspensión de fenotipo rojo de <i>B. vulgaris</i> | 82 |
| Figura 18. Análisis de betalainas en TLC de celulosa..... | 84 |
| Figura 19. Análisis del pigmento rojo en TLC de silica gel..... | 87 |

I. RESUMEN

Los colorantes naturales vegetales, como las betalainas, son metabolitos secundarios que se tratan de obtener por medio de las técnicas de cultivo de células vegetales y adoptar así las recomendaciones de las distintas organizaciones (F.D.A., C.E.E., F.A.O., etc), que regulan el uso de tales compuestos en alimentos y medicamentos, y que han restringido el empleo de varios colorantes sintéticos como los rojos no. 1, 2,4,2G y 3.

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos de la selección de líneas celulares de *Beta vulgaris* de la var. "Crosby's egyptian" productoras de betalainas, bajo condiciones de cultivo *in vitro*.

Para obtener material vegetativo aséptico, se germinaron semillas de *B. vulgaris* usando una doble desinfección. A partir del hipocótilo de las plántulas obtenidas *in vitro* se indujo la formación del tejido calloso en el medio B₅ con 2,4-D 0.1 mg/l y cinetina 0.1 mg/l . Se hizo la caracterización cinética del tejido calloso, la cual indicó un t_d de 8.35 días y una productividad de betalainas de 225.3 mg/gPs/d.

Por medio de una selección visual se establecieron líneas celulares con fenotipos rojo, anaranjado, café, amarillo, verde y blanco.

Los fenotipos más estables después de siete meses de subcultivo fueron el rojo y anaranjado. Ambos fenotipos se

pasaron a cultivos en suspensión y se hicieron crecer con dos diferentes concentraciones de cinetina 0.1 mg/l y 0.01 mg/l. Se observó que en los cultivos con una concentración de cinetina de 0.1 mg/l se favoreció una mayor producción de biomasa sin embargo, la producción de betalaínas fué mayor en 0.01 mg/l de cinetina. También se determinó que la sacarosa y el fosfato podrían ser factores limitantes para el crecimiento y la producción de betalaínas.

Se verificó por métodos espectrofotométricos y de cromatografías en capa fina de celulosa y de silica gel que los pigmentos obtenidos *in vitro* fueron semejantes a los que produce el tubérculo de la misma variedad y a los de una muestra comercial.

II. INTRODUCCION

Considerando la importancia que tiene el desarrollo de la biotecnología en las industrias química, farmacéutica y alimentaria, así como el uso racional y el aprovechar los recursos bióticos vegetales, el objetivo perseguido en los programas de investigación del CEPROBI-IPN es el de obtener diferentes metabolitos primarios y secundarios a partir de diversas especies vegetales, destinados a ser empleados a nivel industrial.

Los metabolitos secundarios son de un alto valor agregado por lo que hay interés en el uso de cultivos de células y órganos vegetales para su producción industrial, además la técnica de cultivo de células vegetales permite obtener una variación celular conocida como variación somaclonal, por la que se ha podido hacer la selección de líneas celulares con las cuales se ha logrado incrementar la productividad de algunos sistemas, por ejemplo: shikonina, diosgenina, nicotina y visnagina (Zenk y Deus, 1982).

Por otra parte, debido a que la Administración de Alimentos y Drogas de los E.U.A. (FDA), prohibió el uso de varios pigmentos rojos artificiales en la industria alimentaria como resultado de sus efectos tóxicos (Duxbury, 1990), el uso de colorantes naturales ha cobrado gran importancia, dentro de éstos se encuentran las betalaínas, las cuales comprenden a las betacianinas que dan una coloración roja y las betaxantinas que dan una

coloración amarilla. Su uso está aprobado desde 1960 por la FDA y en 1972 apareció en la lista de colorantes admitidos por la Comunidad Europea bajo el código E-162.

Las betalaínas se han encontrado hasta ahora sólo en el orden de las Centrospermae al cual pertenece el betabel (*Beta vulgaris*), dentro de las variedades que se cultivan en México, la variedad "Crosby's egyptian" presenta el mayor contenido de betalaínas (Villegas y col., 1983).

III. ANTECEDENTES

III.1 Metabolitos secundarios y colorantes

Los vegetales, sintetizan una gran cantidad de sustancias químicas que se encuentran ampliamente distribuidas, las cuales se consideran moléculas vitales para el metabolismo celular y son clasificadas como metabolitos primarios tales como : azúcares, aminoácidos, vitaminas y ácidos nucleicos; además existe otro grupo de sustancias conocidas como metabolitos secundarios que a diferencia de los anteriores se encuentran en bajas concentraciones y confinadas a ciertas especies de plantas, en órganos específicos ó en algún estadio fisiológico de su desarrollo (Phillipson, 1990).

El papel de los metabolitos secundarios no puede ser elucidado fácilmente, la diversidad de su estructura química y de su actividad biológica sugiere que la búsqueda de una respuesta general podría tomarse como ingenua, sin embargo, se ha planteado que los metabolitos secundarios podrían funcionar como "apagadores" de las rutas metabólicas por medio de varios mecanismos de control beneficiando al organismo, otros metabolitos son biológicamente activos, funcionan como atrayentes de insectos con lo cual se favorece la polinización, son antibacterianos o aún tóxicos para el organismo que los produce (Vedpal, 1982) .

En términos generales, los metabolitos secundarios son importantes, ya que una gran cantidad de ellos tienen propiedades que son de beneficio social y económico para el hombre (Fowler, 1987). Por ejemplo, Jaramillo (1990), menciona que los metabolitos secundarios pueden agruparse en tres grandes categorías de acuerdo a los sectores industriales que los utilizan : los aceites esenciales, los glucósidos y los alcaloides. Los aceites esenciales se emplean como saborizantes, perfumes y disolventes; los glucósidos se usan como tinturas, colorantes para alimentos y la industria farmacéutica y por último los alcaloides que se destinan principalmente a la producción de fármacos .

En particular en la industria alimentaria, el uso de colorantes ayuda a corregir las variaciones o el cambio de color en los alimentos, lo que sucede como consecuencia de su procesamiento o almacenamiento, enfatiza los sabores y ayuda a preservar la identidad de los mismos (Newsome, 1990; Guillet, 1991). Los colorantes usados en la industria generalmente se pueden dividir en colorantes sintéticos y colorantes naturales. Existen varias definiciones de colorante natural, algunas de ellas se mencionan a continuación: la asociación de colorantes naturales de Bosle (Suecia), establece que los colorantes naturales son los que se encuentran naturalmente en los alimentos y los ubica en tres grandes grupos : carotenoides, clorofilas y antocianinas (Anónimo, 1986); Spears (1988), menciona que los colorantes naturales son extractos solubles en agua ó

aceite de materiales orgánicos naturales, excluyendo a los pigmentos de minerales naturales. Sin embargo, en México no se consideran como colorantes orgánicos naturales a los alimentos que imparten color propio, ya sean solos o mezclados con otros alimentos. Algunos de los colorantes naturales que son permitidos en México se enlistan en el cuadro 1 (Secretaría de Salud, 1988).

Los colorantes sintéticos son los obtenidos por medio de síntesis química y se han usado de manera efectiva para reemplazar a los colorantes naturales que se degradan al procesar los alimentos, pero en años recientes su uso se redujo como resultado de sus efectos tóxicos demostrados por los estudios que llevaron a cabo las distintas organizaciones que regulan el uso de colorantes en la industria de los alimentos (Korwek, 1990). Un ejemplo de lo anterior es el caso del colorante sintético conocido como rojo FD & C No 3 que fue restringido el 29 de enero de 1990, ya que después de muchos años de debate, estudios científicos y aprobaciones regulatorias provisionales, la Administración de Alimentos y Drogas de los EUA (FDA) anunció su prohibición formal. Esto fue por que se observó que, administrado directamente en la dieta de ratas en muy altas dosis causa cáncer (Duxbury , 1990).

En adición a lo anterior al analizar los hábitos de compra de los consumidores en las cadenas de supermercados se ve que hay una marcada preferencia para que existan más productos en los que se incorporen ingredientes naturales,

Cuadro 1. Colorantes orgánicos naturales permitidos para uso alimentario en México*.

- Aceite de zanahoria (*Daucus carota* L.)
- Achilote,annato (Extracto de semillas de *Bixa orellana*)
- Azafrán (Estigmas de *Crocus sativus* L.)
- Beta-Apo 8 carotenal
- Betabel deshidratado
- Beta caroteno
- Caramelo y clorofila
- Cochinilla (extracto de *Coccus cacti* L ó carmín)
- Cúrcuma (Polvo y oleorresina del rizoma de *Curcuma longa* L.)
- Extracto de tegumento de uva (Enocianina).
- Harina de semillas de algodón
- Jugos de frutas y de vegetales
- Pimiento y oleorresina de pimiento
- Roboflavina
- Xantofilas (flavoxantina, rubaxantina, zeaxantina y los productos que lo contengan)

*Secretaría de Salud,1988.

ya que se ha observado que para los consumidores la palabra "natural" se percibe frecuentemente como sinónimo de "saludable", "no dañino" ó "seguro".

En consecuencia, debido a la necesidad de reemplazar a los colorantes sintéticos, el uso de colorantes naturales ha cobrado un considerable interés en años recientes. Spears (1988), afirma que el mercado mundial de colorantes para alimentos aumenta con una velocidad cercana al 100% anualmente. Lo anterior se detectó al analizar el número y la distribución de patentes que se registraron sobre colorantes en los años recientes : de 427 solicitudes en los últimos 15 años, más de 350 se relacionaron con fuentes de colorantes naturales, registrando en Japón el mayor número de patentes .

III.2 Cultivo de células vegetales para la obtención de metabolitos secundarios.

Existen dos maneras tradicionales para obtener los metabolitos secundarios de plantas, : a través de la extracción de material vegetal proveniente de plantas crecidas en campo y a través de la síntesis químico-orgánica.

Además, en años recientes los avances logrados en las técnicas de cultivos de células vegetales en gran escala permiten considerarlas como una tercera fuente posible de obtención (Fowler, 1987; Stafford,1990).

Muchos de los metabolitos secundarios son de un alto valor agregado porque son sustancias que se encuentran restringidas a ciertas especies y en concentraciones muy bajas y por lo tanto hay un interés considerable en encontrar formas alternativas de producción. En este contexto existe una fuerte motivación para usar el cultivo de células y órganos vegetales para la producción industrial de tales compuestos (Rhodes y col., 1987).

Al hacer una pequeña reseña del cultivo de células *in vitro* se pueden mencionar los trabajos pioneros de Haberlandt (citado por Stafford, 1986), quien fue capaz de demostrar la sobrevivencia de células aisladas de diferentes especies de plantas al mantenerlas en medios de cultivo de composición simple. En trabajos posteriores se extendió esta capacidad al mantener el crecimiento de las células y en los años 50's el interés por los cultivos de células vegetales como fuente de productos naturales era muy marcado (Stafford y col., 1986).

En 1983, la compañía japonesa Petrochemical Mitsui, logró desarrollar un proceso comercial para la producción *in vitro* de la shikonina, que es una naftaquinona que se usa como pigmento y agente bactericida. Con lo cual se logró un aumento en la productividad de 870 veces, comparado con el sistema tradicional. Este resultado estimuló la búsqueda de nuevos metabolitos que pudieran obtenerse por medio de esta técnica.

La técnica de cultivo de células vegetales puede contribuir de varias formas a la producción de metabolitos secundarios:

a) Como una nueva forma de síntesis para productos establecidos, por ejemplo: la quinina, codeína y los piretroides; b) como ruta de síntesis para la obtención de un producto nuevo en las plantas que son difíciles de crecer o establecer, como ejemplo: la tebaína de *Papaver bracteatum*; c) como fuente de sustancias químicas nuevas, ejemplo: la rutaculina de los cultivos de *Ruta sp* y d) como sistemas de biotransformación por sí solos o como parte de un proceso químico, ejemplo: síntesis de digoxina (Fowler, 1983).

Entre las ventajas que hacen atractivo al cultivo de células sobre los procedimientos tradicionales de obtención de metabolitos secundarios a partir de cultivos en campo cabe destacar lo siguiente: a) se logra una independencia de varios factores ambientales, incluyendo al clima, plagas y variaciones estacionales y b) se pueden establecer sistemas de producción definidos de mayor calidad con una reducción en el uso de área de suelo y fertilizantes (Fowler, 1983; Topete y col., 1991).

Algunas desventajas de esta técnica son : a) existe una gran variabilidad genética, lo que genera diversidad en la producción, b) poco control de la diferenciación y c) una alta agregación celular lo que provoca una reducción del crecimiento. Algo que cabe destacar es que se sabe poco de

las bases bioquímicas y de la ruta biosintética de la mayoría de los metabolitos secundarios, sin embargo, a pesar de todo lo anterior las técnicas se siguen usando y modificando con el propósito de generar sistemas estables y productivos (Jaramillo, 1990; Topete y col., 1991).

A pesar de los grandes avances que se han logrado en el cultivo de células y tejidos, el costo de producción aún es muy alto, por lo que es importante que el metabolito secundario elegido sea de un alto valor agregado en el mercado.

Una manera de disminuir los costos de producción es incrementando la productividad, lo que significa que grandes cantidades del metabolito deben ser generadas en el menor tiempo posible (Misawa, 1985).

La productividad de un cultivo de células se define en términos de la cantidad de metabolito secundario acumulado por litro por día, por lo que para mejorar el proceso, es importante conocer la relación crecimiento/producto para cada tipo de cultivo (Stafford y col., 1986).

Entre las estrategias que se han propuesto y usado para elevar los rendimientos de producción se encuentran las siguientes: 1) manipulación del medio de cultivo ya sea en los reguladores de crecimiento, en los macronutrientes, en los micronutrientes o en la adición de precursores; 2) manipulación de las condiciones ambientales: luz, temperatura, aereación, etc.; 3) inmovilización celular, 4) inducción de mutantes o por el desarrollo de métodos de

selección para aislar líneas celulares de alta productividad.

III.3 Betalaínas

Los pigmentos de *Beta vulgaris* (betabel) se encuentran agrupados bajo el nombre de betalaínas, las cuales sólo se han encontrado hasta ahora en el orden de las Centrospermae, en 9 de las 11 familias que lo forman, sólo en Caryophyllaceae y en Molluginaceae se observa la ausencia de betalaínas y la producción de antocianinas (Jensen y col., 1989; Mabry y col., 1963). Las betalaínas son solubles en agua y comprenden dos grupos mayoritarios: las betacianinas y las betaxantinas, ambos pigmentos son iguales en una parte de su molécula que deriva del ácido betalámico y difieren una de otra en los residuos que se unen a la molécula.

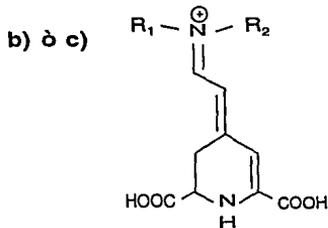
En el caso de las betacianinas se trata de residuos de ciclo dopa en plantas superiores ó de ácido estizolóbico ciclizado en *Amanita muscaria*. La betanina es el pigmento mayoritario de las betacianinas, contribuyendo en un 75 a 95 % a la coloración roja, los otros pigmentos de interés dentro de este grupo son la prebetanina, isobetanina e isoprebetanina (Figura 1).

En el caso de las betaxantinas se unen residuos de aminoácidos ó aminas. El pigmento amarillo mayoritario de las betaxantinas es la vulgaxantina I, la cual contribuye aproximadamente en un 95 % al color amarillo, el otro

pigmento importante en este grupo es la vulgaxantina III (Saguy y col., 1978; Bómh y Rink, 1988; Cerezal, 1991), como puede observarse en la Figura 1.

Debido a que la F.D.A. prohibió el uso de varios pigmentos rojos artificiales (rojo no 1, 2, 4, 2G, eosina, no 3 y rojo de bengala), y que el uso de nitratos y nitritos que dan una coloración roja ha sido cuestionado debido a la evidencia de que estos compuestos producen nitrosaminas carcinogénicas en el estómago (Von Elbe y col, 1974 ; Weller y Lasure, 1981), el pigmento de betabel se ha hecho importante para la industria de alimentos. El uso de este pigmento está aprobado desde 1960 por el Color Additive Amendment to the Food, Drug and Cosmetic Act y desde 1972 apareció en la lista de colorantes admitidos por la Comunidad Europea bajo el código E-162. (Noonan, 1972).

De manera tradicional las betalainas disponibles en el mercado son extraídas de tubérculos de betabel crecidos en campo, sin embargo Sapers y Hornstein (1979), mencionan que existe una gran variabilidad en el contenido de pigmento no sólo entre las variedades cultivadas, sino también dentro de un mismo cultivar, variaciones que en ocasiones son del 100 %, y que las diferencias de pigmento entre las raíces son el reflejo de los factores fisiológicos que controlan su biosíntesis y su degradación, por ejemplo; Hamill y col. (1986), reportan que en el tubérculo de la variedad



BETALAINAS

BETACIANINAS

b) R_1-N-R_2 : Residuos de ciclo-dopa ò àcido estizolobico ciclizado.

- Betanina 75 a 95%
- Betanidina
- Prebetanina
- Isobetanina
- Isobetanidina
- Isoprebetanina
- Celocianina II
- Amarantina

BETAXANTINAS

c) R_1-N-R_2 : residuos de aminoàcidos ò aminas.

- Vulgaxantina I
- Vulgaxantina II
- Portulacaxantina II
- Portulacaxantina III

Figura 1. Estructura general y tipos de betalainas.

"Boltardy" hay 43 mg de pigmento por gramo de peso seco, mientras que Taya y col. (1992), mencionan que en la variedad "Bikores monogerm" hay 8.4 mg de pigmento por gramo de peso seco.

Aunado al problema anterior, los pigmentos retienen el sabor característico (geosmina) del betabel y una alta concentración de azúcares por lo que generalmente requieren un proceso de fermentación en presencia de levaduras del género *Saccharomyces* que reduce la cantidad de azúcares pero que en algunas ocasiones también reduce los rendimientos de la betalainas (Drdák y col., 1992).

Existen algunos trabajos (von Elbe, 1977; Villegas y col., 1983), en los cuales se ha llegado a la conclusión de que las betalainas pueden incorporarse en productos alimentarios como: a) alimentos secos, tales como sopas secas (especialmente sopa de tomate), mezclas de especias, aderezos para ensaladas y proteínas de soya. b) alimentos enlatados como: jitomate, salsa (catsup) de tomate, salsa para pizzas; frutas enlatadas como: cerezas, fresas y algunos vegetales. c) alimentos en escabeche como: rábanos picantes y otras especies en escabeche. d) productos cárnicos como: salchichas, hamburguesas, bologna, etc. e) productos lácteos como: helados, yogurt, cremas para sandwiches, chocolates con crema y relleno de frutas, f) postres y dulces como: jaleas y mermeladas de frutas, pasteles, etc. y g) gelatina y polvos para hacer refrescos instantáneos.

Cerezal (1991), probó el licor concentrado y el polvo de betabel en productos alimenticios regionales cubanos como: jamón cocido, embutido de pasta fina (salchicha), embutido curado (jamonada), leche de soya saborizada con fresa, yogurt saborizado con fresa, en caramelos duros, caramelos comprimidos, mermelada para rellenos, merengues, crema de mantequilla, batidos de grasa y espuma (paneletas), centros de altea y centros de bombón ruiseñor.

El uso de las betalaínas en algunos productos de la industria de alimentos se ve limitado en algunos casos por su estabilidad, la cual depende de algunos factores tales como la temperatura, el pH y la luz. Von Elbe y col., (1974), reportan que el color de la betanina en los sistemas modelo que ellos trabajan es mas estable en un intervalo de pH entre 4-6 y que la termoestabilidad depende del pH la cual es mayor entre pH 4-5, esto indica que bajo condiciones óptimas ó adecuadas los pigmentos de betalaínas pueden ser aplicados como colorantes en los alimentos.

El deterioro de la betacianina en los frutos también depende de factores como pH y de la exposición a la luz, además se ha reportado la existencia de una enzima que decolora a las betacianinas, que se encuentra en los tejidos del betabel (Lashley y Wiley, 1979). Lo anterior es importante ya que durante la extracción, el almacenamiento y el procesamiento de los alimentos con jugo de betabel, la enzima puede decolorar los pigmentos de betalaínas si no se inactiva durante el proceso de extracción. Huang y Von Elbe

(1985), demostraron que el deterioro de betacianina en solución da como resultado la formación de ciclodopa 5-O glucósido (CDG) y ácido betalámico (BA), la reacción que se lleva a cabo es parcialmente reversible y depende de la concentración inicial de betanina y de la temperatura.

III.4 Biosíntesis de betalaínas.

La técnica de cultivo de células vegetales para la producción de metabolitos secundarios ha avanzado de manera empírica, pues muchos de los avances en sus estudios se han realizado por ensayo y error, lo cual se debe al desconocimiento de las rutas bioquímicas y de sus mecanismos de regulación. Por lo anterior en esta revisión se hace un análisis de algunos de los adelantos en el conocimiento de la ruta metabólica de las betalaínas en los años recientes. El esquema de la figura 2 muestra la secuencia de intermediarios metabólicos más probable de la ruta biosintética de las betalaínas .

Uno de los primeros reportes que se encuentran en la literatura, en que se dilucidó la estructura de las betalaínas es el de Wyller y col. (1963), quienes propusieron que la molécula de betanidina podía separarse en dos subunidades de fórmula mínima C_9N y que dichas moléculas podían ser el ácido betalámico y ciclo-dopa, además de que tal vez ambas podían derivar de un mismo precursor la L-3,4 dihidroxifenilalanina (DOPA). Más tarde

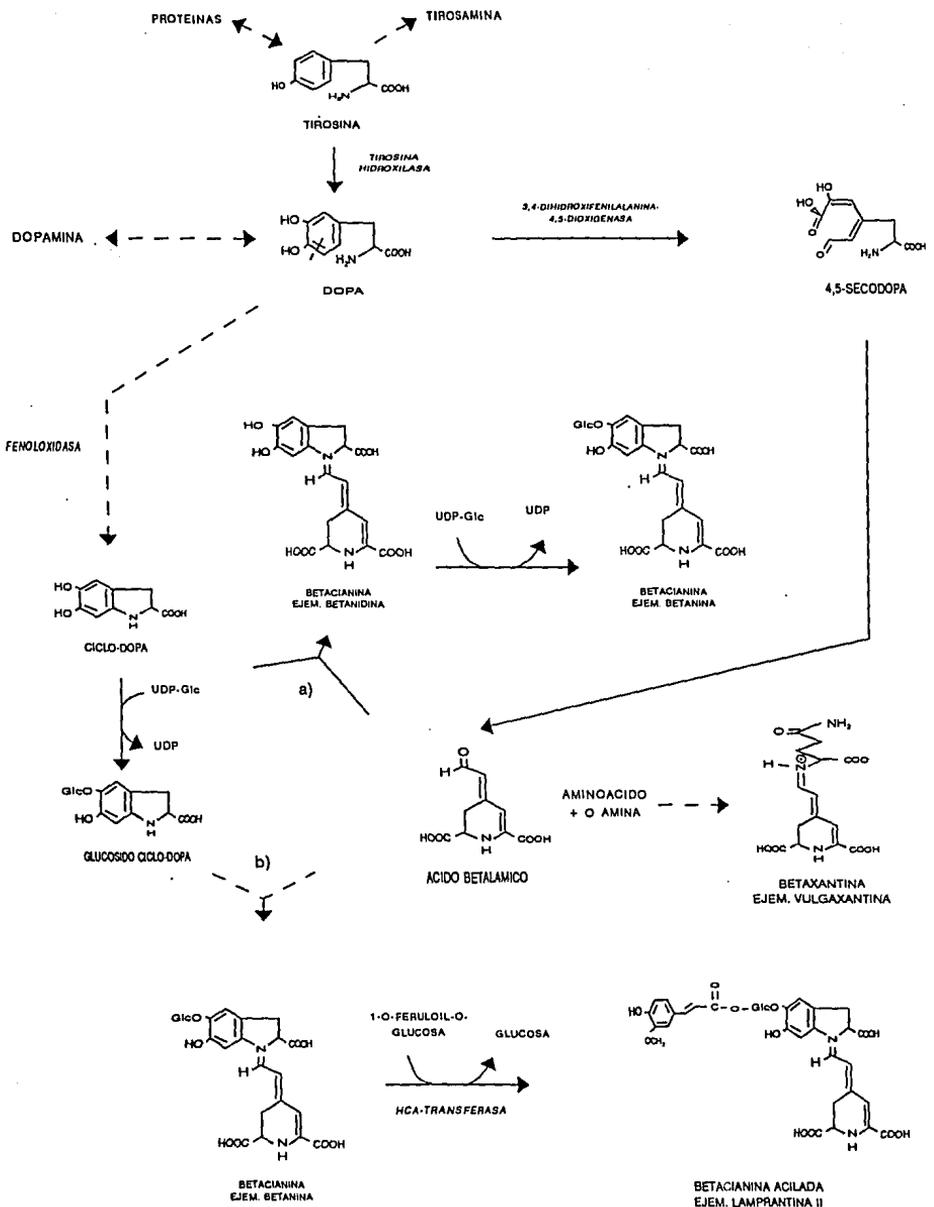


Figura 2 Probable ruta metabólica para la biosíntesis de betalainas.

Miller y col. (1968), con la ayuda de moléculas marcadas radioactivamente, corroboraron que la DOPA era la molécula que se incorporaba en la betanina. Estudios posteriores realizados en plántulas de *Beta vulgaris* sometidas a un tratamiento con tirosina marcada radioactivamente permitieron establecer que ésta es el precursor del ácido betalámico y de la ciclo-dopa (Piattelli, 1981). Sin embargo, Zryd y col. (1982), al trabajar con cultivos de callo de *B. vulgaris* adicionados de moléculas de tirosina y DOPA marcadas radioactivamente demostraron que existe una incorporación preferencial, ya que cuando usaron la tirosina ésta se incorporó mayoritariamente en la molécula del ácido betalámico, a diferencia de la DOPA la cual lo hizo en moléculas de glucósido ciclo-dopa, que se unen con el ácido betalámico para formar las betacianinas, por ello propusieron que debe existir una compartimentalización de la ruta biosintética de las betalaínas, sin embargo, no existen reportes hasta la fecha al respecto.

Para que la tirosina se transforme en DOPA, debe hidroxilarse en posición meta, probablemente por medio de la enzima tirosina hidroxilasa. En mamíferos se sabe que la DOPA es un intermediario en la formación de la melanina en los melanocitos así como de la noradrenalina en las células neuronales además se conoce que las enzimas que realizan la hidroxilación de la tirosina son diferentes para los dos tipos celulares (Murray y col.,1988), sin embargo la enzima

de la biosíntesis de betalainas no ha sido aislada ni caracterizada hasta el momento.

III.4.1 Formación del ácido betalámico y biosíntesis de betaxantinas

Los estudios realizados por Piattelli (Piatelli y Minale, 1964a y 1964b, Piattelli, 1976), sobre el aislamiento y caracterización de las betalainas existentes en los diferentes géneros de plantas, lo llevaron a proponer en 1981, un mecanismo para la biosíntesis del ácido betalámico, este requeriría de una enzima del tipo de las metapirocatecasas que actuara entre los carbonos 4 y 5 del anillo aromático de DOPA, provocando una abertura extradiol formando un intermediario que se ciclicaría y daría lugar a la formación del ácido betalámico. Dicha enzima podría tener una actividad análoga a la que se obtiene originalmente en microorganismos.

Al poner a prueba la hipótesis anterior, Terradas y Wyler (1991), estudiaron las alternativas de ruptura del anillo de DOPA, aislaron un sistema enzimático del hongo *Amanita muscaria* que también produce betalainas, y encontraron que se generaban dos productos intermediarios que fueron la 2,3 secodopa y la 4,5 secodopa, compuestos de poca estabilidad que de manera espontánea se ciclicizan y forman muscoflavina y ácido betalámico respectivamente. También hacen notar que la enzima que transforma DOPA a 4,5

secodopa actúa como una metapirocatecasa en sustratos como: alfa metil dopa, dopamina, N acetil dopamina, pirocatecol y 3,4 dihidroxifenilalanina, mientras que la actividad de las metapirocatecasas de origen bacteriano mejor caracterizadas, son exclusivas para catecoles simples. Asimismo, afirman con base a la variedad de las sustancias probadas como sustrato que la presencia de un grupo amino parece ser esencial para tener afinidad por el sustrato.

En un trabajo posterior Girod y Zryd (1991 b), reportaron el aislamiento de la enzima que rompe el anillo aromático de DOPA para dar lugar a la formación del ácido betalámico, por lo que la clasificaron dentro del grupo de las dioxigenasas, la llamaron DOPA 4,5 dioxigenasa y requiere de un ion ferroso como cofactor esencial. La enzima es un oligómero y está compuesta por varias subunidades idénticas de un peso molecular de 22 Kd y puede inhibirse con cianuro, dietilpirocarbonato y varios agentes quelantes que contengan iones de nitrógeno. Los estudios de especificidad de la enzima por sustrato indican que no es específica, puesto que puede actuar también sobre moléculas como el catecol, la dopamina y el ácido hidrocafeínico, con valores de Vmax diferentes para cada uno de los sustratos, que indican que la enzima no es inhibida por algún producto final.

En relación a lo anterior, Girod y Zryd (1991 a), evaluaron la composición del pigmento de callos de diferentes fenotipos, y encontraron una gran acumulación de

dopamina (9-217 mmol/gPs), sin embargo en el fruto de betabel este compuesto no se acumula, además de que la cantidad de dopamina fué de 10 a 100 veces mayor que la DOPA. Esto indica por una parte una alteración en los flujos de la ruta metabólica en los cultivos *in vitro* con una acumulación de un compuesto análogo a la DOPA, la dopamina, que también es un sustrato de la DOPA 4,5 dioxigenasa pero que tiene un valor de Km de prácticamente el doble. Por otra parte se podría pensar que la acumulación de dopamina le permite a la célula seguir produciendo ácido betalámico además de tener un donador del grupo amino para la formación de betaxantinas.

Finalmente, la unión del ácido betalámico con aminoácidos o aminas permite la formación de las betaxantinas, sin embargo no hay estudios sobre los pasos y enzimas de esta parte de la ruta metabólica. A pesar de lo anterior, se siguen encontrando y caracterizando nuevos miembros de las betaxantinas (Rink y Böhm, 1985; Trezzini y Zryd, 1991a y 1991b).

III.4.2 Biosíntesis de betacianinas

Para la formación de las betacianinas es indispensable que la L-DOPA se transforme en ciclo-dopa por acción de una enzima fenol oxidasa, la cual en cultivos *in vitro* de *B. vulgaris* con fenotipo colorido tuvo mayor actividad que en los cultivos sin pigmentación (Böhm y Rink, 1988).

Posteriormente la ciclo-dopa se une con al ácido betalámico y forma la betanidina (betacianina). Sin embargo como algunas betacianinas están glicosiladas se han propuesto dos vías alternas de biosíntesis; en una de ellas se propone la condensación de la ciclo-dopa con el ácido betalámico seguida de la glicosilación sustentada en los trabajos de Heuer y Strack, (1992) quienes reportaron la formación enzimática de betanina a partir de betanidina y UDP-glucosa en preparaciones de proteínas de cultivos en suspensión de *Dorotheanthus bellidiformis*. Lo anterior indica la existencia de una O-glicosiltransferasa dependiente de betanina. Por otro lado otros autores Piattelli (1981); Zryd y col.(1982); Terradas y Wyler (1991); proponen otra vía donde primero se glicosila la ciclo-dopa y después se une el ácido betalámico, pero aún no se sabe nada acerca de las enzimas que llevarían a cabo este proceso. Asimismo, Heuer y Strack (1992), mencionan que la ruta depende de la especie vegetal en que se esté estudiando y que también pudieran estar operando ambos mecanismos, sin embargo no presentan información concreta acerca de esto.

Las betacianinas formadas pueden acilarse posteriormente, especialmente se conjugan con ácidos hidroxicinámicos (HCA) y se encuentran ampliamente difundidas entre los miembros de las Caryophyllales. Estudios en la formación de estructuras análogas han demostrado que las antocianinas que tienen HCA se forman con

tioésteres y tienen un papel central en el metabolismo de los fenilpropanoides de las plantas.

Bokern y Strack (1988), mencionan que hay evidencia de que la biosíntesis de dichos ésteres también se puede llevar a cabo utilizando 1-O-acilglucósidos provenientes de la vía metabólica de los ácidos fenólicos por lo que realizaron un estudio enzimático para observar la formación de betacianinas aciladas con HCA en cultivos de *Chenopodium rubrum*. Dos años más tarde, Bokern y col. (1991), evaluaron el papel metabólico del HCA y trataron de elucidar los mecanismos responsables de la regulación de la acumulación de las betacianinas. Para ello cuantificaron 14 compuestos fenólicos solubles, y encontraron entre ellos: betanina, amarantina y celosianina II, 1-O-(4-coumaroil)- β -glucosa, 1-O-feruloil- β -glucosa y 1-O-feruloil-(β -1-2-glucuronosil)- β -glucosa.

Estudiaron las actividades de tres enzimas que están involucradas en el metabolismo de la hidroxicinamoilglucosa: la glucosil transferasa, la glucuronosil transferasa y la hidroxicinamoil transferasa y proponen que la feruliolglucosa (que es una hidroxicinamoilglucosa) puede incorporarse para la formación de pared celular o ser utilizada como donadora del grupo acil en la formación de betacianinas aciladas.

Con base en lo anterior, Bokern y col. (1992), purificaron y caracterizaron una aciltransferasa, la cual cataliza la transferencia de HCA de la 1-O hidroxicinamoil β

glucosa al grupo hidroxilo del carbono 2 del ácido glucurónico de amarantina (Betanidina 5-O-glucuronosilglucosa). Los productos que se forman son celosianina I (4-coumaroilamarantina) y celosianina II (feruloilamarantina) que son betacianinas aciladas, la enzima puede ser clasificada como una 1-O-hidroxycinamoil-glucosa: amarantina O-hidroxycinamoil transferasa. Se observó que en otros grupos de las Caryophyllales existía el mismo tipo de actividad de la cinamoil transferasa con 1-O-hidroxycinamoil- β -glucosa como donador del grupo acil pero, que tenían diferentes especificidades con respecto a las moléculas aceptoras.

III.4.3 Factores que afectan la biosíntesis de betalainas

Una gran variedad de factores químicos y físicos están implicados en la regulación de la biosíntesis y en la acumulación de betalainas por lo que aquí sólo se consideran los factores más importantes :

a) Reguladores de crecimiento : los experimentos con reguladores de crecimiento en plantas completas son difíciles de interpretar, debido a que afectan a una gran cantidad de procesos de desarrollo de las plantas, sin embargo en los sistemas *in vitro* sus efectos pueden ser más claros. Girod y Zryd (1991a), establecieron líneas celulares obtenidas de *Beta vulgaris* L de la variedad "Bikores monogerm" las cuales, exhibieron los fenotipos siguientes:

blanco, verde, amarillo, anaranjado, rojo y violeta, y concluyeron que un factor importante para obtener y mantener estas líneas celulares fué la composición de los reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, en especial la incorporación de la auxina ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) y de la citocinina 6-Bencilaminopurina (6-BAP), además de que los cambios en la composición de los reguladores de crecimiento en el medio de cultivo se pudieron usar para modular la dirección y la frecuencia de los eventos de interconversión de los fenotipos de las líneas celulares .

b) **Control génico** : Trezzini y Zryd (1990), reportan que el patrón de segregación que obtuvieron de las cruzas entre las clonas productoras y no productoras de *Portulaca grandiflora* estuvo relacionado con un mecanismo de regulación propuesto por ellos, en el que involucran tres genes: C, R e I. En su modelo genético el locus C es un alelo dominante y es responsable de la conversión de la DOPA en ácido betalámico, el locus R es el responsable de la transformación de DOPA en ciclo-dopa glicosilada y el locus I no permite la formación de las betaxantinas porque es un inhibidor de la conjugación de los residuos de aminoácidos con el ácido betalámico.

c) **Luz**: Bóhm y Rink (1988), mencionan que la luz no es un prerrequisito general para la biosíntesis de las betalaínas en las plantas superiores pero que, comparando la acumulación que se lleva a cabo cuando hay o no presencia de luz, se observa un incremento para el primer caso. La luz

estimula la síntesis adicional de betalaínas en especies que las producen en obscuridad y en las que no producen betalaínas en la obscuridad la presencia de luz es indispensable, por ejemplo: las células pigmentadas de *B. vulgaris* y *Portulaca grandiflora* pierden su color cuando se mantienen en obscuridad, de manera inversa los cultivos de callo de *Chenopodium rubrum* acumulan altos niveles de betacianinas en la obscuridad pero, cuando se establecen los cultivos en suspensión y se mantienen en la obscuridad los niveles de betacianinas se reducen de una manera drástica al compararlos con los cultivos control que se encuentran en presencia de luz.

Con respecto al crecimiento celular parece ser que el efecto de la luz también depende de la especie y de la variedad con la que se esté trabajando, en el caso de *B. vulgaris*, Leathers y col., (1992), observaron que el crecimiento de cultivos en suspensión altamente productores de betacianinas se redujo al mantenerlos en la obscuridad, además de que después de pocos subcultivos las células se decoloraron. Mencionan también que al exponer plántulas de *Amaranthus tricolor* y de *Celosia plumosa* a la luz roja ó blanca ocurre un incremento en la producción de betalaínas. Una exposición prolongada a la luz blanca dá como resultado un incremento de clorofilas además de la acumulación de betalaínas. Al administrar ácido levulónico , se observa la inhibición de la síntesis de clorofila y de las betalaínas, lo que indica que el sistema fotosintético tal vez tenga un

papel importante en la regulación de la biosíntesis de betalainas.

Piattelli (1981), hace referencia al hecho de que el efecto de la luz en la síntesis de betalainas podría actuar en dos niveles diferentes, los cuales involucrarían la activación de genes y la disponibilidad de compuestos ricos en energía. El efecto de la luz en el sistema de genes podría estar mediado por fotorreceptores diferentes a los fitocromos mientras que, la disponibilidad de los compuestos ricos en energía podría estar mediada por los fitocromos en las primeras horas de irradiación y de manera sucesiva por el sistema fotosintético.

d) Otros factores : Se ha observado que al incrementarse los niveles de nitrato y amonio en el medio de cultivo no aumentaron los valores de betacianinas en cultivos de *B. vulgaris* pero que, para la obtención y estabilización de líneas celulares la fuente de nitrógeno y la concentración de sacarosa en el medio de cultivo tienen un papel muy importante (Girod y Zyrd, 1991 a).

III.5 Cultivo de células vegetales para la producción de betalainas

A la fecha, se ha establecido el cultivo de células vegetales para la obtención de betalainas *in vitro*, en 5 de las 11 familias de Centrospermae que producen betalainas

usando tejidos jóvenes y maduros de diferentes partes de la planta (cuadro 2).

A pesar de que algunos experimentos se han llevado a cabo únicamente con la transferencia sucesiva del callo primario , otros investigadores han mantenido sus cultivos en medio sólido ó líquido por muchos años por lo que los cultivos de células vegetales han permitido el estudio de la composición y de la cantidad de las betalainas durante sus subcultivos en los que, aparentemente la proporción individual de betaxantinas y betacianinas no cambia substancialmente en el curso del ciclo de crecimiento y, al igual que otros metabolitos secundarios que se obtienen por medio de cultivo de células vegetales, las betalainas alcanzan su máxima concentración en la fase estacionaria del crecimiento celular (Böhm y Rink, 1988). Recientemente Leathers y col., (1992), caracterizaron el crecimiento celular y la producción de betalainas de cultivos en suspensión de células de *Beta vulgaris* provenientes de líneas celulares de callos anaranjados y violetas, sin embargo los rendimientos obtenidos han sido bajos, por ello resulta necesario plantear estrategias que permitan incrementar la productividad del sistema.

Quizás uno de los métodos con el que se ha tenido mejores resultados, es la selección de líneas celulares con una alta productividad y estabilidad. Esta selección se basa en el supuesto de que dentro de una gran población celular

Cuadro 2. Cultivos de células vegetales que muestran la formación de betalaínas.*

| PLANTA | EXPLANTE | TIPO DE CULTIVO | MEDIO DE CULTIVO | PIGMENTO |
|-----------------------------------|----------------------------------|-----------------|------------------|---|
| Amaranthaceae | | | | |
| <i>Amarantus caudatus</i> | ? | Callo | B5 modificado | Betalaínas |
| <i>Amaranthus tricolor</i> | Segmento de hoja | Callo | MS modificado | Betaxantinas y betacianinas |
| <i>Celosia argentea</i> L. | ? | Callo | B5 modificado | Betalaínas |
| Cactaceae | | | | |
| <i>Mytillocactus geometrizans</i> | Segmentos de tallo | Callo | LS | Betanina, illocactina, indicaxantina |
| <i>Opuntia microdasys</i> | Segmento de cladodio | Callo | MS | Betacianinas y betaxantinas |
| Chenopodiaceae | | | | |
| <i>Beta vulgaris</i> L. | Plántula de semilla | Suspensión | B5 modificado | Betanina, betaxantina |
| Var. conditiva Alef | ? | Callo | B5 modificado | Betacianinas, betaxantina |
| Var. conditiva Alef. | Plántula de semilla | Suspensión | MS modificado | Betanina |
| Var. crassa Helm. | ? | Callo | B5 modificado | Betacianinas |
| Var. crassa Helm. | Raíz | Callo | MS modificado | Betacianina, betaxantina |
| Var. rubra D. C non L | ? | ? | Heller, LS | Betacianinas |
| Var. crosby's egyptian | Plántula de semilla | Suspensión | B5 | Betacianinas y betaxantinas |
| <i>Chenopodium album</i> L. | ? | ? | Heller, LS | Betacianinas |
| <i>Chenopodium rubrum</i> L. | Meristemo de plántula de semilla | Suspensión | MS modificado | Amarantina, celosianina, betanina, vulgaxantina |
| <i>Spinacia oleracea</i> L. | ? | ? | Heller, LS | Betacianinas |

* Modificado de Böhm y Rink (1988).

Cuadro 2. Continuación.

| PLANTA | EXPLANTE | TIPO DE CULTIVO | MEDIO DE CULTIVO | PIGMENTO |
|------------------------------------|-------------------------|-----------------|----------------------|---|
| Phytolaccaceae | | | | |
| <i>Phytolacca americana</i> L | Segmentos de tallo | Suspensión | MS modificado | Betacianinas |
| <i>Phytolacca americana</i> L | ? | Suspensión | ? | Betanina |
| Portulaccaceae | | | | |
| <i>Portulacca grandiflora</i> Hook | Segmentos del internodo | Callo | White, MS modificado | Betacianinas |
| <i>Portulacca grandiflora</i> Hook | Plántula de semilla | Callo | MS modificado | Betacianinas |
| <i>Portulacca grandiflora</i> Hook | Hipocotilo | Callo | MS modificado | Betacianinas |
| <i>Portulacca grandiflora</i> Hook | Plántula de semilla | Callo | MS Modificado | Betaxantinas, ácido betalaímico, betacianinas |

se encuentran células que producen de manera diferente el metabolito como resultado de mutaciones o cambios epigenéticos, es posible que éstas puedan ser identificadas, aisladas y cultivadas, generando con ello cultivos altamente productores de metabolitos secundarios. La aplicación de los métodos de selección adecuados para aislar líneas celulares ha permitido obtener clonas de un gran número de especies vegetales, tanto para fines de estudios básicos, como para la generación de líneas estables altamente productoras. Con el propósito de conservar la línea es necesario someterla continuamente a programas de selección y cultivarla bajo condiciones óptimas de preservación, de esta manera se tienen líneas que se han mantenido estables por grandes períodos de tiempo, algunas de las cuales se muestran en la cuadro 3.

A la variación celular obtenida por cultivo de células vegetales se le denomina variación somaclonal y se ha encontrado en todas las especies de plantas que han sido regeneradas por medio de cultivo de tejidos. Los análisis efectuados en diferentes especies para conocer la causa de estas variaciones, permiten establecer cambios a niveles genéticos, citogenéticos y moleculares.

Los análisis revelan que la variación somaclonal puede dar lugar a mutantes que tengan un comportamiento clásico mendeliano, a cambios genéticos que alteran caracteres que estén bajo el control de una familia multigénica afectando a rasgos determinados y finalmente permiten la existencia de

Cuadro 3. Líneas celulares altamente productoras,
que se han mantenido estables a través del
tiempo.*

| ESPECIE | PRODUCTO | ESTABILIDAD |
|-----------------------------------|-------------------|-------------|
| <i>Ammi visnaga</i> | Visnagina | X |
| <i>Dioscorea deltoides</i> | Diosgenina | X |
| <i>Panax ginseng</i> | Ginsengósidos | X |
| <i>Morinda citrifolia</i> | Antraquinonas | 7 años |
| <i>Coleus blumei</i> | Acido rosmarínico | 8 años |
| <i>Lithospermum erythrorhizon</i> | Shikonina | 10 años |
| <i>Ipomoea batatas</i> | Antocianinas | 1 año |
| <i>Nicotiana tabacum</i> | Nicotina | 1 año |

X = estables por más de un año.

*Jaramillo (1990).

aquellos que dan la apariencia de resultar de la activación de transposones. Las variantes poliploides y aneuploides ocurren frecuentemente lo mismo que rearrreglos cromosomales tales como : duplicaciones, deleciones, translocaciones y otros intercambios (Scowcroft y Larkin, 1988).

Es importante aclarar que el término mutante se debe reservar para los fenotipos con una evidencia genética ó bioquímica bien establecida. El término variante es usado para las líneas celulares identificadas por un cambio fenotípico en el cultivo, pero sin una evidencia clara de la causa de esta variación (Jacobs y col., 1987).

Este potencial de variación somaclonal puede ser usado para la separación ó cultivo de plantas con diferentes propiedades ya que : a) los métodos de cultivo de tejidos se pueden desarrollar para especies determinadas, b) el cultivo de tejidos provee de soluciones eficientes (ó únicas) para el mejoramiento de la producción de metabolitos secundarios, y c) las características que van a modificarse se deben expresar en el cultivo de tejidos y deben desarrollarse sistemas de selección efectivos para identificar la variante deseada (Teutonico y Knor, 1984).

Los métodos de selección de líneas celulares con alta producción de metabolitos secundarios pueden influir de manera importante en la naturaleza de las variantes obtenidas . Los tres métodos posibles para la identificación de líneas celulares variantes son :

a) Selección positiva: que permite el aislamiento de líneas resistentes a una presión selectiva, la cual inhibe ó mata a las células silvestres. Dichas células resistentes son las más representativas y están caracterizadas por una tolerancia incrementada a productos tóxicos tales como : aminoácidos, antibióticos, bases análogas a los ácidos nucleicos, herbicidas, metales pesados, toxinas y patógenos, concentraciones de fitohormonas, estrés físico ó químico.

b) Selección negativa : en la que las células en crecimiento son las que mueren, mientras que las que carecen de una función metabólica, sobreviven y sirven para aislar mutantes auxotróficas para aminoácidos, vitaminas, bases de ácidos nucleicos u otros nutrientes. (Estos tipos sólo se han obtenido al manipular los cultivos de protoplastos haploides).

c) Búsqueda no selectiva : queda como alternativa cuando la estrategia de selección no puede ser aplicada a la manipulación *in vitro*. La búsqueda analítica esta basada en la detección visual, métodos de linaje, uso de ensayos radioinmunológicos y patrones electroforéticos, los cuales pueden ser de ayuda para identificar las líneas celulares con características deseadas .

En los casos donde la expresión de la mutación es visible, como la producción de pigmento, la selección de células variantes es un procedimiento simple , pero en los casos en que la producción no está acompañada de un marcador visible los procesos de selección son mas complejos (Jacobs

y col., 1987). Diferentes líneas celulares que acumulan pigmentos han sido seleccionadas a través de los años por medio de la selección visual. Las células que muestran la coloración deseada son aisladas y subcultivadas hasta que se establece una línea celular pura. Por ejemplo, Eichenberg (1951), aisló una línea celular altamente productora de *B*-caroteno, el rendimiento de producción se mantuvo en la línea celular por más de 10 años; de igual manera por las diferencias en el contenido de antocianinas en callos de endospermo de *Zea mays* se lograron aislar líneas celulares con diferentes concentraciones de pigmento. Por medio de la selección visual, también se aislaron líneas celulares estables, que producen betalainas a partir de callos de *Beta vulgaris* que no presentaban pigmentación (Widholm , 1980).

Girod y Zryd (1991 a), aislaron líneas celulares de callos de *B. vulgaris* de la variedad "Bikores monogerm" y gradualmente, con la repetición del subcultivo, se establecieron los fenotipos individuales de los callos. Establecieron cinco fenotipos diferentes : blanco, anaranjado, violeta, verde, amarillo y rojo. Observaron que los fenotipos mostraban una morfología celular característica, pero en general los agruparon en dos: los fenotipos blanco, anaranjado y violeta mostraban células elongadas, los fenotipos verde, amarillo y rojo estaban formados por agrupaciones de células esféricas. También observaron una estricta relación entre el fenotipo y la composición del medio de cultivo, por lo que una vez

establecidos, algunos fenotipos se conservaron en un medio de cultivo diferente al que se usó para su selección. Demostraron además, que las líneas seleccionadas eran estables pero, que periodicamente se observaban interconversiones entre los fenotipos cercanos .

Con estos antecedentes es posible plantear el aprovechamiento de la variación somaclonal como una alternativa muy atractiva para obtener líneas celulares productoras de metabolitos secundarios, ya que a pesar de ser una estrategia semiempírica requiere de menos tiempo que la mutagénesis y los métodos convencionales. Este fenómeno da la posibilidad de reelegir una línea preestablecida con el fin de aumentar su rendimiento, pero sobre todo, para mantener su estabilidad, porque aunque la línea haya sido establecida es posible que sufra cambios genéticos ó epigenéticos que redunden en su producción (Jaramillo, 1990).

IV. OBJETIVOS

En el tubérculo de *B. vulgaris* se encuentra una alta concentración de colorantes (betalaínas), por lo que se considera que el cultivo de esta especie puede ser una alternativa para sustituir a algunos colorantes sintéticos que han sido restringidos o prohibidos recientemente en la industria de alimentos, además estos colorantes pueden ser usados en la industria cosmetológica donde se ha observado que los consumidores tienen una mayor predilección por los cosméticos elaborados con productos naturales, ya que éstos se relacionan con la palabra seguridad.

El uso de la técnica de cultivo de células vegetales ha demostrado grandes ventajas en comparación con los métodos tradicionales de obtención de metabolitos secundarios, por ello representa una buena alternativa para producir betalaínas. Sin embargo, para lograr desarrollar un proceso biotecnológico viable es indispensable contar con un cultivo celular altamente productor y estable.

El aprovechamiento de la variación somaclonal observada en los cultivos de células vegetales *in vitro*, ha permitido obtener cultivos de células variantes cuyas producciones han igualado e inclusive superado las producciones de las plantas *in vivo* (ver cuadro 3).

De esta manera se plantearon dentro de este trabajo los siguientes objetivos:

- a) Establecer una metodología para obtener cultivos *in vitro* a partir de hipocótilo de *Beta vulgaris* de la variedad "Crosby's egyptian".
- b) Evaluar el crecimiento de callo y su producción de betalainas.
- c) Seleccionar líneas celulares de *B. vulgaris* de la variedad "Crosby's egyptian" productoras de betalainas, con base en la expresión fenotípica de pigmentación, y en la estabilidad de cada línea celular .
- d) Evaluar el comportamiento de los fenotipos celulares productores de betalainas de mejor estabilidad en cultivo en suspensión, en relación a su parámetro cinético y de consumo de los principales macronutrientes (carbono, nitrógeno y fosfatos).
- e) Caracterizar parcialmente por espectrofotometría y por cromatografía de capa fina los pigmentos que se producen en tubérculo y en los cultivos *in vitro*.

V. MATERIALES Y METODOS

V.1 Materiales

V.1.1 Material biológico:

Se usaron semillas de *Beta vulgaris* de la variedad "Crosby's egyptian" (Master agricultural Inc.) .

V.1.2 Medios de cultivo :

Todos los medios de cultivo tuvieron como base el medio de Gamborg (B_5), (Sigma plant cell culture). Fueron preparados los siguientes:

- a) Medio de cultivo para la germinación de semillas (MG): Medio de cultivo B_5 suplementado con sacarosa 20 g/l y agar bacteriológico Bioxon 8 g/l.
- b) Medio de cultivo para la inducción de callo (MC): El cual fue el medio de cultivo MG suplementado con Cin 0.1 mg/l y 2,4-D 0.1 mg/l.
- c) Medio de cultivo para mantener los callos (MM) : es igual que el MC pero con 2,4-D 0.02 mg/l.
- d) Medio de cultivo en suspensión (MS1) : es igual que el medio MM pero, sin agar bacteriológico y con sacarosa 10 g/l .
- e) Medio de cultivo en suspensión (MS2) : es igual que el medio MS1 pero, con Cin 0.01 mg/l .

En todos ellos el pH se ajustó a 5.5 con un potenciómetro (Metrohm 605) usando soluciones de HCl 0.1 N ó NaOH 0.1 N según se requiriera.

Todos los medios de cultivo se esterilizaron en un autoclave a 120 °C durante 15 min. Posteriormente todas las operaciones de siembra y subcultivos se manejaron bajo condiciones de asepsia en una campana de flujo laminar.

V.1.3 Condiciones de incubación de los cultivos

Los cultivos en medio semisólido, se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, con ciclos de luz/obscuridad 16/8 horas, con una intensidad luminosa de 3500 lux .

Por otra parte, los cultivos en suspensión se incubaron en una agitadora rotatoria (Lab. Line), a una velocidad de 125 rpm y a una temperatura de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$

V.2 Metodología

El diagrama de flujo de la metodología se observa en la figura 3.

V.2.1 Acondicionamiento y desinfestación de las semillas

Se usó la metodología propuesta por Del Villar (información personal), bajo condiciones de asepsia en la

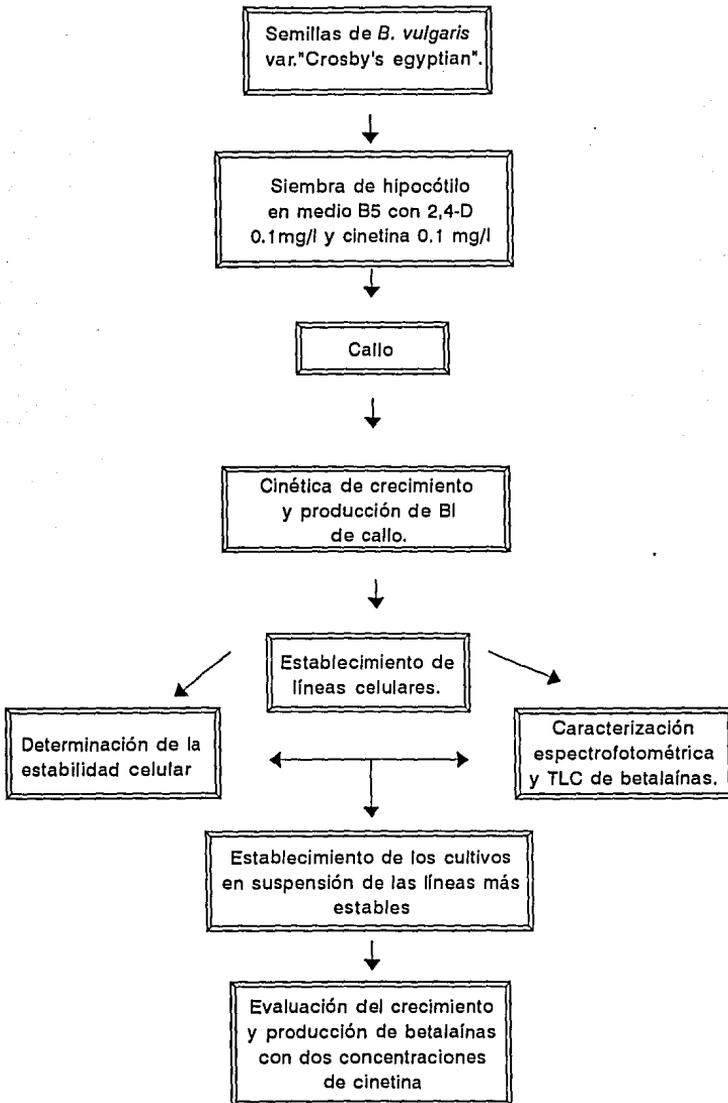


Figura 3. Metodología general para el aislamiento de líneas celulares de *Beta vulgaris*.

campana de flujo laminar, se lavaron las semillas en agua jabonosa utilizando un detergente doméstico durante 20 min , después se colocaron en etanol al 70 % durante 2 min, entre cambio y cambio las semillas se lavaron con agua destilada esterilizada. A continuación se pusieron en hipoclorito de sodio (blanqueador doméstico) al 50 % (v/v) durante 20 min y se dejaron remojando en agua destilada esterilizada durante toda la noche .

Al día siguiente se repitió el tratamiento anterior hasta el hipoclorito de sodio al 50 % (v/v) por 20 min. Después de esta doble desinfección se sembraron las semillas.

V.2.2 Germinación y obtención de plántulas

Las semillas desinfectadas se inocularon en frascos de vidrio tipo "gerber" con 25 ml de medio MG.

También se sembraron semillas en bolsas de plástico negras de 1 kg usando como sustrato tierra negra para obtener tubérculos de betabel cultivados en vivero, los cuales sirvieron como material para cuantificar el rendimiento de betalaínas producidas por esta variedad en el campo, y poder de esta manera compararlo con el rendimiento obtenido *in vitro*.

V.2.3 Inducción de callo

Los hipocótilos de las plántulas germinadas *in vitro* se cortaron en segmentos de aproximadamente 1 cm de longitud, se colocaron de 3 a 4 fragmentos en frascos de vidrio tipo "gerber" con 25 ml de medio MC. Los callos formados se pasaron al medio MM en el cual se mantuvieron todo el tiempo que duró la experimentación, subcultivándose cada 3 ó 4 semanas.

V.3. Cinética de crecimiento de callo

Se sembraron 0.2 gramos de peso fresco en 25 ml de medio MM, a partir de muestras por triplicado, cada 3 días se determinaron los siguientes parámetros: peso fresco, peso seco y producción de betalaínas.

Para la determinación del peso fresco, se colocó el callo en charolas de papel aluminio de peso conocido y se pesaron en una balanza analítica, por diferencia de pesos se obtuvo el valor real del callo. Para la determinación del peso seco las secciones de callo ó de células fueron colocadas en una estufa a 80° C hasta que alcanzaron un peso constante (12 horas).

V.4 Extracción y cuantificación de pigmentos

Se usó la metodología propuesta por Rodríguez y col., 1990, (Figura 4), y que consiste en:

Congelar el material vegetal (-10°C), hacer una extracción acuosa con una relación del volumen 1:3 (v/v), realizar una inactivación enzimática a 80° C durante 2 min en un baño María, filtrar con un papel de poro amplio, centrifugar a 3000 xg durante 15 min, filtrar al vacío y finalmente hacer la lectura espectrofotométrica a 540 y 480 nm.

A partir de una curva de calibración con estándares preparados en el laboratorio (pigmento comercial) por el método de Nilsson (1970), se calculó la cantidad de betalainas producidas, los resultados se expresaron en mg/g de peso seco.

Se concentró el pigmento utilizando un rotavapor (Büchi RE 121), el concentrado se liofilizó (Labconco 18) y el polvo que se obtuvo se colocó en frascos ámbar y se guardó en un desecador para poder ser utilizado posteriormente.

V.5 Selección de líneas celulares

La selección de líneas celulares se hizo a partir de callo. En cada subcultivo, fueron seleccionados de manera visual pequeños fragmentos de pigmentación uniforme, de esta

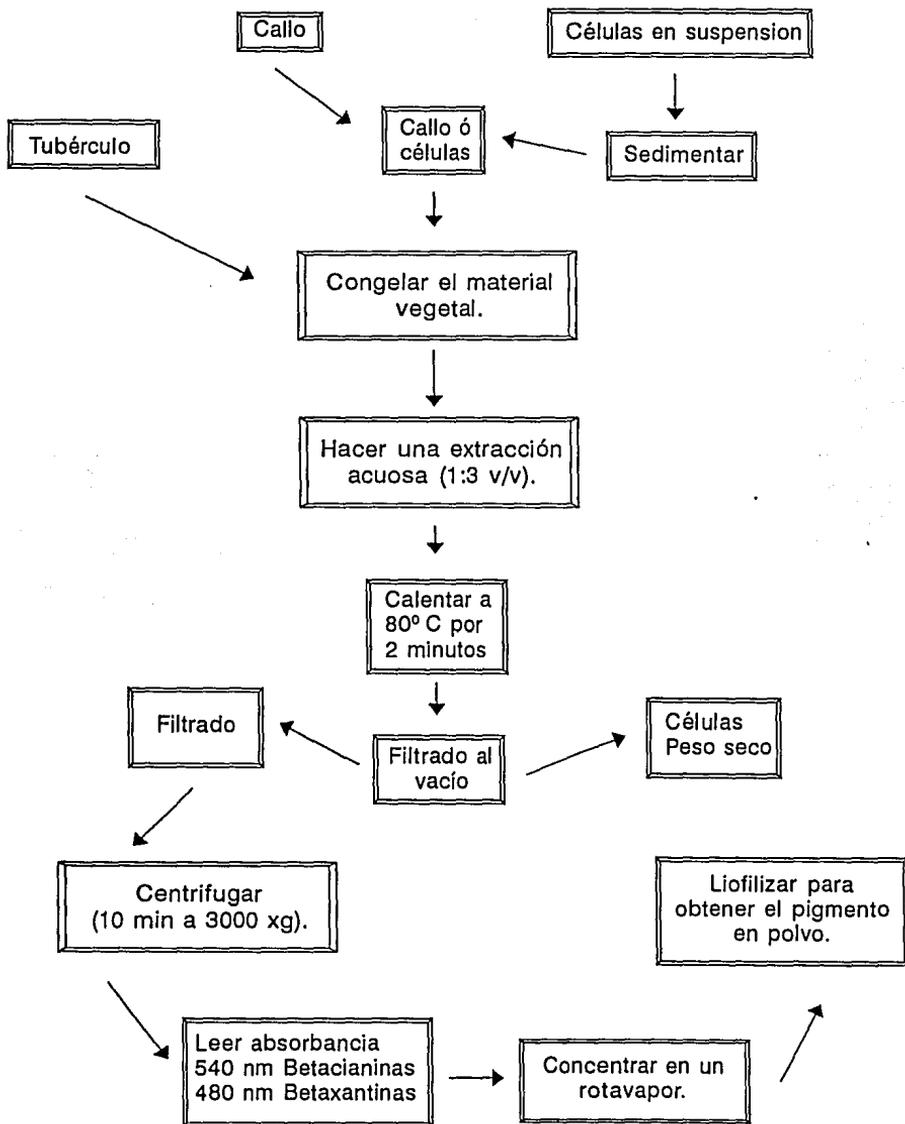


Figura 4. Metodología para la evaluación del crecimiento y la producción de betalaínas.

manera se establecieron los fenotipos de los callos por medio de una selección continua y recurrente.

La estabilidad de las líneas celulares se determinó con base en la proporción de cambio de los fenotipos a través del tiempo, en cada resiembra se contaron los callos que cambiaron de fenotipo con lo que se obtuvo un registro del fenotipo anterior y del fenotipo expresado en el momento de la evaluación. También se hicieron preparaciones de las células de los diferentes fenotipos para observarlas al microscopio óptico. Con los fenotipos más estables se hizo una prueba estadística de Z de proporciones para dos muestras, además de una prueba de t para ver si había diferencias significativas en su coloración.

V.6 Establecimiento de los cultivos madre en suspensión

Los cultivos en suspensión de los fenotipos mas estables se iniciaron con un inóculo de 3 g de peso fresco de callo en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio MS1 y MS2.

V.7 Cinética de crecimiento de los cultivos en suspensión

Se inocularon de 2 a 4.8 gPs/l, de células provenientes de un cultivo madre en suspensión, en 50 ml de medio MS1 y MS2 en un matraz Erlenmeyer de 250 ml .

Se tomaron muestras cada 4 días para determinar :

crecimiento celular (con base en el peso seco) , extracción y cuantificación de pigmentos y evaluación del consumo de nutrientes. Se hizo una prueba de t para determinar si había diferencias significativas para los siguientes casos : crecimiento con cinetina 0.1 y 0.01 mg/l y producción de betalaínas de los fenotipos mas estables.

Para medir el crecimiento celular se filtró la muestra en un embudo Buchner con papel filtro de peso conocido . Se lavaron las células con agua desionizada y se pusieron en una estufa a 80° C hasta que alcanzaron un peso constante y se pesaron en una balanza analítica determinando el peso seco por diferencia de pesos. La extracción y cuantificación de pigmentos se hicieron con base en los métodos descritos anteriormente.

Para medir el consumo de los macronutrientes principales en los cultivos en suspensión se emplearon las técnicas descritas por Rodríguez (1989) :

i) Carbohidratos : Se tomaron 10 ml del medio de cultivo libre de células y se les agregó 1 ml de H₂O desionizada, 1 ml de fenol al 5 % y 5 ml de H₂SO₄ concentrado. Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro (Shimadzu U V - 160 A) a una longitud de onda de 490 nm . La curva estándar se hizo con sacarosa en un intervalo de 0-1000 mg/ml.

ii) Fosfatos: A 1 ml de medio de cultivo libre de células se le adicionaron 2 ml de agua desionizada , 0.5 ml de H₂SO₄ 5M , 5 ml de una solución de isobutanol-benceno 1:1 (v/v) y 0.5 ml de molibdato de amonio al 10 % . Esta solución se

agitó durante 15 seg . Se extrajo 1 ml de la fase orgánica y se llevó a un volumen de 5 ml con una solución etanólica acidulada con H_2SO_4 al 3.2 % (v/v). Para desarrollar el color se agregaron 0.5 ml de una solución de cloruro de estaño monohidratado $SnCl_2 \cdot H_2O$ al 10 % (p/v) en HCl al 10 % . Se hicieron las lecturas en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 724 nm.

La curva estándar se hizo a partir de una solución madre de KH_2PO_4 (con 1 ml = 100 mg de PO_4^{-3}) , en un intervalo de 0 a 40 mg.

iii) Amonio y nitratos:

Se tomó una alícuota de 2 ml del medio de cultivo libre de células y se colocó en un matraz de ebullición de 100 ml, se le adicionaron 8 ml de agua desionizada, 200 mg de MgO y se sometieron a una destilación por arrastre de vapor. Se obtuvo el destilado en un matraz que tenía 5 ml de una solución indicadora de ácido bórico hasta alcanzar un volumen final de 30 ml. Se valoró el destilado con una solución H_2SO_4 , 0.005 N (1 ml de H_2SO_4 = 70 mg de N), hasta observar el cambio de color (verde a rosa), determinando de esta manera la cantidad de amonio del medio de cultivo.

Al residuo del matraz de destilación se le adicionaron 200 mg de la aleación de Devarda y se repitió el proceso de valoración descrito anteriormente, así se determinó la cantidad de nitratos existentes en el medio.

V.8 Cromatografía en capa fina de los pigmentos.

V.8.1 Cromatografía en capa fina en placas de celulosa.

Se realizaron cromatografías con los pigmentos liofilizados de callo amarillo, anaranjado y rojo, los cuales se obtuvieron por la metodología descrita anteriormente. La separación de los pigmentos de betalainas se llevó a cabo utilizando dos mezclas de solventes que contenían diferentes proporciones de isopropanol, etanol, agua destilada y ácido acético (Bilyk, 1981) y con placas cubiertas con celulosa de 10 x 20 cm (DC- Fertigplatten cel 300-25 UV₂₅₄).

La proporción de los solventes fué la siguiente: en la mezcla I se tenían 55 ml de isopropanol, 20ml de etanol, 20 ml de agua destilada con 5 ml de ácido acético. En la mezcla II se tenían 30 ml de isopropanol, 35 ml de etanol y 30 ml de agua destilada con 5 ml de ácido acético.

La manera en que se desarrolló la cromatografía para los tres casos fué la siguiente: se disolvieron 80 mg de pigmento en 2 ml de agua desionizada y se aplicó la muestra en la placa de celulosa, colocando ésta, primero en el sistema de solventes más polar (II), el cual separa los pigmentos de las sustancias insolubles. Después de que el solvente se movió 10 cm, la placa se secó y sin cambiar la orientación de la placa se colocó en el sistema de solventes menos polar (I) en el cual se dejó hasta que los solventes alcanzaron 15 cm.

V.8.2 Cromatografía en capa fina en placas de silica gel.

Se realizaron 4 cromatografías del pigmento rojo de callo, de células en suspensión, de tubérculo y de un colorante comercial. Se utilizaron placas de silica gel (Kieselgel 60 F₂₅₄) de 5 x 5 cm usando un sistema de solventes con *n*-propanol, ácido acético y agua (6:2:3 v/v) (Taya y col., 1992).

VI. RESULTADOS Y DISCUSION.

VI.1 Establecimiento de los cultivos *in vitro*.

Se trabajó con *Beta vulgaris* de la var. "Crosby's egyptian" porque de las variedades cultivadas en México, ésta presenta el mayor contenido de betalaínas, además de que se ha visto que las plantas que producen altas cantidades de metabolitos secundarios heredan dicha capacidad biosintética en los cultivos *in vitro* (Villegas y col., 1983; Zenk y Deus, 1982; Loyola y Miranda-Ham, 1990).

Con la metodología descrita se logró obtener una germinación del 90 % sin problemas de contaminación.

El medio B₅ se seleccionó en este estudio porque con él se ha obtenido una respuesta adecuada para la producción de betalaínas en diferentes especies de las *Centrospermae* (Böhm y Rink, 1988; Hunter y Kilby, 1990).

A partir de los hipocótilos de las plántulas obtenidas *in vitro* se obtuvo la formación de callo a los 21 días después de su siembra.

La concentración de 2,4-D 0.02 mg/l en el medio B₅ para el mantenimiento de los callos, permitió que conservaran su coloración, lo que facilitó la selección visual de los fenotipos obtenidos. En el caso de la cinética de crecimiento promovió el crecimiento y la producción de betalaínas. Los cultivos se han mantenido en este medio por más de un año.

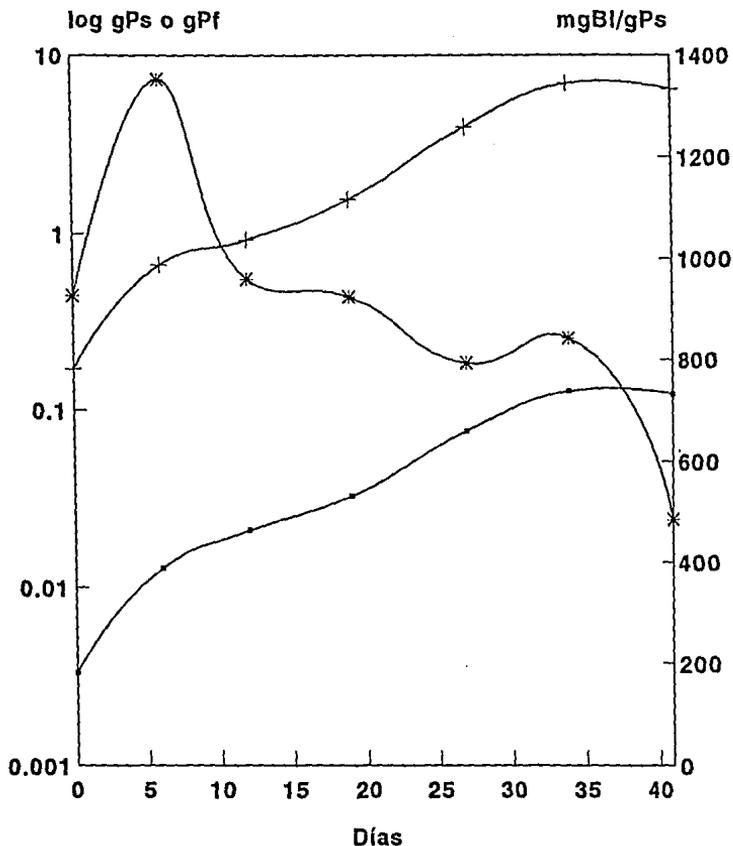
VI.2 Cinética de crecimiento y producción de betalainas de callos de *Beta vulgaris*.

La cinética de crecimiento y producción de betalainas de los callos (figura 5), tuvo una duración de 41 días con un tiempo de duplicación celular de 8.35 días. Al inicio de la cinética no se aprecia la fase lag probablemente debido a que el inóculo inicial (0.2 gPs) fué alto, por lo cual las células pudieron dividirse rápidamente.

Con respecto a la producción de betalainas la máxima producción de pigmento que alcanzaron las células fué de 1352 mgBl/gPs en el día 6 de la cinética, a partir de este día la producción de betalainas descendió y en el día en que finalizó la cinética hubo una producción de 485 mgBl/gPs.

Este comportamiento parece discrepar con el comportamiento general de los metabolitos secundarios en el que la máxima producción se observa en la fase estacionaria de crecimiento, sin embargo, existen varios reportes en literatura que prueban que las células mantenidas *in vitro* pueden alterar su patrón de expresión metabólica (Komamine y col., 1989; Loyola-Vargas y Miranda-Ham, 1990; Miranda-Ham, 1990) .

La productividad de betalainas fué de 225.3 mgBl/gPs/d, con una relación betacianina/betaxantina (Bc/Bx) de 0.6 lo que indicó que las células produjeron en este caso mayor cantidad de betaxantinas que de betacianinas, resultados similares fueron reportados por Villegas y col.



→ Peso seco + Peso fresco * Betalainas

Figura 5. Cinética de crecimiento y producción de betalainas de callo de *Beta vulgaris*.

(1992) para el callo de *Amaranthus tricolor*. Al comparar la cantidad de pigmento presente en la variedad estudiada, en callo existe aproximadamente la mitad (32 mg/gPs) de la del tubérculo (60 mg/gPs).

VI.3 Selección de líneas celulares.

VI. 3.1 Establecimiento de las líneas celulares.

Los callos obtenidos de los explantes de hipocótilo se colocaron en el medio MM y a partir de ellos se seleccionaron las líneas celulares. Los callos al principio presentaban un mosaico de colores y en cada subcultivo los grupos de células de diferente color fueron separados de manera visual del resto del callo original y colocados en medio fresco MM.

Gradualmente después de tres meses de subcultivos continuos (Figura 6) se lograron establecer los fenotipos individuales de células rojas (10B8), anaranjadas (8A8), amarillas (4A8), verdes (30A8), blancas (1A1) y cafés (5B4) siguiendo la clave de color de Kornerup y Wanschler, (1978).

De las líneas celulares obtenidas a partir de la var. "Crosby's egyptian" se hicieron observaciones al microscopio para buscar una morfología celular asociada con el fenotipo, sin embargo, se encontró para todos los fenotipos un mosaico de formas celulares (Figura 7).

Anteriormente Girod y Zryd (1991), establecieron líneas

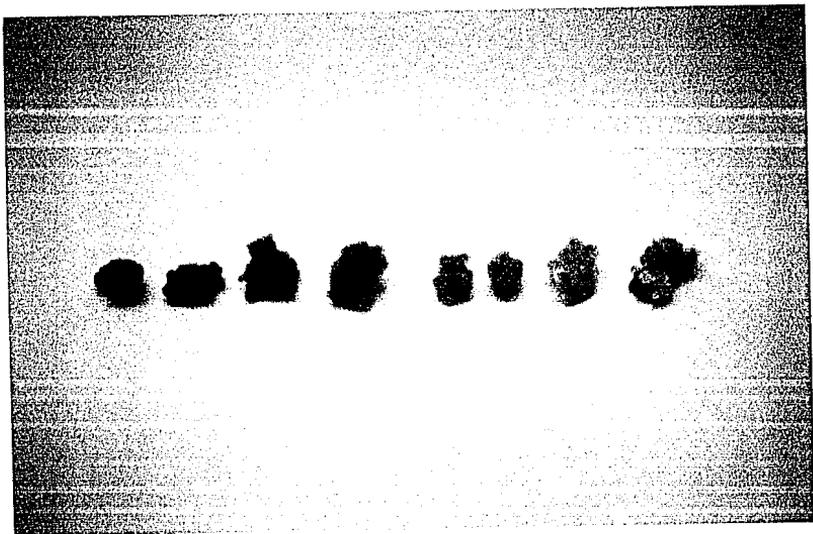


Figura 6. Fenotipos de las líneas celulares de *Beta vulgaris*.



Figura 7. Micrografía de células de *Beta vulgaris*. (10x).

celulares de *B. vulgaris* de la variedad "Bikores monogerm" con fenotipos blanco, verde, amarillo, anaranjado, rojo y violeta y observaron que los diferentes fenotipos de los callos estaban asociados con células de morfología diferente, los fenotipos blanco, anaranjado y violeta eran una mezcla de pequeños agregados celulares y de células elongadas, mientras que los fenotipos amarillo, verde y rojo estuvieron formados por pequeños grupos de células esféricas, por lo que estos autores proponen que hay una relación estrecha entre el fenotipo celular y la composición del medio de cultivo de inducción. Además observaron que, una vez establecidos, algunos de los fenotipos (amarillo, anaranjado y violeta) requirieron medios diferentes a los de inducción para mantener su fenotipo.

En este estudio no se necesitó de un medio de inducción ó de mantenimiento específico, todos los fenotipos se obtuvieron y se mantuvieron en el medio de cultivo MM, con las mismas características respecto a macronutrientes, micronutrientes, vitaminas y reguladores del crecimiento.

VI.3.2 Estabilidad de los fenotipos.

Una vez establecidos los fenotipos se procedió a evaluar su estabilidad, en cada subcultivo, se contaron los callos que cambiaron de coloración y se obtuvo la proporción (Pr) de estabilidad y de cambio de los fenotipos a lo largo del tiempo.

En la primera evaluación, 4 meses después de iniciar las líneas celulares (Figura 8), se observó que las más estables fueron los fenotipos rojo ($Pr=0.9$), anaranjado ($Pr=0.74$) y café ($Pr=1$); hubo interconversiones entre todos los fenotipos a excepción de el fenotipo café. Las interconversiones en los fenotipos verde y rojo hacia blanco ó amarillo y anaranjado ó amarillo fueron unidireccionales, mientras que para los fenotipos verde a anaranjado, amarillo a anaranjado y blanco a anaranjado las interconversiones fueron bidireccionales.

Para la segunda evaluación, 5 meses después de iniciar las líneas celulares (Figura 9), cabe mencionar que los fenotipos rojo y anaranjado siguieron siendo los más estables, en el fenotipo café la estabilidad disminuyó a 0.5, con una una interconversión a verde, en los otros fenotipos también hubo estabilidad, para el fenotipo verde la Pr fué de 0.57, para el amarillo fué de 0.40 y para el blanco fué de 0.29.

El fenotipo verde aunque mantuvo las conversiones anteriormente mencionadas, de manera predominante se volvió anaranjado ($Pr =0.29$), lo mismo sucedió con los fenotipos blanco ($Pr=0.57$) y amarillo ($Pr=0.4$). El fenotipo blanco además de cambiar hacia anaranjado y verde se volvió amarillo. Cabe destacar que a partir de esta evaluación el fenotipo rojo permaneció estable sin cambios a lo largo del tiempo.

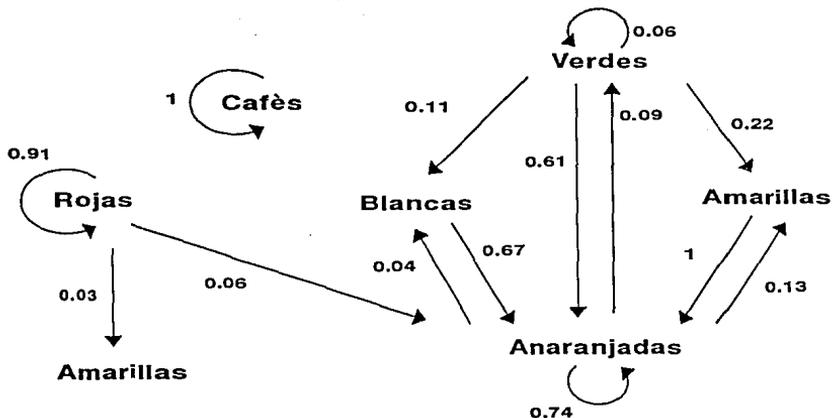


Figura 8. Primera evaluación de la estabilidad de los fenotipos de *B. vulgaris* 4 meses después de iniciar su cultivo.

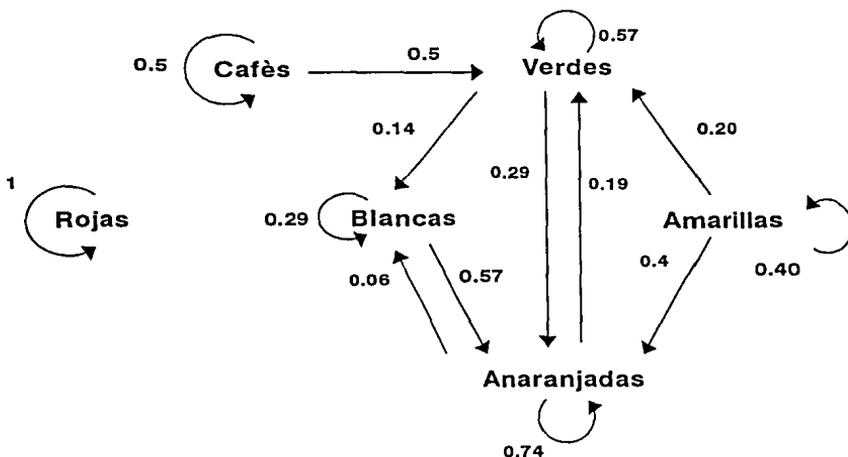


Figura 9. Segunda evaluación de la estabilidad de los fenotipos de *B. vulgaris*, 5 meses después de iniciar su cultivo.

En la tercera evaluación, 6 meses después de iniciar las líneas celulares (Figura 10), se siguió manteniendo la estabilidad de los fenotipos rojo, anaranjado, verde, amarillo, café y blanco. En esta evaluación se observó por primera vez que algunas células anaranjadas se volvieron rojas, aunque la proporción de cambio fué muy pequeña (0.05), entre los fenotipos verde y amarillo la proporción de cambio fué muy parecida (0.29 y 0.22), lo mismo sucedió con los fenotipos verde y anaranjado (0.07 y 0.08) , el fenotipo café cambió a blanco (Pr = 0.5) y parte del fenotipo blanco cambió a rojo (Pr de cambio = 0.2).

Durante la cuarta evaluación, 7 meses después de iniciar las líneas celulares (Figura 11), los cambios más notables fueron: el fenotipo blanco perdió su estabilidad, con una Pr de cambio de 1 se volvió verde y en el fenotipo anaranjado hubo un aumento en la Pr de cambio (0.67) hacia rojo.

Se puede mencionar que en general la estabilidad de los fenotipos fué la siguiente (cuadro 4) : el fenotipo rojo ocupó el primer lugar en estabilidad (Pr de estabilidad= 1), aunque después se identificó que dentro del fenotipo rojo apareció un fenotipo más oscuro el cual se clasificó como pùrpura (12C8). El anaranjado el segundo (Pr de estabilidad= 0.70), el cual sufrió cambios a rojo (Pr=0.36), a verde (Pr=0.13), a amarillo (Pr=0.06) y a blanco (Pr=0.05). El tercer lugar de estabilidad le correspondió al fenotipo café (Pr de estabilidad=0.63), su tendencia de cambio es hacia

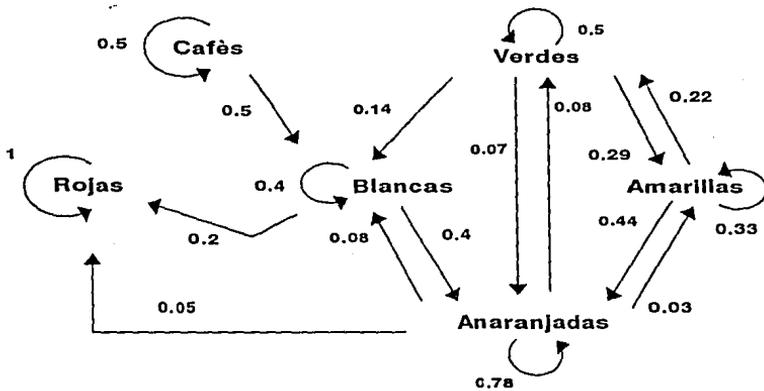


Figura 10. Tercera evaluación de la estabilidad de los fenotipos de *B. vulgaris*, 6 meses después de iniciar su cultivo.

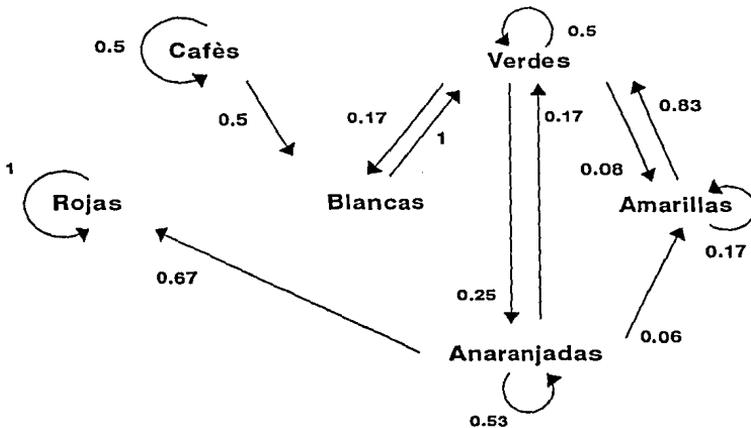


Figura 11. Cuarta evaluación de la estabilidad de los fenotipos de *B. vulgaris*, 7 meses después de iniciar su cultivo.

blanco (Pr=0.25) y a verde (Pr=0.13). El cuarto lugar en estabilidad fué para el fenotipo verde (Pr de estabilidad=0.41), su tendencia de cambio fué hacia anaranjado (Pr=0.31), amarillo (Pr=0.15) y blanco (Pr=0.14). El quinto lugar en estabilidad le correspondió al fenotipo amarillo (Pr de estabilidad=0.23), su tendencia de cambio fué hacia anaranjado (Pr=0.46) y a verde (Pr=0.31), por último se tuvo al fenotipo blanco con una Pr de estabilidad de 0.17, su tendencia de cambio es a anaranjado (Pr=0.41), a verde (Pr=0.25) y a rojos (Pr=0.05) y a amarillos (Pr=0.14). La prueba estadística de Z de proporciones para dos muestras demostró que la proporción de estabilidad del fenotipo rojo era significativamente mayor ($p < 0.05$), que la proporción de estabilidad del fenotipo anaranjado.

Los resultados obtenidos muestran que las líneas celulares que se seleccionaron exhibieron cierto grado de estabilidad con respecto al fenotipo, no obstante ello, eventualmente algunas células cambiaron de una coloración a otra, lo que concuerda con los datos obtenidos por Girod y Zryd (1991a), sin embargo algunas diferencias que se observaron con respecto a la interconversión de fenotipos son: a) en este caso las líneas celulares amarilla y verde cambiaron su fenotipo en mayor proporción hacia el fenotipo anaranjado y no al rojo y b) el fenotipo blanco cambió hacia amarillo además de rojo, verde y anaranjado como lo reportan los autores mencionados anteriormente.

Cuadro 4. Resumen de la estabilidad y proporciones de cambio de los fenotipos de las líneas celulares de *Beta vulgaris* durante 7 meses de cultivo *in vitro*.

| FENOTIPO | Rojo | Anaranjado | Amarillo | Verde | Blanco | Café |
|------------|------|------------|----------|-------|--------|------|
| ROJO | 1.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| ANARANJADO | 0.36 | 0.70 | 0.06 | 0.13 | 0.05 | 0.0 |
| AMARILLO | 0.0 | 0.46 | 0.23 | 0.31 | 0.0 | 0.0 |
| VERDE | 0.0 | 0.31 | 0.15 | 0.41 | 0.14 | 0.0 |
| BLANCO | 0.05 | 0.41 | 0.14 | 0.25 | 0.17 | 0.0 |
| CAFE | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.13 | 0.25 | 0.63 |

VI.3.3 Composición del pigmento de las líneas celulares seleccionadas.

En la figura 12, se presenta el espectro de absorción del extracto acuoso de algunos de los fenotipos, el púrpura presentó un pico de máxima absorción a 540 nm el cual corresponde a las Bc, en tanto que el amarillo presentó el pico máximo a 480 nm correspondiente a las Bx, para el fenotipo rojo se observaron los dos picos (540 y 480 nm), indicando la presencia de Bc y de Bx, mientras que para el fenotipo blanco no se observó ningún pico de absorción, lo anterior concuerda con lo reportado en la literatura (Jiménez y col., 1992).

La producción de betalaínas (B1) para las diferentes líneas celulares se muestra en la figura 13 en la cual se observó que para el fenotipo púrpura la relación Bc/Bx es de 2.22, para el rojo de 1.25 y para el amarillo de 0.42, indicando de esta manera un cambio de la producción en los tres fenotipos de un predominio de Bc a Bx. En el fenotipo blanco, la producción de betalaínas es mínima si se compara con la alcanzada por los otros tres fenotipos. La prueba de t indicó que si existen diferencias estadísticas entre el fenotipo rojo y el fenotipo anaranjado ($p = 0.0000414$).

En los resultados obtenidos por Girod y Zryd (1991a), se puede observar que en las líneas celulares rojas, anaranjadas y violetas existe la presencia de betacianinas y

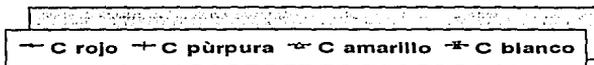
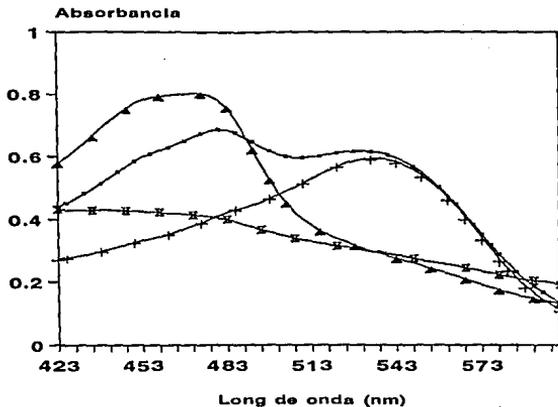


Figura 12. Espectro de absorción de los diferentes fenotipos de callo de *Beta vulgaris*.

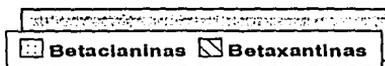
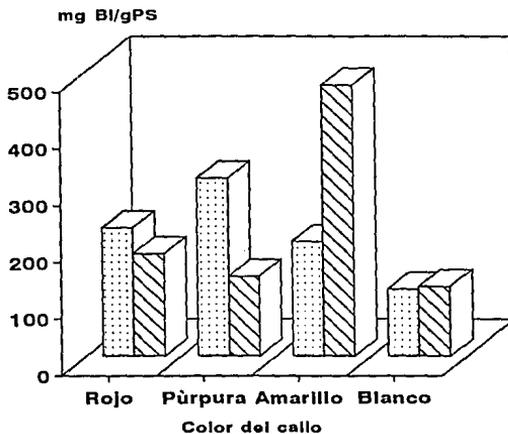


Figura 13. Producción de betalaínas de algunos fenotipos de callo de *Beta vulgaris*.

de betaxantinas, mientras que en la línea celular amarilla sólo están presentes las betaxantinas hecho que concuerda con los datos obtenidos en este trabajo.

La expresión fenotípica de los callos de betabel pudiera estar controlada en dos niveles:

a) a nivel de regulación genética: Al respecto Trezzini y Zryd (1990), propusieron un modelo para *Portulacca grandiflora* que involucra tres genes: el locus C, que es un alelo dominante el cual es responsable de la conversión de dopa a ácido betalámico; el locus R para la transformación de dopa a ciclo-dopa y el locus I (inhibidor) que evita la conjugación de residuos de aminoácidos con el ácido betalámico.

Con base en lo anterior, en las líneas amarillas se esperaría que los genes C estuvieran transcribiéndose, en tanto que los genes R e I se encontrarían reprimidos permitiendo con ello la formación del ácido betalámico y su unión con los aminoácidos ó aminas. Para las líneas violetas los tres genes estarían transcribiéndose y con ello el producto del gen I detendría la síntesis de las betaxantinas favoreciendo la formación de ciclo-dopa que puede unirse con el ácido betalámico para formar las betacianinas.

Para los callos con fenotipos intermedios (rojo-anaranjado) pudiera darse una coordinación de ambos sistemas que permitiera la formación de las betacianinas y de las betaxantinas. Finalmente en los callos de fenotipos verde y

blanco donde no se observa producción de betalainas el gen C estaría inactivo.

En base al conocimiento que se tiene de la ruta biosintética (figura 2), el gen C codificaría para la síntesis de la enzima 4,5 dioxigenasa, el gen R la enzima fenoloxidasa (no caracterizada hasta el momento) y el gen I produciría los inhibidores para las enzimas que unen el ácido betalámico con aminoácidos ó aminas.

b) a nivel de actividad enzimática : Girod y Zrid (1991a), han reportado que para los callos anaranjado, rojo y violeta existe una acumulación de intermedarios metabólicos de la ruta como son: tirosina, dopa, dopamina, tirosamina y ácido betalámico, siendo la dopamina superior en 1 ó 2 órdenes de magnitud; por lo que podría existir una regulación a nivel de actividad enzimática. Se ha observado que a partir de la dopa se puede formar dopamina la cual también es aceptada por la enzima que forma el ácido betalámico : la 4-5 dioxigenasa. Aunque la especificidad por substrato de esta enzima es mayor para la dopa (Km de 3.9) que para la dopamina (Km de 6.3) al haber mayor cantidad de esta última, la 4-5 dioxigenasa comenzaría a aceptarla permitiendo que la dopa presente pudiera procesarse para formar la ciclo-dopa.

Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo que activa la producción de betalainas, la secuencia de reacciones de la ruta metabólica y los pasos claves para su regulación.

VI.4 Cinéticas de crecimiento, consumo de nutrientes y producción de Betalainas en los cultivos en suspensión de células de *Beta vulgaris* .

Se establecieron cultivos en suspensión de células anaranjadas y rojas porque éstos fueron los fenotipos de mayor estabilidad en dos concentraciones de cinetina diferentes (0.01 mg/l y 0.1 mg/l), debido a que se ha visto que los reguladores del crecimiento parecen tener un papel importante para el establecimiento, mantenimiento y producción de betalainas de los cultivos de *Beta vulgaris* (Girod y Zryd, 1991a; Leathers y col., 1992).

VI.4.1 Cinética de crecimiento de las células anaranjadas (AN) de *B. vulgaris* en suspensión con cinetina 0.10 mg/l y 2,4-D 0.02 mg/l .

El inóculo para el inicio de la cinética fué de 1.6 gPs/l, que se obtuvo de los cultivos madre previamente establecidos. El crecimiento de las células fué sigmoideal, (figura 14 a), con una duración de 16 días (384 horas) y un tiempo de duplicación de 2.7 días. El máximo crecimiento celular se obtuvo el día 10 del cultivo y fué de 5.2 gPs/l.

Producción de betalainas (figura 14 a): Esta línea celular mantuvo su expresión fenotípica anaranjada en los cultivos en suspensión con una relación de Bc/Bx de 1.08 por lo que se puede mencionar que la producción de ambos

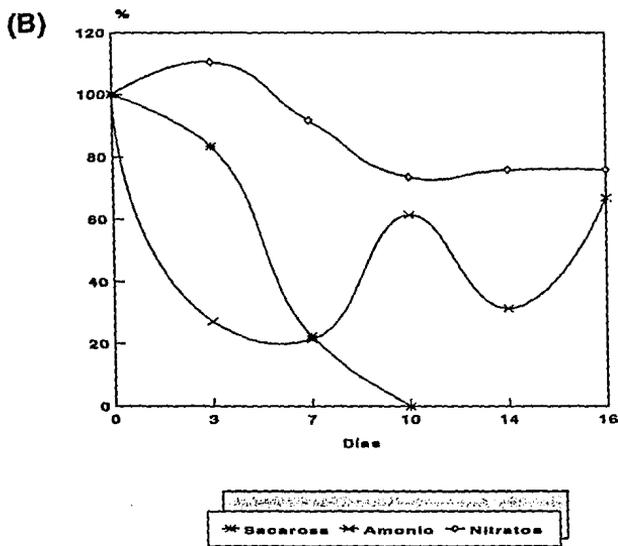
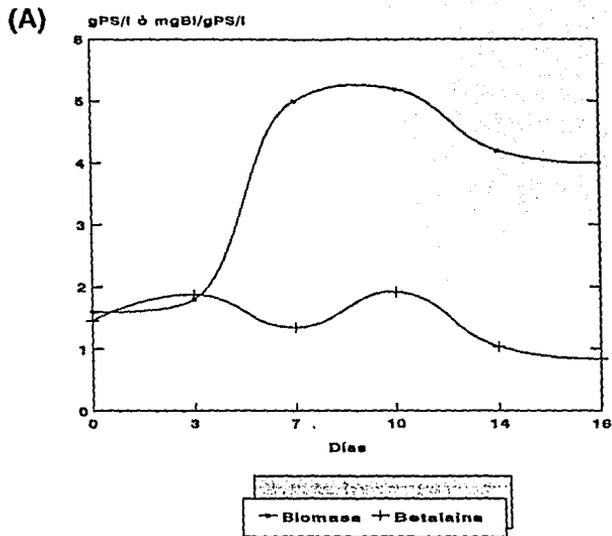


Figura 14. Cinética de células AN de *B. vulgaris* en suspensión con cinetina 0.1 mg/l y 2,4-D 0.02 mg/l. (A) crecimiento y producción de Bl. (B) consumo de nutrientes.

pigmentos en la célula fué la misma que la observada en el tejido calloso. La máxima producción de betalainas se cuantificó el día 10 con una producción de 1.9 mgBl/gPs. En la curva de producción de betalainas se pudo observar que ésta se mantuvo en un rango de 1.9 a 1.0 hasta el día 16 en el que disminuyó a 0.083 mgBl/gPs. La productividad de este cultivo fué de 0.2 mgBl/gPs/d .

Consumo de nutrientes (figura 14 b):

Sacarosa: se observó que el consumo de la sacarosa como fuente de carbono fué total, desapareciendo del medio el día 10 en que el cultivo se encontraba en la fase estacionaria.

Nitrógeno: La fuente de nitrógeno preferentemente consumida fué el amonio el cual descendió en el medio de cultivo durante las fases exponencial y lineal , sin embargo cuando las células dejaron de crecer hubo un ascenso, debido probablemente a la lisis de las células. Con respecto al nitrógeno en forma de nitrato se observó lo contrario, cuando las células crecieron se mantuvo en un nivel del 100 % pero cuando las células llegaron a la fase estacionaria y entraron en la etapa de lisis hubo un pequeño descenso (75.9 %) el cual se mantuvo constante hasta el final de la cinética.

VI.4.2 Cinética de crecimiento de células AN de *B. vulgaris* con cinetina 0.01 mg/l y 2,4-D 0.02 mg/l .

El inóculo para el inicio de la cinética fué de 0.6 gPs/l. En esta curva (figura 15 a), se observó la ausencia de la fase lag, la cinética tuvo una duración de 14 días (336 horas) con tiempo de duplicación celular (td) de 2.6 días. El máximo crecimiento celular fué de 3 gPs/l .

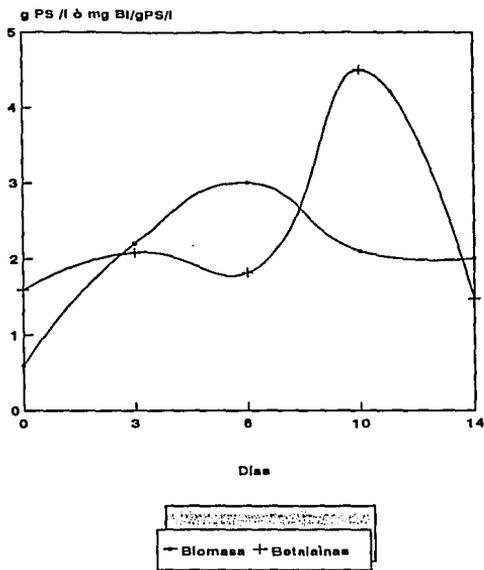
Producción de Betalaínas: La pigmentación de esta línea celular (figura 15 a), también se debió a la presencia de betacianinas y de betaxantinas con una relación Bc/Bx de 1.043. La máxima producción de betalaínas de este cultivo fué de 4.58 mgBl/gPs, con una productividad de 0.46 mgBl/gPs/d . La máxima producción de betalaínas se observó cuando las células entraron en la etapa de lisis (día 10), aunque sigue dándose la producción de betalaínas hasta el día 14 en que finalizó la cinética de crecimiento.

Consumo de nutrientes (figura 15 b):

Sacarosa: El mayor consumo de sacarosa se observó después del día 3 y continuó hasta el día 10, en que desapareció del medio.

Nitrógeno: En este caso el amonio se consume de manera preferencial sobre el nitrato, a partir del día 3 hay un descenso de ambos, aunque el nitrato es menor que el del amonio .

(A)



(B)

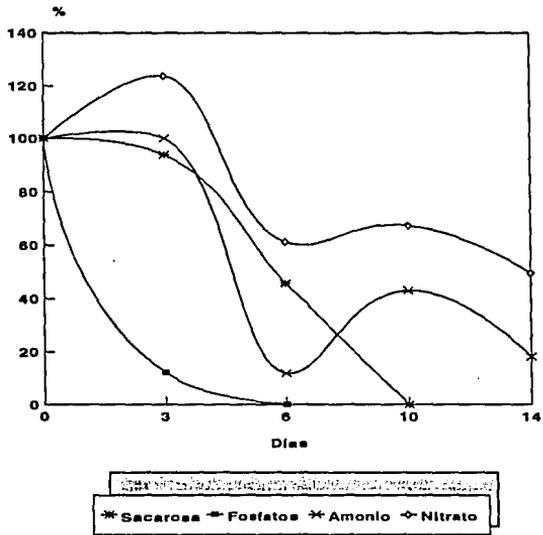


Figura 15. Cinética de células AN de *B. vulgaris* en suspensión con cinetina 0.01 mg/l y 2,4-D 0.02 mg/l (A) crecimiento y producción de BI. (B) consumo de nutrientes.

Fosfatos: los fosfatos se consumieron rápidamente durante la fase lineal de la cinética, para el día 6 la presencia de éstos es nula.

Comparando los resultados de ambas cinéticas (cuadro 5), se observa que en los dos casos las células anaranjadas presentaron un tiempo de duplicación muy similar, la prueba de t confirmó que no existen diferencias estadísticas entre el crecimiento ($p = 0.065$). Lo mismo sucedió con la relación Bc/Bx. Con respecto a la productividad de ambos cultivos, en las células que crecieron con 0.01 mg/l de cinetina (0.46 mgBl/gPs/d) resultó del doble comparado con las células que crecieron en 0.1 mg/l de cinetina (0.2 mgBl/gPs/d), sin embargo al hacer el análisis estadístico (prueba de t) se obtuvo que no hay diferencias significativas entre la producción de betalaínas ($p = 0.142$), lo anterior puede deberse a que en el caso de cinetina 0.01 mg/l la dispersión de los datos es muy grande lo que podría estar enmascarando la diferencia.

En ambos casos el consumo de sacarosa fué total, el nitrógeno en forma de amonio fué consumido en mayor proporción que en forma de nitratos lo que se debe al hecho de que la asimilación de los nitratos implicaría una alta demanda de energía. Cresswell y col. (1989), mencionan que cuando hay NH_4^+ en el medio de cultivo junto con otras formas oxidadas como nitrato, el NH_4^+ se toma y se utiliza de manera preferencial.

Cuadro 5. Parámetros cinéticos de los cultivos de células en suspensión de fenotipo anaranjado de *B. vulgaris*.

| | Cinetina (mg/l) | | Leathers y col. (1992). |
|---|-------------------|------|----------------------------|
| | 0.01 | 0.10 | |
| Máximo crecimiento (gPs/l) | 3.4 | 5.2 | 16 a 17 |
| Vel. esp. de crecimiento. (d ⁻¹). | 0.26 | 0.25 | 0.20 a 0.23 |
| Tiempo de duplicación (días) | 2.6 | 2.7 | 3 a 3.5 |
| Productividad (mgBl/gPs/d) | 0.46 | 0.2 | 0.7 |
| Bc/Bx | 1.04 | 1.08 | ---- |

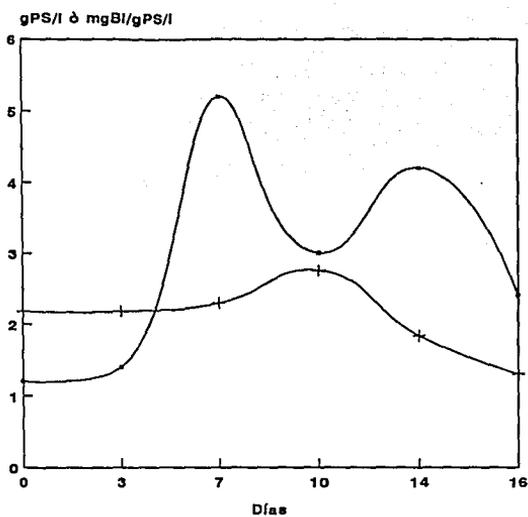
Al comparar los resultados obtenidos de las células anaranjadas crecidas en 0.01 y 0.1 mg/l de cinetina (cuadro 5), con los reportados por Leathers y col. (1992), se observa que el tiempo de duplicación es ligeramente menor (0.3 días) lo cual tiene como consecuencia un menor tiempo en la duración de la cinética (20 horas menos). Sin embargo su crecimiento celular fué mayor (16 a 17 gPs/l) en consecuencia lograron tener una productividad de 0.7 mgBl/gPs/d) lo cual resulta tres veces superior a las productividades obtenidas en este trabajo.

No obstante, son muy factibles las posibilidades de aumentar la productividad de los cultivos de este estudio al manipular los nutrientes, debido a que como se observó en las cinéticas, el crecimiento celular está limitado por la cantidad de fosfato y sacarosa, por lo que se podrían optimizar sus concentraciones para aumentar el crecimiento, como se ha hecho en otros sistemas (Knobloch y col., 1981 ; Stafford y Fowler, 1983; Villegas y col., 1992)

VI.4.3 Cinética de crecimiento de células rojas de *B. vulgaris* con cinetina 0.1 mg/l y 2,4-D 0.02 mg/lm.

El inóculo para el inicio de la cinética fué de 1.2 gPs/l. El crecimiento de las células mostró un patrón sigmoidal (figura 16 a), con una duración de 16 días (384 horas) con un td de 2.11 días, observandose el día 7 el máximo crecimiento celular que fué de 5.2 gPs/l.

(A)



(B)

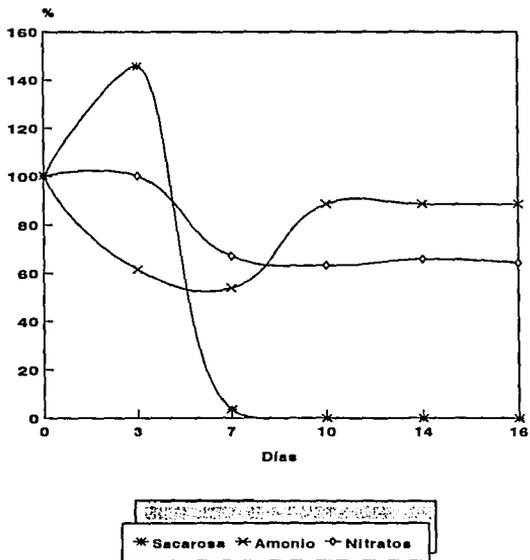


Figura 16. Cinética de células R de *B. vulgaris* en suspensión con cinetina 0.1 mg/l y 2,4-D 0.02 mg/l. (A) crecimiento y producción de BI. (B) consumo de nutrientes.

Producción de Betalaínas (figura 16 a): La relación Bc/Bx fué de 1.5, lo que indicó una mayor producción de betacianinas que de betaxantinas por lo que predomina la coloración roja en las células. La máxima producción de betalaínas fué de 2.74 mgBl/gPs en el día 10 y la productividad fué de 0.27 mgBl/gPs/d . La producción de betalaínas se mantuvo en un intervalo de 2.1 a 2.7 mgBl/gPs a lo largo del ciclo de crecimiento hasta que las células entraron en la fase de lisis en donde desciende a 1.3 mgBl/gPs.

Consumo de nutrientes (figura 16 b):

Sacarosa: el consumo de sacarosa como fuente de carbono fué alto durante la fase lineal del cultivo (80%) y para cuando las células se encontraron en la fase de desaceleración (días 7 y 10) ya no hubo fuente de carbono en el medio de cultivo.

Nitrógeno: el consumo de amonio bajó durante la fase lineal a un 60% pero en la fase de desaceleración se incrementó debido a la muerte celular, durante la fase estacionaria y la fase de lisis se mantuvo en un 90 %. El consumo de nitrato también bajó durante la fase lineal a un 65 %, manteniendose en este valor a lo largo de todo el ciclo de crecimiento.

VI.4.4 Cinética de crecimiento de células rojas de *B. vulgaris* con cinetina 0.01 mg/l y 2,4-D 0.02 mg/l.

El inóculo para el inicio de la cinética fue de 0.8 gPs/l, pero por el tamaño del inóculo las células hicieron una fase lag de casi 5 días (figura 17 a). El crecimiento de las células fué sigmoideal, la cinética tuvo una duración de 15 días con un t_d de 4.7 días. El día 11 se obtuvo el máximo crecimiento celular con 3.4 gPs/l.

Producción de Betalaínas (figura 17 a): La relación B_c/B_x es de 0.7, lo que indicó una mayor producción de betaxantinas que de betacianinas y sin embargo lo que predomina es la coloración roja en las células. La máxima producción de betalaínas fué de 5.55 mgBl/gPs en el día 4 y la productividad fué de 1.39 mgBl/gPs/d . La producción de betalaínas es mayor cuando las células se encuentran en la fase lag y disminuye a un intervalo de 3.8 a 3.4 mgBl/gPs a lo largo del ciclo de crecimiento .

Consumo de nutrientes (figura 17 b):

Sacarosa: No hay consumo de sacarosa durante las fases lag y exponencial, el porcentaje de sacarosa como fuente de carbono se mantiene en un 100 % en el medio de cultivo pero, a partir de la fase lineal la presencia de sacarosa en el medio desciende drásticamente debido a la oxidación de la fuente de carbono y a la división celular, cuando las células están en la fase estacionaria el consumo de sacarosa es total (día 11).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

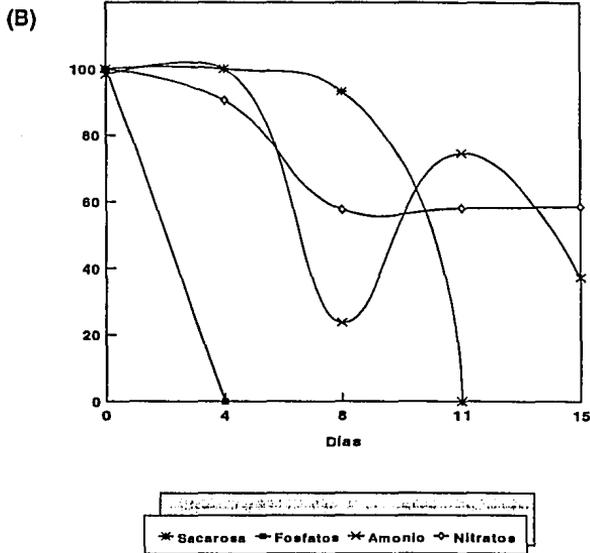
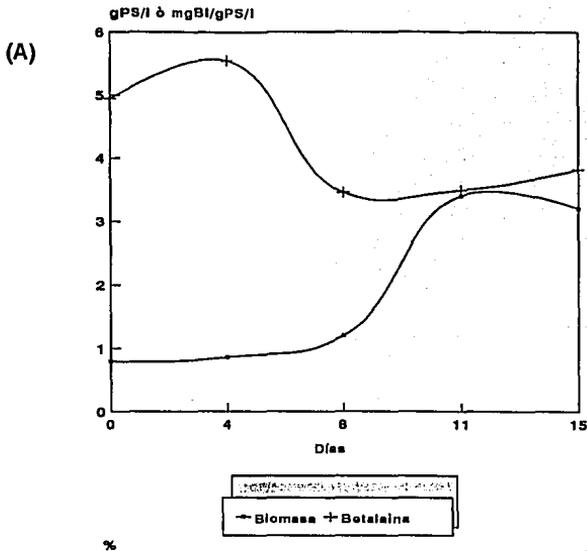


Figura 17. Cinética de células R de *B. vulgaris* en suspensión con cinetina 0.01 mg/l y 2,4-D 0.02 mg/l. (A) crecimiento y producción de BI. (B) consumo de nutrientes.

Nitrógeno: El consumo de nitrógeno tanto en su forma de amonio como en su forma de nitrato presentó una disminución gradual hasta llegar a un 80 % al término de la fase lag, durante la fase exponencial hay otra disminución a un 70%, y al llegar a la fase lineal y estacionaria se mantuvo en un valor del 60 %.

Fosfatos: La totalidad de fosfatos presentes en el medio de cultivo son asimilados por la célula durante las fases lag y exponencial .

Comparando el comportamiento de las células rojas bajo dos condiciones de cinetina (0.01 y 0.10 mg/l) se puede resaltar lo siguiente (cuadro 6): un menor tiempo de duplicación en las células con cinetina 0.1 mg/l, la prueba de t indicó que no hay diferencias estadísticas en el crecimiento ($p=0.282$) sin embargo, en este caso se puede observar de nuevo que la dispersión de los datos es muy grande para cinetina 0.1 mg/l.

Se vió que si existen diferencias estadísticas en la producción de betalaínas ($p=0.00083$). La productividad de betalaínas fué 5 veces más alta en las células con cinetina 0.01 mg/l y la relación Bc/Bx indicó un cambio en la expresión genética de un predominio de Bc en cinetina 0.1 mg/l a un predominio de Bx con cinetina 0.01 mg/l.

Comparando estos resultados con los reportados por Leathers y col. (1992) (cuadro 6), para los cultivos de células violetas en suspensión de *B. vulgaris*, con respecto a la velocidad específica de crecimiento (0.20 a 0.30

Cuadro 6. Parámetros cinéticos de los cultivos de células en suspensión de fenotipo rojo de *B. vulgaris*.

| | Cinetina (mg/l) | | Leathers y col. (1992). |
|--|-------------------|------|----------------------------|
| | 0.01 | 0.10 | |
| Máximo crecimiento (gPs/l) | 3.4 | 5.2 | 8 a 12 |
| Vel. esp. de crecimiento. (d-1). | 0.14 | 0.32 | 0.20 a 0.30 |
| Tiempo de duplicación (días) | 4.7 | 2.11 | 3.4 a 5 |
| Productividad (mgBI/gPs/d) | 1.39 | 0.27 | 6 a 18 |
| Bc/Bx | 0.7 | 1.5 | ---- |

d^{-1}), los cultivos de este trabajo se encontraron dentro de ese rango (0.147 a $0.32 d^{-1}$). La biomasa máxima que lograron fué de 8 a 12 gPs/l en este caso la biomasa máxima es menor en ambas condiciones (3.4 y 5.2 gPs/l), la producción que estos autores obtuvieron fué de 9 a 18 mgBc/gPs con una productividad 6 a 18 mgBl/gPs/d, es decir que sus cultivos celulares sólo produjeron betacianinas, mientras que los cultivos celulares utilizados en este trabajo produjeron betacianinas y betaxantinas y tuvieron una productividad de 1.39 y 0.27 mgBl/gPs/d .

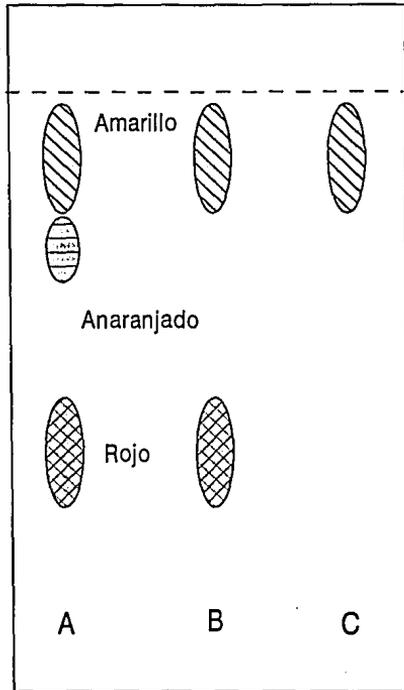
De manera general al comparar la productividad de los cultivos en suspensión (0.2 a 1.39 mgBl/gPs/d) con la productividad obtenida en el tubérculo de la misma variedad (2.8 mgBl/gPs/d) se encontró que la primera fué menor.

VII. Caracterización de los pigmentos por cromatografía en capa fina

VII.1 Cromatografía en capa fina en placas de celulosa.

Se trabajó con el pigmento extraído de callo de los fenotipos rojo, anaranjado y amarillo. Los resultados se muestran a continuación (figura 18) :

El pigmento obtenido del callo rojo (B) y anaranjado (A) se separaron en dos fracciones; una roja ($R_f = 0.39$) correspondiente a las Bc y una amarilla ($R_f = 0.80$) de Bx, pero además para el fenotipo anaranjado se observó una



**Figura 18. Análisis de betalainas en TLC de celulosa :
(A) pigmento anaranjado, (B) pigmento rojo y (C)
pigmento amarillo de tejido calloso de *B. vulgaris*.**

tercera banda intermedia de color anaranjado ($R_f = 0.69$). A diferencia de los pigmentos anteriores, para el pigmento obtenido de callo amarillo (C), sólo se observó la banda de color amarillo ($R_f = 0.80$) correspondiente a las betaxantinas. Estos resultados no concuerdan del todo con los datos obtenidos por el método espectrofotométrico, de donde por ejemplo para los callos amarillos se obtenía la presencia de Bc en baja proporción, así mismo la banda de color anaranjado ($R_f = 0.69$) pudiera explicarse por la presencia de algún compuesto de degradación y no propiamente Bc ó Bx como fué reportado previamente por Bilyk (1981).

VII.2 Cromatografía en capa fina de sílica gel.

La comparación de los pigmentos obtenidos en cultivo de callo y de células en suspensión con los que se producen en el tubérculo y los de un pigmento comercial arrojó los siguientes resultados (figura 19):

En el pigmento obtenido del tubérculo de plantas de invernadero (A) se observaron dos bandas; una de color rojo ($R_f = 0.48$) y una de color violeta que corrió con el frente del solvente ($R_f = 1$). En el extracto de callo (C) se observó únicamente la banda roja, y en el extracto de las células en suspensión (D) aparecieron ambas bandas, más una banda amarilla que corrió debajo de la banda violeta ($R_f = 0.95$). A diferencia de los pigmentos obtenidos en este

trabajo, en el pigmento comercial sólo se detectó la banda violeta.

Estos resultados muestran que los cultivos *in vitro* producen los mismos componentes que produce el tubérculo.

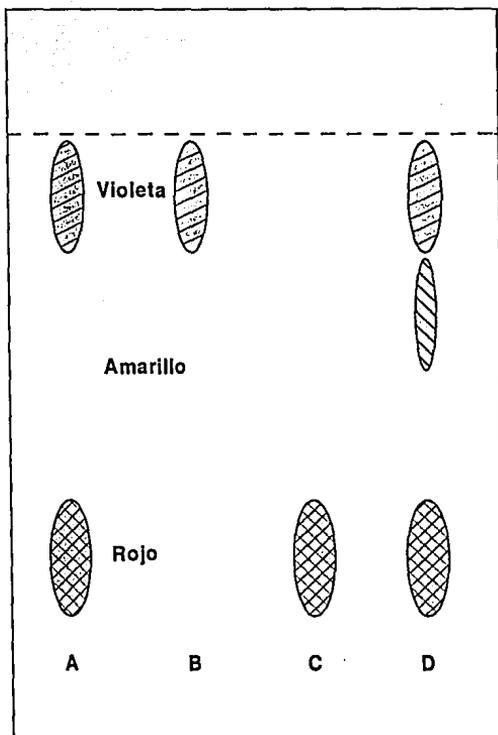


Figura 19. Análisis del pigmento rojo en TLC de silica gel : (A) pigmento de tubérculo,(B) pigmento comercial (C) Pigmento de callo y (D) pigmento de cultivo en suspensión.

VIII. CONCLUSIONES

1) La aplicación de una doble desinfestación de las semillas de *B. vulgaris* fué necesaria para lograr un alto porcentaje de su germinación (90 %).

2) El medio de cultivo B₅ suplementado con 2,4-D 1 mg/l y con cinetina 0.1 mg/l fué un medio efectivo para la inducción de callo. El medio de mantenimiento fué similar excepto por la reducción de 2,4-D a 0.02 mg/l.

3) La productividad de callo fué de 225.3 mgBl/gPs/d, con un td celular de 8.35 días y una relación Bc/Bx de 0.6 .

4) Visualmente se identificaron y después se aislaron líneas celulares de *B. vulgaris* con los siguientes fenotipos: rojo, anaranjado, café, verde, amarillo y blanco; los más estables después de siete meses de subcultivo fueron el rojo y el anaranjado. Periódicamente se tuvieron que hacer nuevas selecciones en las líneas celulares para conservarlas.

5) Para las de células anaranjadas en suspensión con cinetina 0.10 y 0.01 mg/l la productividad fué de 0.2 y de 0.46 mgBl/gPs/d, con un td celular y una relación BC/Bx muy similar. En tanto que para las células rojas en suspensión la productividad fué de 0.27 y 1.39 mgBl/gPs/d, con un td celular de 2.1 y de 4.7 días y una relación Bc/Bx de 1.5 y 0.7 respectivamente.

6) En general para los cultivos en suspensión en la concentración con cinetina 0.01 mg/l se obtuvo una mayor

productividad, aunque el mayor crecimiento fué con cinetina 0.10 mg/l. Se observó que el consumo de sacarosa y fosfato fué total y que el amonio se consumió de manera preferencial sobre el nitrato como fuente de nitrógeno.

7) Las cromatografías en capa fina de celulosa y de silica gel confirmaron que los pigmentos que se producen en los cultivos *in vitro* son betalaínas y que los cultivos *in vitro* producen los mismos componentes que el tubérculo.

IX. BIBLIOGRAFIA

Anónimo. 1986. A splash of colour. *Food Flav. Ing.* 8 (7): 23-27.

Bilyk, A. 1981. Thin Layer Chromatographic Separation of Beet Pigments. *J. Food Sci.* 46:298-299.

Böhm, H. and E. Rink. 1988. Betalains. In "Cell culture and somatic cell genetics of plants". Academic Press. New York. 5: 449-463.

Bokern, M. and D. Strack. 1988. Synthesis of hydroxycinnamic acid esters of betacyanins via 1-O-acylglucosides of hydroxycinnamic acids by protein preparation from cell suspension cultures of *Chenopodium rubrum* and petals of *Lampranthus sociorum*. *Planta.* 174: 101-105.

Bokern, M., V. Wray and D. Strack. 1991. Accumulation of phenolic acid conjugates and betacyanins, and changes in the activities of enzymes involved in feruloylglucose metabolism in cell suspension cultures of *Chenopodium rubrum* L. *Planta.* 184: 261-270.

Bokern, M., S. Heuer and D. Strack. 1992. Hydroxycinnamic acid transferases in the biosynthesis of acylated betacyanins: purification and characterization from cell cultures of *Chenopodium rubrum* and occurrence in some other members of the Caryophyllales. *Bot. Acta.* 105: 146-151.

Cerezal, P.M. 1991. Obtención y aplicación del colorante rojo de la remolacha (*Beta vulgaris* L.). Tesis de Candidato a Doctor en ciencias Técnicas. Instituto de investigación para la industria alimentaria. Ciudad de la Habana. Cuba. 78 p.

Cresswell, R., M. Fowler, A. Stafford and G. Stepan-Sarkissian. 1989. Inputs and outputs: primary substrates and secondary metabolism. In: "Primary and secondary metabolism of plant cell cultures II". Wolfgang G. W. Kurz (Eds.). Springer-Verlag Press. New York. pp 14-26.

Drdák, M., M. Vallová, P. Daucík and G. Greif. 1989. Effect of fermentation on the composition of red beet pigments. *Z. Lebensmittel Untersuch Fors.* **188**: 547-550.

Drdák, M., R. C. Altamirano, A. Rajniakova, P. Simko, J. Karovikova and D. Benkovska. 1992. Red beet pigment composition. Effects of fermentation by different strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Food Sci.* **57**(4):935-936.

Duxbury, D. D. 1990. Replacement colors and blends for banned FD and C Red 3 lake. *Food Proc.* **51** (5): 63-70

Eichemberger, M. E. 1951. Sur une mutation survenue dans une culture de tissus de carotte . *C. R. Acad. Sci.* pp 145-239.

Fowler, W. 1983. Commercial applications and economic aspects of mass plant cell culture. In "Plant Biotechnology". Mantell S.H. and H. Smith (Eds.) . Cambridge University Press , U. K. pp 3-37 .

Fowler, W. 1987. Process possibilities for plant-cell cultures . In "Plant and animal cells process possibilities". Weeb C. and F. Mavituna (Eds.). Cambrige University Press. England .

Girod, P.A. and Zryd, J.P. 1991a. Secondary metabolism in cultured red beet (*Beta vulgaris*) cells: differential regulation of betaxanthin and betacyanin biosynthesis. *Plant Cell Tissue Organ Cul.* 25(1): 1-12.

Girod, P.A. and Zryd, J.P. 1991b. Biogenesis of betalains: purification and partial characterization of Dopa 4,5-dioxygenase from *Amanita muscaria*. *Phytochemistry* 30(1): 169-174.

Guillet, E.A., 1991. Color and Food : Importance of food color. In: "Encyclopedia of food science and Technology." Y.H. Hui (Ed.). John Wiley and Sons Press. New York. 1: 452-460.

Hamill, D., A. Parr, J. Robins and J. Rhodes. 1986. Secondary product formation by cultures of *Beta vulgaris* and *Nicotiana rustica* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant cell reports* 5: 111-114.

Huang, A. S. and J. H. Von Elbe. 1985. Kinetics of the degradation and regeneration of betanine. *J. Food Sci.* 50 : 1115-1129.

Heuer, S. and D. Strack. 1992. Synthesis of betanin from betanidin and UDP-glucose by a protein preparation from cell suspension cultures of *Dorotheanthus bellidiformis* (Burm. f.) N.E.Br. *Planta.* 186: 626-628.

Hunter, S.C. and N.J. Kilby. 1990. Betanin production and release in vitro from suspension cultures of *Beta vulgaris*. In: "Methods in molecular biology ". Pollard, J.W. and J.M. Walker, (Eds.). Humana Press. New York. 6: 545-554.

Jacobs, M., I. Negrutiu, R. Dirks and D. Cammaerts. 1987. Selection programmes for isolation and analysis of mutants in plant cell cultures. In "Plant tissue and cell cultures" . R. Alan (Ed.). Liss Inc. pp 243-264.

Jensen, S.R., B. Nielsen and R. Dahlgren. 1989. Use of Chemistry in Plant Classification. Rev Latinoamer. Quím. Suppl 1: 66-89.

Jaramillo, Q. P. 1990. Selección de líneas celulares de *Capsicum annum* y *Capsicum chinense* altamente productoras de capsaicinoides . Tesis de licenciatura . U.N.A.M 167p.

Jiménez, A., G. Dávila, T. Villegas y A. Del Villar 1992. Obtención de las betalaínas, colorantes de interés alimentario por cultivo de células de *Opuntia microdasys* (Lehm.) Pfeiff. Rev. Latinoamer. Quím. 23 (1):5-8.

Komamine, A., M. Sakuta, M. Hirose, H. Hirano, T. Takagi, K. Kakegawa and Y. Ozeki. 1989. Regulation of the metabolism in relation to growth and differentiation. In: "Primary and secondary metabolism of plant cell cultures II". Wolfgang G. and W. Kurz (Ed.). Springer-Verlag Press. New York. pp 49-52

Kornerup, A. and J. H. Wanscher. 1978. Methuen Handbook of colour. Eyre Methuen (Ed.). Cox and Wilman Press. London. 252p.

Knobloch, K., G. Beutnagel and J. Berlin. 1981. Influence of accumulated phosphate on culture growth and formation of cinnamoyl putrescines in medium-induced cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum*. *Planta* 153: 582-585.

Korwek, L. E. 1990. Food biotechnology regulation : Overview and selected Issues. *Food Technol.* 44 (4) : 76-80

Lashley, D. and R.C. Wiley. 1979. A betacyanine decolorizing enzyme found in red Beet tissue. *J. Food Sci.* 44: 1568-1569 .

Leathers, R.R., C. Davin and J.P. Zryd. 1992. Betalain producing cell cultures of *Beta vulgaris* L. var. Bikores monogerm (Red beet). *In vitro cell. Dev. Biol.-Plant* 28: 39-45.

Loyola-Vargas V. and L. Miranda-Ham. 1990. Aspects about the obtention of secondary metabolites from plant tissue culture. En "Obtención de metabolitos secundarios a partir de cultivo de tejidos vegetales y sus perspectivas biotecnológicas." Ed. Loyola- Vargas (Ed.). CICY. Mérida, Yucatán. pp 31-79.

Mabry, T., A. Taylor and B. Turner. 1963. The betacyanins and their distribution. *Phytochemistry* 2: 61-64.

Miller, H. E., H. Rösler, A. Wohlpar, H. Wyler, M. Wilcox, H. Frohofer, T. J. Mabry and A. Dreiding. 1968. *Helv. Chim. Acta* 51: 1470-1474.

Miranda-Ham, L. 1990. Biosynthesis of secondary metabolites in plant cell and tissue cultures. En "Obtención

de metabolitos secundarios a partir de cultivo de tejidos vegetales y sus perspectivas biotecnológicas". Loyola-Vargas (Ed.). CICY. Mérida, Yucatán. pp 80-90.

Misawa, M. 1985. Production of useful plant metabolites. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*. 31 : 59-88 .

Murray, K., Granner K., Mayes A. and Rodwell W. 1988. *Bioquímica de Harper. El manual moderno*. México D.F. 713p

Newsome, L. R. 1990. Natural and synthetic coloring agents. In " Food additives". Branen, A. L. , P.M. Davidson and J. Salmiden (Eds). Marcel Dekker Inc. New York. pp: 327-345.

Nilsson, T. 1970. Studies into the pigments in beet root. *Lantbrukshoegsk. Ann.* 36: 179.

Noonan, J. 1972. Color additives in food. In: "Handbook of food additives". Furia, T.D. (Ed.) C.R.C. Press Inc. Boca Raton, Florida. pp:587-615.

Piatelli, M. and L. Minale. 1964. Pigments of *Centrospermae* II: Distribution of betacyanins. *Phytochemistry* 3 : 547-557.

Piatelli, M. and L. Minale. 1964. Pigments of *Centrospermae* I : Betacyanins from *Phyllocactus hybridus* Hort. and *Opuntia ficus indica* mill. *Phytochemistry* 2:61-64.

Piatelli, M. 1976. Betalains. In "Chemistry and Biochemistry of plant pigments" . Goodwin T. W.(Ed.) 1 : 560-596.

Piatelli, M. 1981. The betalains: structure, biosynthesis and chemical taxonomy . In "The biochemistry of plants : a comprehensive treatise" . Conn E.E. (Ed.). Academic press. New York. 7: 557-575.

Phillipson J.D. 1990. Plants as sources of valuable products. In: "Secondary Products from Plant Tissue Culture". Charlwood B. and Rhodes M. (Eds). Oxford University Press. New york. pp 1-21.

Rink, E. and H. Böhm. 1985. Changed betaxanthin pattern in violet flowers of *Portulaca grandiflora* after the feeding of dopa. *Phytochemistry* 24(7): 1475-1477.

Rhodes, M., R. Robins, A. Parr and J. Hamill. 1987. Secondary product formation in plant cell cultures. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* pp 105s-114s.

Rodríguez, M. 1989. Manipulación del medio de cultivo de células de *Capsicum annum* var *glabriusculum/aviculare* para la producción de capsaicinoides. Tesis de licenciatura. U.N.A.M. 103p.

Rodríguez, M. M., A.R. Jiménez, G.D. Ortiz y A.A. del Villar. 1992. Cultivo en suspensión de células vegetales para la obtención de betalainas. Informe final de proyecto D.E.P.I. Clave del proyecto: 923729.

Saguy, I. , J. Kopelman and S. Mizrahi. 1978. Computer-aided determination of beet pigments. *J. Food Sci* 43 : 124-127 .

Sapers, G.M. and J.S. Hornstein. 1979. Varietal differences in colorant properties and stability of red pigments. *J. Food Sci.* **44**: 1245-1248.

Secretaría de salud. 1988. Reglamento de la ley general de salud en materia de control sanitario de actividades, establecimientos, productos y servicios. Diario oficial de la federación. Tomo CDXII No 11.

Scowcroft, W. and P. J. Larkin. 1988. Somaclonal variation. In "Applications of plant cell and tissue culture". Ciba Foundation Symposium 137 . John Wiley and Sons publication. New York. pp : 21-35.

Spears, K. 1988. Development in food colourings: the natural alternatives. Reprinted from *Trends biotech.* **11** (6): 283-288.

Stafford, A. and M. Fowler. 1983. Effect of carbon and nitrogen growth limitation upon nutrient uptake and metabolism in batch cultures of *Catharantus roseus* (L) G. Don. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **2**: 239-251.

Stafford, A., P. Morris and M. Fowler. 1986. Plant cell biotechnology : a perspective. *Enzyme Microb. Technol.* **18** : 578-586.

Stafford, A. and M. Fowler. 1990. Biotechnology in the food industry. In: "Foods for the '90s ". Birch G.,G. Camperplax and M.G. Lindley (Eds). Elsevier Applied Science. **11**:169-183.

Taya, M., K. Mine, M. Kino-Oka, S. Tone and T. Ichi. 1992. Production and release of pigments by culture of

transformed hairy root of red beet. J. Ferment. Bioeng. 73(1): 31-36.

Teutonico, R. and D. Knor. 1984. Plant tissue culture : food applications and the potencial reduction of nutritional stress factors. Food tecnol. 38 (2) pp 120-127.

Terradas, F. and H. Wyler. 1991. 2,3 and 4,5-Secodopa, the biosynthetic Intermediates generated from L-Dopa by an enzyme system extracted from the fly agaric, *Amanita muscaria* L., and their spontaneous conversion to muscaflavin and betalamic acid, respectively, and betalains. Helv. Chim. Acta. 74: 124-140.

Topete, M., L. G. Torres, E. Ramírez, M. Herrera y E. Galindo. 1991 . Avances en los sistemas de cultivo masivo de células vegetales. Ciencia y desarrollo. 17 (99) : 73-85 .

Trezzini, G.F. and J.P. Zryd. 1990. *Portulaca grandiflora*: a model system for the study of the biochemistry and genetics of betalain synthesis. Acta horticulturae. 280: 581-585.

Trezzini, G.F. and J.P. Zryd. 1991a. Two betalains from *Portulaca grandiflora*. Phytochemistry 6: 1897-1899.

Trezzini, G.F. and J.P. Zryd. 1991b. Characterization of some natural and semi-synthetic betaxanthins. Phytochemistry 6: 1901-1903.

Villegas, R.L., F.G Hernández, I.C. Arroyo y E.S. de Flores. 1983. Estudio de los colorantes del betabel (*Beta vulgaris* L.). Rev. Soc. Quím. Méx. 27 (4):175-183.

Vedpal, S. M. 1982. Genetics and biochemistry of secondary metabolism. In "Advances in applied microbiology" Laskin Allen (Ed). Academic Press. New York 28 : 28-101.

Villegas-Garrido, T., Jiménez-Aparicio A. and Chávez-Moctezuma M. 1992. Efecto de factores fisico-químicos en el cultivo de células de *A. tricolor* en un medio semisólido para la producción de betalainas. Biotecnología 4 (2) : 105-120.

Von Elbe, J. H., I. L. Joung Maing and C. H. Amundson. 1974 . Color estability of betanin. J. Food Sci. 39 : 334-337 .

Von Elbe, J. H. 1977. The Betalaines. In: "Current aspects of food colorants". CRC Press Inc. Boca Raton, Florida. 3:29-39.

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

Widholm, J.M. 1980. Selection of plant cell lines which accumulate certain compounds. In: "Plant tissue culture as a source of biochemicals". Staba E.J. (Ed.). CRC Press Inc. Boca Raton, Florida. pp: 99-113.

Wyler, H., T.J. Mabry and A. S. Dreiding. 1963. Helv. Chim. Acta 46 : 1745-1748

Zenk M. and B. Deus. 1982. Natural products synthesis by plant cell cultures. In "Proceedings 5th International Congress of Plant Tissue and cell Culture. Fujiwara A. (Ed) The japanese association for plant tissue culture, Japan. pp 391-394.

Zryd, J.P., J. Bauer, H. Wyler and P. Lavanchy. 1982. Pigment biosynthesis and precursor metabolism in red beet semi-continuous cell suspension cultures. In : "Proceedings 5th International Congress of Plant Tissue and cell Culture. Fujiwara A. (Ed). The japanesse association for plant tissue culture, Japan. pp: 387-388.