

SELECCION DE UN MEDIO DE CULTIVO ADECUADO PARA PRODUCIR PIGMENTOS AL CULTIVAR RAICES NORMALES DE BETABEL (*Beta vulgaris*)

T.L.Q. Ma. M. Alvarado Durón¹, I.B.Q. Juan Jáuregui Rincón²,
M.C. Eugenio Pérez Molphe B.³ y Dr. Edmundo Lozoya Gloria⁴
Programa de Investigaciones Biológicas

34

RESUMEN

En los estudios correspondientes a seleccionar un medio de cultivo adecuado para cultivar IN VITRO raíces de *Beta vulgaris* empleando un medio líquido contenido en matraces agitados, se cuantificó el incremento de la masa celular y la cantidad de pigmentos que se producen durante dicho cultivo en un periodo de 35 días. El mejor medio encontrado fue el B5 al 75% de sales y con 0.1 mg/lt de ANA (ácido naftalenacético).

INTRODUCCION

En México al igual que en muchos otros países se están empleando colorantes de tipo sintético en la elaboración de alimentos para consumo humano y se ha comprobado que en su mayoría son tóxicas, es por esta razón que desde hace ya varios años el hombre quiere sustituir estas sustancias químicas sintéticas por compuestos naturales. Muchos colores (principalmente el rojo) y sabores de importancia en la industria de alimentos se pueden obtener de plantas, algas, microorganismos y otros. El empleo de plantas para la extracción de pigmentos de origen natural se ha realizado desde hace tiempo, pero con el inconveniente de que en algunos casos los rendimientos son bajos y la producción es dependiente de los cultivos en campo. Una alternativa que se contempla como viable, es el uso de cultivo de células y tejidos vegetales IN VITRO, que permite asegurar una cantidad y calidad más uniforme de los productos, así como tener un control y la capacidad de modificar el medio ambiente.

El cultivo de tejidos vegetales ha sido establecido para numerosas especies vegetales. Se ha empleado cultivo de células en suspensión obtenidas de callo, el cultivo de raíces tanto normales como transformadas en medios líquidos. De los colorantes que se han logrado obtener utilizando este tipo de técnicas se tiene a: benzopiranos (antocianinas, flavones y flavanones), betalaínas (betacianinas y betaxantinas), carotenoides (carotenos y xantofilas), clorofilas y quinonas.

Las betalaínas son una clase de pigmentos que son solubles en agua producidos por plantas y algunos hongos superiores. Este grupo está formado por dos subgrupos: las betacianinas, de color rojo a púrpura y las betaxantinas, de color amarillo anaranja. Estos pigmentos tienen las siguientes propiedades, son sensibles al calor, luz y oxígeno y su uso se

limita a alimentos en un rango corto de pH ácido.

Böhm y Rink (1988) obtuvieron betalaínas de cinco familias de plantas (*Amaranthus*, *Beta*, *Chenopodium*, *Phytolacca* y *Portulacca*) todas producen pigmentos de ambos tipos acumulase en vacuola.

Existen algunos reportes de investigadores que han trabajado en la producción de estos pigmentos, empleando cultivo de células o cultivo de raíces. Los trabajos encontrados en la literatura son:

Alta concentración de betacianinas fue obtenida en el cultivo de células de *Chenopodium rubrum* (Berlin et al., 1986). Este cultivo pudo acumular arriba de un 1% (peso seco) de betacianinas bajo condiciones óptimas de crecimiento añadiendo tirosina al medio de cultivo como precursor. También se encontró la presencia de diferentes betacianinas (amarantina, celociana, betanina y sus correspondientes insoformas) asociadas con dos betaxantinas (vulgaxantina I y vulgaxantina II) fueron también encontradas en *Chenopodium rubrum*.

Otros trabajos realizados con cultivo de *Chenopodium rubrum* (Dörmenburg y Knorr, 1993; 1995) y *Beta vulgaris* (Kilby y Hunter, 1990; 1991), y "hairy roots" de *Beta vulgaris* (Dilorio et al., 1993) emplearon varios procedimientos de permeabilización (por ejemplo, pulsos de campo eléctrico, alta presión, sonicación y tratamiento térmico), encontrando que en raíces adventicias, que fueron inducidas de betabel (*Beta vulgaris* L. cv. *Detroi dark red*) por infección de la planta con *Agrobacterium rhizogenes*, y además cantidades significativas de pigmentos (betaina y vulgaxantina I) al ser cultivadas en matraces agitados.

Taya y colaboradores encontraron que después de un periodo de 35 días de cultivo de raíces transformadas de *Beta vulgaris* L. cv. *Detroi dark red* y un posterior reposo 2 días más del 20% de los pigmentos totales intracelulares

1 Técnica de laboratorio de Ing. Bioquímica del Centro Básico, U.A.A.

2 Profesor- Investigador del Depto. de Ing. Bioquímica del Centro Básico, U.A.A. E-mail jjaureg@dq.uaa.mx

3 Profesor-Investigador del centro Básico, Depto. de Química, U.A.A. E-mail eperexmb@de.uaa.mx

4 Profesor-Investigador del CINVESTAV IPN unidad Irapuato, Gto. E. mail Elozoya@mvaxl.red.cinvestav.mx

acumulados se liberaban al medio de cultivo (Taya et al., 1992).

Misawa y colaboradores obtuvieron un método para el aislamiento de betaina de cultivos de callo y células en suspensión de *Phytolacca* americana. Ellos obtuvieron 32 mg de pigmento crudo por gramo de tejido seco (Maisawa et al., 1973).

En cultivos de células en suspensión de *Amaranthus tricolor* la presencia de cinetina es esencial para la inducción de la síntesis de amarantina e isoamarantina en oscuridad. Adicionalmente se ha observado un efecto sinérgico entre la luz y la alta concentración de cinetina en la producción *IN VITRO* de betacianina (Bianco-Colomas y Hugues, 1990).

Este trabajo tiene por objeto seleccionar entre los medios reportados, un medio adecuado para cultivar raíces normales y poder posteriormente compararlo con los de producción por raíces transformadas.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal. Se utilizaron semillas de *Beta vulgaris* L. cv. *detroi dark red*. Las cuales se seleccionaron por su mayor porcentaje de germinación.

Las semillas empleadas se muestran en la fotografía 1, éstas se esterilizaron empleando el siguiente método: lavado con agua y extran por 24 hrs., tres enjuagues con agua destilada, tratamiento con etanol al 70% por 30 seg., 2 enjuagues con agua destilada estéril, tratamiento con cloralex al 15%.

Las semillas tardan en germinar en un promedio de 10 días ± 2 , y las plántulas se tardan 27 días ± 3 . El tiempo de germinación de las semillas se midió el % de germinación, los resultados se muestran en la tabla 1.

Las semillas una vez esterilizadas, se colocaron en medio MS sin reguladores. Las raíces se cortaron y se pasaron a medios como MS, B5 y White a diferentes concentraciones de sales (100%, 75% y 50%) y empleando como regulador de crecimiento ANA (ácido naftalenacético) 0.1 mg/lit, se cuantificó la masa celular en base al peso seco de las raíces

y el contenido de pigmento en dichas raíces se determinó usando espectrofotómetro visible/UV modelo lamda 1, previamente se separaron las betacianinas y betaxantinas por medio de cromatografía de intercambio iónico.

En la figura 1 se muestra un diagrama de flujo de la metodología empleada.

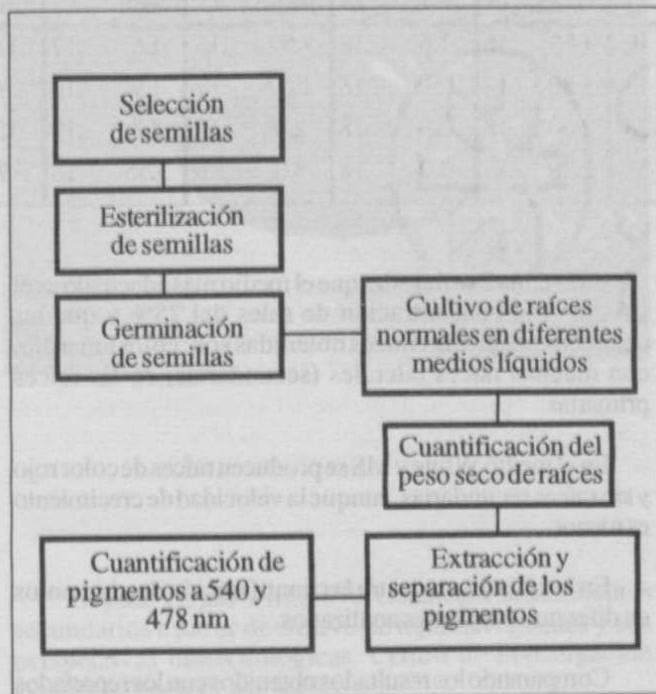


FIG. 1 Diagrama de flujo de la metodología empleada

RESULTADOS Y DISCUSION

Las plántulas obtenidas se muestran en la fotografía 2, de las plántulas obtenidas se cortan las raíces y se pasan 3-4 segmentos de 2 a 3 cm de longitud (previamente pesados) que incluya la parte apical a matraces erlenmeyer de 100 ml con 50 ml de cada uno de los diferentes medios a las distintas concentraciones de sales (100%, 75% y 50%), en la fotografía 3 se muestran el cultivo de raíces en un matraz agitado. Los resultados se muestran en la tabla 2.

TABLA 1. % de germinación encontrado en las semillas de Betabel utilizadas.

| Variedad de semilla | Tiempo de germinación días | % de germinación |
|--|--------------------------------------|------------------|
| <i>Beta vulgaris</i> cv. <i>detroi dark red</i> | 10 ^a \pm 2 ^b | 80 |
| <i>Beta vulgaris</i> cv. <i>croby's egyptian</i> | 10 \pm 4 | 50 |
| <i>Beta vulgaris</i> cv. <i>cardenal</i> | 11 \pm 3 | 25 |

^aMedia, ^bdesviación standar a partir de 20 replicas.

TABLA 2. Datos cinéticos del cultivo de raíces en diferentes medios de cultivo

Peso seco de raíces de Beta vulgaris (g.) en diferentes medios de cultivo

| Tiempo (días) | medio de cultivo | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------|------------------|-----|-------|-----|-------|-----|-------|-----|-------|-----|-------|-----|-------|-----|-------|-----|-------|-----|
| | MS | | | | | | B5 | | | | | | White | | | | | |
| | 100% | | 75% | | 50% | | 100% | | 75% | | 50% | | 100% | | 75% | | 50% | |
| | media | σ | media | σ | media | σ | media | σ | media | σ | media | σ | media | σ | media | σ | media | σ |
| 10 | 1.53 | .16 | 1.6 | .18 | 1.57 | .15 | 1.5 | .17 | 1.6 | .14 | 1.45 | .17 | 1.45 | .15 | 1.43 | .10 | 1.40 | .16 |
| 18 | 1.80 | .14 | 1.95 | .18 | 1.69 | .17 | 1.9 | .16 | 3.0 | .13 | 1.9 | .20 | 1.9 | .16 | 1.87 | .13 | 1.85 | .15 |
| 28 | 2.60 | .18 | 2.9 | .18 | 2.4 | .18 | 2.8 | .19 | 3.7 | .19 | 2.8 | .14 | 2.8 | .20 | 2.8 | .12 | 2.6 | .21 |
| 35 | 2.30 | .19 | 3.9 | .18 | 3.0 | .16 | 3.55 | .18 | 4.25 | .17 | 3.6 | .16 | 3.6 | .14 | 3.7 | .19 | 3.45 | .13 |

En la tabla 2 se muestra que el medio más adecuado es el B5 con una concentración de sales del 75% y que las características de las raíces obtenidas son: color amarillo, con muchas raíces laterales (secundarias) en las raíces primarias.

En el medio White y MS se producen raíces de color rojo y sin raíces secundarias, aunque la velocidad de crecimiento es menor.

En la tabla 3 se muestra la cuantificación de pigmentos en diferentes explantes analizados.

Comparando los resultados obtenidos con los reportados en la literatura para raíces transformadas, observamos que es menor tanto la cantidad de masa celular de raíces como la cantidad de pigmento producido. Con respecto a la contenida en raíz de la planta in vivo se puede ver que los valores son muy similares.

CONCLUSIONES

1.- Se obtuvo un sistema para cultivo de raíces normales, el cual muestra el comportamiento cinético de crecimiento de las raíces.

2.- Se cuantificó y se comparó la producción de pigmentos, comprobándose que el sistema de raíces transformadas es más productivo.

3.- Se logró la liberación del pigmento al medio, empleando el método de aplicar reposo por 24 horas después de la agitación y las raíces al sembrarse en medio nuevo, continúan creciendo y produciendo pigmento.

4.- El mejor medio encontrado fue el B5 con un contenido de sales del 75% y con 0.1 mg/lit de ANA (ac. naftalénico).

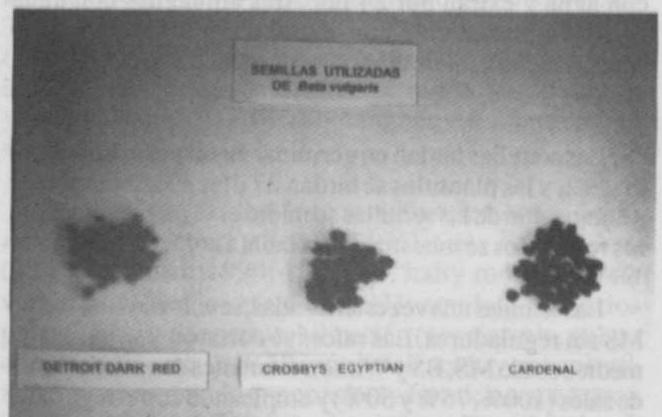
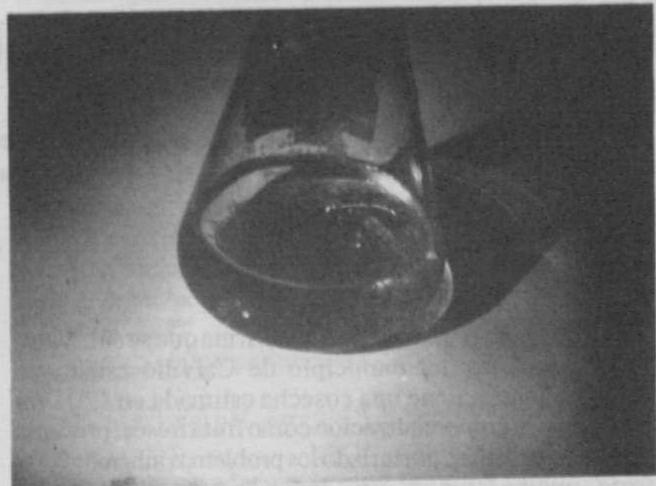


TABLA 3. Cuantificación de las betacianinas (540 nm) y betaxantinas (478 nm) en diferentes explantes

| EXPLANTE ANALIZADO | CANTIDAD DE PIGMENTO obtenido mg/g de raíz seca | |
|----------------------|---|--------------------------------------|
| | 540 nm | 478 nm |
| Betabel (raíz) | 5.5 ^a ± 0.25 ^b | 2.9 ^a ± 0.25 ^b |
| Hojas | 4.4 ± 0.20 | 3.8 ± 0.15 |
| Tallo | 6.3 ± 0.17 | 3.5 ± 0.18 |
| Raíces normales | 4.1 ± 0.21 | 2.9 ± 0.17 |
| Raíces transformadas | 2.9-6.4 ± 0.19 | 5.2-10.1 ± 0.15 |

^aMedia ^bdesviación standard N igual a 10



BIBLIOGRAFIA

* Bilik, A. 1979. Extractive fractionation of betalains. *J. Food sci.* 49 1249-1257.

* Strack, D., Engel, U. and Reznik, H. 1981. High performance liquid chromatography of betalains and its application to analysis in Aizoaceae and Cactaceae. *Z. pflanzenphysiol* Bd. 101:215-222.

* Elizarraraz-Rivera Ma. G., 1994. Evaluación comparativa de la síntesis de afina en *spilantes oppositifolia* en cultivo de raíces normales y transformadas con *A. Rhizogenes*. Tesis profesional. Licenciatura en Análisis Químico-Biológicos. Universidad Autónoma de Aguascalientes.

* Hamill J.D. Parr A. J. Rhodes M.J.C., Robins, R.J. and Ealton N.J., 1986. Secondary product formation by cultures of *Beta vulgaris* and *Nicotina rustica* transformed with *A. Rhizogenes*. *Plant cell reports*, 5: pp 111-114.

* Berlin, J., Sieg, S., Strack, D., Bokern, M. and Harms, H., 1986. Production of betalains by suspension cultures of *Chenopodium rubrum* (L.) *Plant cell tissue organ culture* 5: 163-174.

* Loyola Vargas V.M. and E. Flores Héctor, 1990. Root culture as a source of secondary metabolites of economic importance.

* Loyola-Vargas V.M., 1990. Obtención de metabolitos secundarios a partir de cultivo de tejidos vegetales y sus perspectivas biotecnológicas. Centro de investigación científica, Yucatán. pp. 80-90.

* Masahitotaya, Koji, M., Kino-Oka, M., Tonr, S. and Ichi, T., 1992. Production and release of pigments by culture of transformed hairy root of red beet. *Journal of fermentation and bioengineering* Vol. 73, No. 1, 31-36.

* Villegas-Garrido T.L., Jiménez-Aparicio A. y Chávez-Moctezuma M.P. 1992. Efectos de los factores fisicoquímicos en el cultivo de células de *A. tricolor* en un medio semisólido para la producción de betaínas. *Biotecnología*, Vol. 2 No. 4.

Trabajos presentados en Congresos relacionados con este proyecto.

VII Congreso Nacional de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas y el Primer Simposium México-Estados Unidos sobre Agrobiología, Fisiología Molecular y Biotecnología de Cultivos Importantes para la Agricultura Mexicana, en noviembre de 1995 en la ciudad de Cocoyac, Mor.

III Congreso Nacional de Biotecnología Agropecuaria y Forestal, celebrado en octubre de 1996 en Chihuahua, Chih.