

ESTUDIO DE LA PRODUCCION DE BETALAINAS EN CULTIVOS IN VITRO DE CACTACEAS DEL GENERO *Mammillaria*.

LAQB Leticia del Rocío Morones Ruiz¹, Pas. Biól. Axel Flores Serna¹, TLQ Martha Evelia Pérez Reyes¹,
IBQ Hugo J. Lizalde Viramontes², MC Eugenio Pérez Molphe Balch³
Programa de Investigaciones Biológicas

INTRODUCCION

Una buena parte de los compuestos químicos que utiliza el hombre en su vida diaria son obtenidos a partir de las plantas, tanto silvestres como cultivadas. Entre estos compuestos encontramos a los utilizados como medicamentos, cosméticos, esencias aromáticas, saborizantes y colorantes. Por lo que respecta a los colorantes de origen vegetal, éstos se han venido utilizando desde los orígenes de la civilización y fue hasta el presente siglo cuando comenzaron a ser substituidos casi en su totalidad por compuestos químicos sintéticos que resultaban más baratos y ofrecían algunas otras ventajas, como por ejemplo una mayor estabilidad. Sin embargo, recientemente se ha descubierto que muchos de estos colorantes sintéticos utilizados en la industria de los alimentos, pueden resultar muy peligrosos para la salud, debido a su toxicidad. En ese punto sobresalen aquellos pigmentos sintéticos que imparten el color rojo, la mayoría de los cuales han sido prohibidos por considerarse tóxicos para el ser humano (Korwek, 1990). Debido a lo anterior ha renacido el interés por los pigmentos de origen natural, sobre todo aquellos de color rojo que no resultan tóxicos y podrían substituir a los sintéticos. Entre los pigmentos naturales de color rojo destacan las betalainas, que son un grupo de compuestos hidrosolubles producidos por algunas familias de plantas pertenecientes al orden Centrospermae, como las Cactáceas, Quenopodiaceas y Amarantaceas. Dentro del grupo de las betalainas hay pigmentos con tonalidades desde el rojo hasta el violeta (betacianinas) y desde el amarillo hasta el naranja (betaxantinas) que tienen un uso potencial muy prometedor en la industria de los alimentos (Marby 1980). Por otro lado, es bien sabido que en nuestro país existe una gran riqueza en especies vegetales, sobre todo en lo que se refiere a la familia de las cactáceas. Dentro de esta familia se encuentra el género *Mammillaria*, ampliamente distribuido por la mayoría de las zonas áridas y semiáridas de México, el cual presenta entre sus características frutos pequeños de color rojo intenso debido a la alta concentración de betalainas presentes en ellos. Por desgracia los frutos en estas especies son muy pequeños y se presentan sólo una vez al año en pequeña cantidad, por lo que resultaría incosteable utilizarlos como fuente para la producción comercial de estos pigmentos. Sin embargo, recientemente la Biotecnología Vegetal nos ha dado la posibilidad de producir compuestos de interés en

células o tejidos cultivados in vitro bajo condiciones artificiales y controladas por medio de la técnica conocida como Cultivo de Tejidos Vegetales. Básicamente la producción de compuestos puede hacerse en cultivos de tejido caloso (tejidos indiferenciado cultivados en un medio sólido que contenga reguladores del crecimiento del grupo de las auxinas), cultivos de células en suspensión (células individuales cultivadas en un medio líquido agitado) o cultivos de raíces. El objetivo de la presente investigación fue estudiar la producción in vitro de betalainas bajo diferentes sistemas de cultivo en tejidos de cactáceas del género *Mammillaria*, así como estudiar la posibilidad de incrementar dicha producción mediante la adición de compuestos orgánicos al medio de cultivo y la selección de líneas celulares altamente productoras de pigmentos.

Revisión de literatura:

Recientemente se ha publicado un número importante de trabajos acerca de la producción in vitro de compuestos vegetales, muchos de ellos orientados precisamente a la producción de pigmentos y saborizantes útiles en la industria de los alimentos (Dörnenburg y Knorr 1996). Por lo que respecta a las betalainas, existen algunos trabajos publicados en los cuales se ha estudiado su producción in vitro en cultivos de células en suspensión de *Chaenopodium rubrum* (Berlin y col. 1986), tejido caloso de *Amaranthus tricolor* (Villegas-Garrido y col. 1992) y raíces de *Beta vulgaris* (Dilorio y col. 1993) entre otros. Por lo que respecta a las cactáceas, no hay antecedentes a nivel internacional sobre estudios de la producción in vitro de betalainas en este grupo de plantas.

Materiales y métodos:

Material vegetal. Se trabajó con cultivos in vitro de las especies *M. formosa*, *M. craigii*, *M. obscura* y *M. uncinata*. El material para iniciar estos cultivos se tomó del banco de germoplasma in vitro de cactáceas existente en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Depto. de Química (ver

- 1 Técnicas del laboratorio de Química del Centro Básico, UAA.
- 2 Profesor-Investigador y Decano del Centro Básico, UAA.
Email: hlizalde@dc.uaa.mx
- 3 Profesor-Investigador del Centro Básico, UAA. Depto. de Química
Email: eperezmb@dg.uaa.mx

ESPECIE	Betaxantinas (abs. a 480 nm)		Betacianinas (abs. a 535 nm)	
	FRUTO	TEJ. CALLOSO	FRUTO	TEJ. CALLOSO
<i>M. craigii</i>	0.51 ± 0.10	0.19 ± 0.07	1.10 ± 0.40	0.13 ± 0.08
<i>M. formosa</i>	0.39 ± 0.04	0.38 ± 0.06	0.86 ± 0.10	0.21 ± 0.04
<i>M. obscura</i>	0.42 ± 0.07	0.33 ± 0.05	0.92 ± 0.16	0.28 ± 0.03
<i>M. uncinata</i>	0.62 ± 0.12	0.20 ± 0.07	1.21 ± 0.34	0.31 ± 0.08

Tabla 1. Contenido relativo de betalaínas determinado por espectrofotometría en fruto y tejido calloso de las especies *Mammillaria craigii*, *M. formosa*, *M. obscura* y *M. uncinata*.

COMPLEJO ORGANICO	FRACCION	<i>M. craigii</i>	<i>M. formosa</i>	<i>M. obscura</i>	<i>M. uncinata</i>
Malta	Betaxantinas	80	103	167	31
	Betacianinas	62	78	267	29
Levadura	Betaxantinas	98	168	201	130
	Betacianinas	76	222	233	73
Plátano	Betaxantinas	66	123	117	269
	Betacianinas	124	111	160	176
Caseína	Betaxantinas	142	143	ND	ND
	Betacianinas	108	130	ND	ND
Peptona	Betaxantinas	190	57	ND	ND
	Betacianinas	166	45	ND	430
Tirosina	Betaxantinas	103	132	ND	ND
	Betacianinas	98	160	ND	ND

Tabla 2. Efecto de la adición de complejos orgánicos al medio de cultivo en el contenido relativo de betalaínas en tejido calloso de las especies *Mammillaria craigii*, *M. formosa*, *M. obscura* y *M. uncinata*. Las betaxantinas se determinaron midiendo absorbancia máxima a 480 nm, mientras que las betacianinas se midieron a 535 nm. Los resultados se expresan como porcentaje del control cultivado sin complejos orgánicos (control=100%).

ND= No determinado por necrosis del tejido.

Investigación y Ciencia 15:36-43). Los frutos de estas especies que se utilizaron para el análisis de betalaínas fueron colectados en el Jardín Botánico "Rey Nezahualcóyotl" de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Inducción y mantenimiento de tejido calloso: Se realizaron experimentos tendientes a encontrar el medio de cultivo más adecuado para la producción y mantenimiento de tejido calloso en las especies trabajadas, para esto se utilizó el medio de Murashige y Skoog (MS) a pH 5.7 y

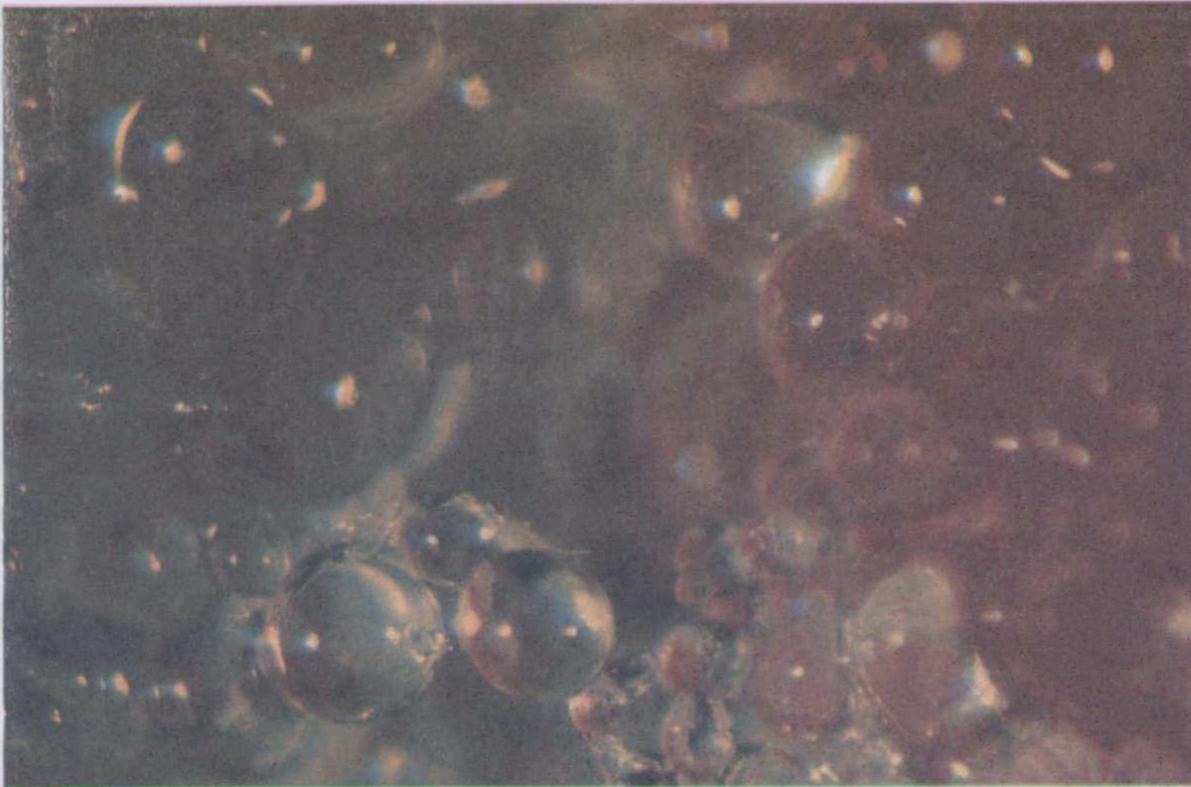


Figura 1. Microfotografía (100X) de un segmento de tejido calloso cultivado in vitro de *M. uncinata*. Nótese la producción y acumulación de pigmentos en algunas de sus células.

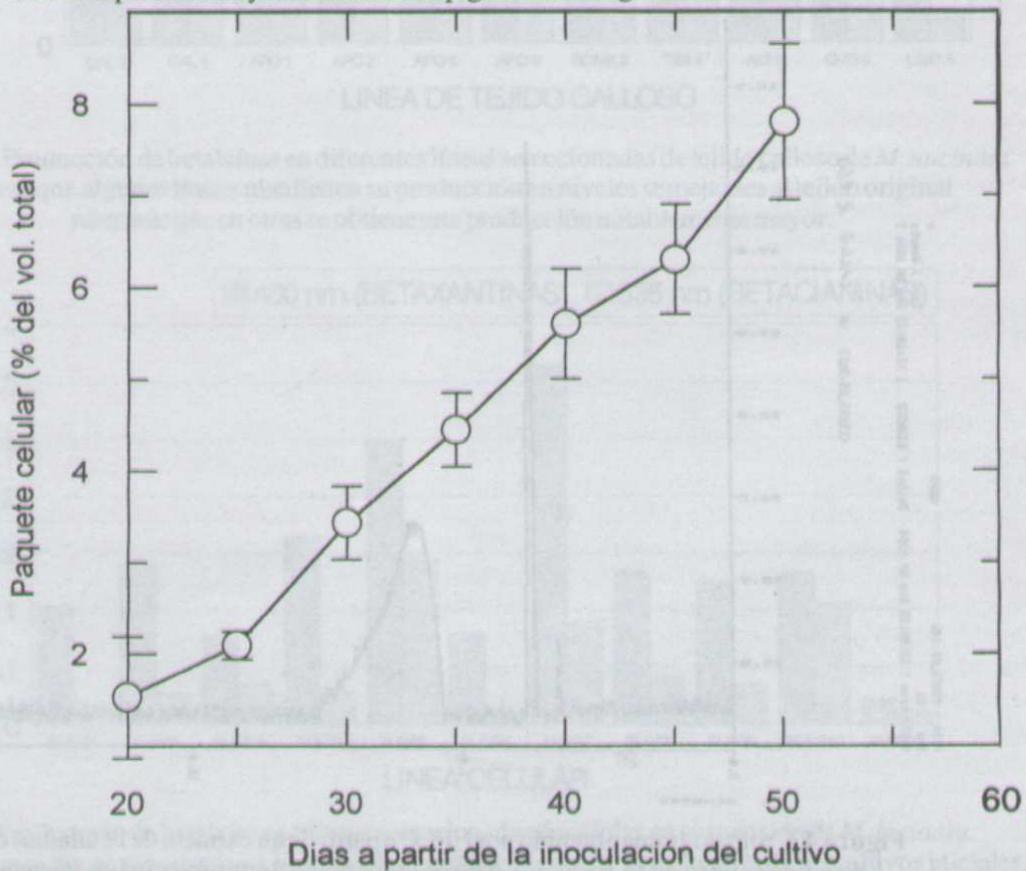


Figura 2. Curva de crecimiento de los cultivos de células en suspensión de *M. uncinata*.



Figura 3. Cultivos de células en suspensión de *M. uncinata*. Nótese la producción de pigmentos en uno de los cultivos.

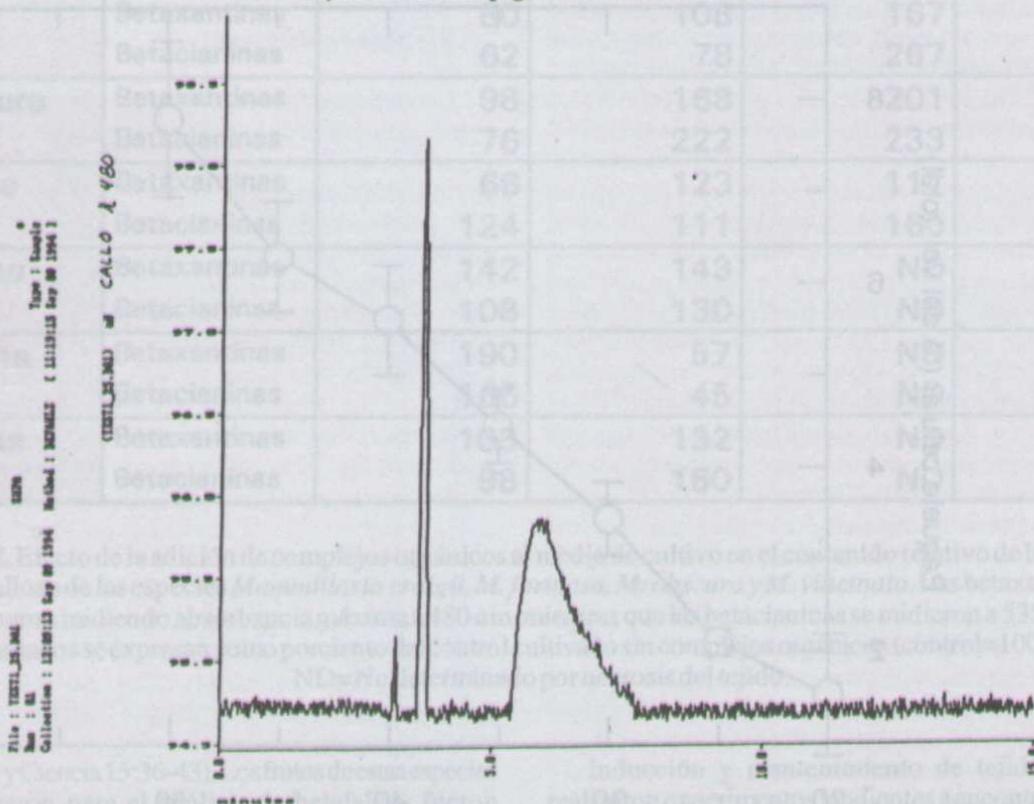


Figura 4. Cromatograma obtenido por HPLC a partir de un extracto de betalaínas obtenido de tejido caloso de *M. uncinata*. Nótese la aparición de dos fracciones, mismas que se obtienen también al analizar extractos de fruto y de células en suspensión de esta especie.

gelificado con 3 g/l de Phytigel y se probaron tres auxinas (ac. indolacético o AIA, ac. indolbutírico o AIB y ac. 2,4-diclorofenoxiacético o 2,4-D) en tres niveles diferentes (0,1, 1.0 y 2.0 mg/l). Una vez seleccionada la auxina más adecuada, se probó el efecto de la adición de una citocinina (cinetina 1 mg/ml). El parámetro para determinar los mejores tratamientos fue el crecimiento de tejido caloso a partir de los segmentos de tejido vegetal inoculado. Una vez seleccionado el mejor medio, el tejido caloso se mantuvo subcultivándolo cada 30-40 días.

Estudio del efecto de la adición de complejos orgánicos al medio de cultivo en la producción de betalaínas: Se

subcultivaron segmentos de tejido caloso a medios de cultivo similares al mencionado, pero enriquecidos con los siguientes complejos orgánicos: Extracto de malta (5 g/l), extracto de levadura (5 g/l), polvo de plátano (5 g/l), hidrolizado de caseína (5 g/l), peptona (5 g/l) y tirosina (50 mg/l). A los 20 días de incubación del tejido se realizó la extracción y análisis de betalaínas.

Inducción y mantenimiento de cultivos de células en suspensión: Para este punto se partió de tejido caloso, del cual se tomaron pequeños fragmentos que fueron transferidos a un medio líquido (MS con 2 mg/l de 2,4-D y 1 mg/l de CIN) y se incubaron bajo agitación continua (80 rpm). El medio



Figura 5. Producción de betalaínas en diferentes líneas seleccionadas de tejido caloso de *M. uncinata*. Nótese que algunas líneas mantienen su producción en niveles semejantes al tejido original mientras que en otras se obtiene una producción notablemente mayor.

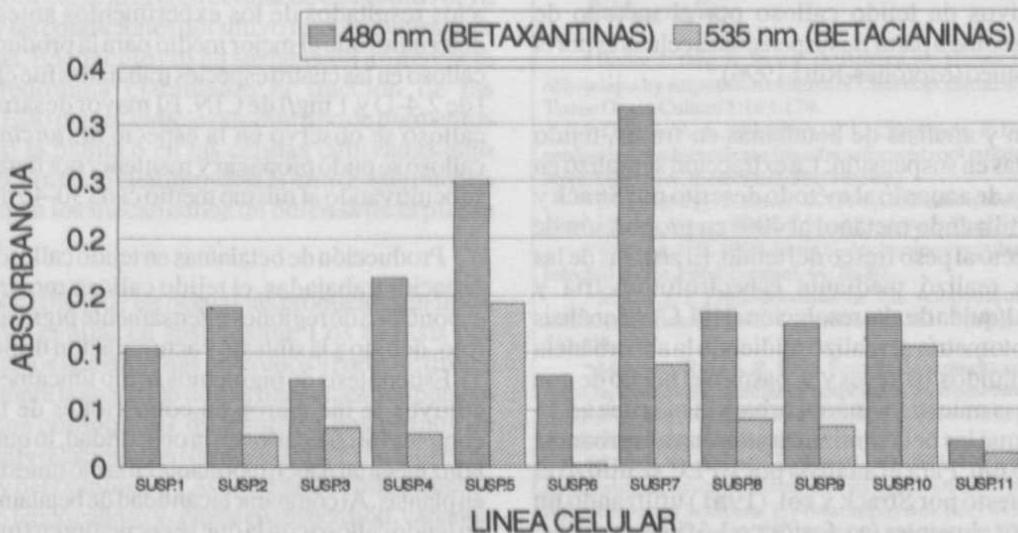


Figura 6. Producción de betalaínas en líneas seleccionadas de células en suspensión de *M. incinata*. Nótese que algunas líneas muestran una producción considerablemente mayor que la de los cultivos iniciales, además de que en todos los casos predomina la fracción de las betaxantinas.



Figura 7. Líneas seleccionadas a partir de cultivos en suspensión de *M. uncinata*. Nótese la alta producción de pigmentos.

fue renovado cada 15-22 días. Se elaboró una curva de crecimiento por el método de medición del paquete celular (Morones-Ruiz 1996). Estos cultivos se realizaron únicamente con la especie *M. uncinata*.

Selección de líneas celulares de *M. uncinata* altamente productoras de betalaínas: La selección se realizó partiendo tanto de cultivos de tejido calloso por el método de fragmentación como a partir de suspensiones celulares por el método de plaqueo (Morones-Ruiz 1996).

Extracción y análisis de betalaínas en frutos, tejido calloso y células en suspensión: La extracción se realizó en todos los casos de acuerdo al método descrito por Strack y col. (1981), utilizando metanol al 40% en proporción de 10:1 con respecto al peso fresco del tejido. El análisis de las betalaínas se realizó mediante espectrofotometría y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El análisis por espectrofotometría se realizó midiendo la absorbancia de extractos diluidos 10 veces y se basó en el hecho de que las betacianinas muestran una absorbancia máxima a 535 nm, mientras que las betaxantinas tienen una absorbancia máxima a 480 nm. Para el análisis por HPLC se utilizó el método propuesto por Strack y col. (1981) utilizando un gradiente de dos eluyentes (ac. fosfórico 1.5% en agua y ac. fosfórico, ac. acético, acetonitrilo y agua en proporciones 1.5:20:25:53.5). Se utilizó una columna LiChrosorb RP-8 y la detección se realizó midiendo la absorbancia a 480 y 535

nm. El análisis de betalaínas se realizó en fruto y tejido calloso de las cuatro especies trabajadas así como en células en suspensión y líneas seleccionadas de *M. uncinata*.

Resultados y discusiones:

Inducción y mantenimiento de tejido calloso: De acuerdo a los resultados de los experimentos antes descritos, se determinó que el mejor medio para la producción de tejido calloso en las cuatro especies trabajadas fue el MS con 2 mg/l de 2,4-D y 1 mg/l de CIN. El mayor desarrollo del tejido calloso se observó en la especie *M. uncinata*. El tejido calloso se pudo propagar y mantener por tiempo indefinido subcultivando al mismo medio cada 30-40 días.

Producción de betalaínas en tejido calloso: En las cuatro especies trabajadas, el tejido calloso mostró la aparición espontánea de regiones intensamente pigmentadas de color rojo, debido a la síntesis y acumulación de betalaínas (Fig. 1). Esta síntesis de pigmentos se dio únicamente cuando los cultivos se incubaron en condiciones de luz y cesó por completo al colocarlos en la oscuridad, lo que confirma que la luz juega un papel importante en la biosíntesis de pigmentos en plantas. Al comparar la cantidad de betalaínas sintetizadas en tejido calloso con la que se encuentra en fruto, se encontró que ésta suele ser menor, esto quizá se deba a que en el fruto todas las células sintetizan y/o acumulan betalaínas, mientras que en el tejido calloso se observa que son sólo algunas

regiones del mismo las que muestran acumulación de pigmentos. Por otro lado, mientras que en el fruto de las cuatro especies estudiadas predomina claramente la fracción de las betacianinas, en el tejido caloso se presenta en algunas especies también la fracción de las betaxantinas, llegando incluso a predominar en algunas de ellas (Tabla 1), lo cual indica que las condiciones de cultivo in vitro alteran en cierta medida los patrones de biosíntesis de estos compuestos.

Estudio del efecto de la adición de complejos orgánicos al medio de cultivo en la producción de betalaínas: La respuesta de las cuatro especies a la adición de complejos orgánicos al medio de cultivo fue muy variable. Algunos de los complejos probados parecieron estimular la producción de betalaínas, mientras que otros mostraron efectos inhibitorios sobre la misma (Tabla 2). Se probaron complejos ricos en aminoácidos así como tirosina debido a que esta última es precursor directo de la biosíntesis de betalaínas.

Inducción y mantenimiento de cultivo de células en suspensión y análisis de la producción de betalaínas en los mismos: Con base en los resultados obtenidos en los puntos antes citados, esta parte del proyecto se realizó únicamente con la especie *M. uncinata*, por ser la que dio una mejor respuesta tanto por su crecimiento in vitro como por su producción de betalaínas. Se obtuvieron cultivos en suspensión, los cuales estaban formados por células individuales y en mayor medida por pequeños acúmulos celulares. De acuerdo a los resultados obtenidos en la curva de crecimiento (Fig. 2), las células continuaban multiplicándose hasta los 50 días después de haber sido iniciado el cultivo. Aproximadamente a los 10 días después de cada subcultivo puede apreciarse en algunas líneas la acumulación de pigmentos, mientras que otras permanecen durante casi todo su período de desarrollo sin producir betalaínas (Fig. 3). Lo anterior puede deberse al origen celular de cada cultivo, ya que el medio y las condiciones de cultivo fueron iguales para todas las líneas. En los cultivos en suspensión a diferencia del fruto, predomina claramente la fracción de las betaxantinas. Esto parece indicar que este tipo de pigmentos se sintetiza en la planta o en las células cultivadas bajo condiciones de estrés, lo cual apoyaría la idea de que pueden tener un papel en los mecanismos de defensa de la planta (Marby 1980).

Análisis por HPLC de las betalaínas producidas en fruto, tejido caloso y células en suspensión: Los análisis por HPLC de extractos de betalaínas obtenidos a partir de frutos, mostraron siempre la aparición de dos fracciones que pueden representar dos compuestos diferentes o dos grupos de compuestos muy relacionados (probablemente fracciones de betacianinas y betaxantinas). Las mismas dos fracciones se encontraron en tejido caloso y células en suspensión, variando únicamente la abundancia relativa de cada una de ellas. La Fig. 4 muestra un cromatograma representativo del análisis de betalaínas en tejido caloso *M. uncinata* por HPLC. El hecho de que se presenten siempre las mismas dos fracciones

es importante, ya que indica que el cultivo in vitro no produce cambios cualitativos, aunque sí cuantitativos, en los pigmentos producidos en esta especie.

Selección de líneas celulares de *M. uncinata* altamente productoras de betalaínas: En tejido caloso se realizó una selección por fragmentación, tomando y subcultivando por varios ciclos aquellos fragmentos de tejido que mostraron una mayor acumulación de pigmentos. Después de 6 ciclos de selección se obtuvieron líneas de tejido caloso que mostraron una producción de betalaínas considerablemente mayor al tejido original (Fig. 5). Por lo que respecta a la selección por plaqueo a partir de suspensiones celulares, se logró también generar líneas con una producción mayor que los cultivos originales (Fig. 6), sin embargo este proceso resultó considerablemente más lento que la selección a partir de tejido caloso. Con estos resultados se demuestra que es posible, mediante selección incrementar la producción in vitro de pigmentos a partir de cultivos de *M. uncinata*. La Fig. 7 muestra dos de las líneas seleccionadas por su alta producción de betalaínas.

Conclusiones:

1. Se demostró que es posible producir in vitro pigmentos del grupo de las betalaínas cultivando tejido caloso o células en suspensión de cactáceas del género *Mammillaria*. Este sistema podría ser considerado en un futuro como una fuente alternativa de estos compuestos para la industria de los alimentos.

2. Se demostró que es posible incrementar en cierta medida la producción in vitro de betalaínas en los sistemas mencionados mediante la adición de complementos nutritivos al medio de cultivo o bien mediante la selección de líneas celulares altamente productoras.

Bibliografía:

- * Berlin, J., Sieg, S., Strack, D., Bokern, M., Harms, H. 1986. Production of betalains by suspension cultures of *Chaenopodium rubrum* (L.). *Plant Cell Tissue Organ Culture* 5:163-174.
- * Dilorio, A.A., Weathers, P.J., Cheetham, R.D. 1993. Non-lethal secondary product release from transformed root cultures of *Beta vulgaris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39:174-180.
- * Dörnenburg, H., Knorr, D. 1996. Generation of colors and flavors in plant cell and tissue cultures. *Critical Reviews in Plant Sciences* 15:141-168.
- * Korwek, L.E. 1990. Food biotechnology regulation: Overview and selected issues. *Food Technol.* 44:76-80.
- * Marby, J. T. 1980. Betalains. In "Encyclopedia of Plant Physiology" Vol. 8. (eds) Pirson, A. and Zimmermann, M.H. Springer-Verlag, Berlin. p. 513-534.
- * Morones-Ruiz, L.R. 1996. Estudio de la producción de betalaínas en fruto, tejido caloso y células en suspensión de *Mammillaria uncinata*. Tesis Profesional. Licenciatura en Análisis Químico-Biológicos. Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- * Strack, D., Engel, U., Reznik, H. 1981. High performance liquid chromatography of betalains and its application to pigment analysis in Aizoaceae and Cactaceae. *Z. Pflanzenphysiol.* Bd. 101:215-222.
- * Villegas-Garrido, T.L., Jiménez-Aparicio, A., Chávez-Moctezuma, M.P. 1992. Efecto de factores fisicoquímicos en el cultivo de células de *A. tricolor* en un medio semisólido para la producción de betalaínas. *Biociencia* 2:105-120.