

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias e Ingeniería

Producción de antocianinas por medio de la elicitación con metil jasmonato, deficiencia de fósforo y exceso de sacarosa *in vitro* e *in vivo* en maíz blanco y maíz morado (*Zea mays L.*)

Stephani León Cisneros

Ana Isabel Quirola Garcés

Antonio León, Ph.D., Director de Tesis

Lucía Ramírez, Ph.D., CoDirector de Tesis

Tesis de grado presentada como requisito
para la obtención del título de Ingeniera en Alimentos

Quito, mayo de 2014

Universidad San Francisco de Quito

Colegio de Ciencias e Ingeniería

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

Producción de antocianinas por medio de la elicitación con metil jasmonato, deficiencia de fósforo y exceso de sacarosa in vitro e in vivo en maíz blanco y maíz morado (*Zea mays L.*)

Stephani León Cisneros

Ana Isabel Quirola Garcés

Antonio León, Ph.D.
Director de la tesis

Lucía Ramírez, Ph.D.
CoDirector de la Tesis

Javier Garrido, MSc.
Coordinador de Ingeniería en Alimentos

Stalin Santacruz, Ph.D.
Miembro del Comité de Tesis

Francisco Carvajal, Ph.D.
Miembro del Comité de Tesis

Ximena Córdova Vallejo, Ph.D.
Decana de la Escuela de Ingeniería
Colegio de Ciencias e Ingeniería

Quito, mayo de 2014

© Derechos de autor

Por medio del presente documento certifico que he leído la Política de Propiedad Intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la Política.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma: _____

Firma: _____

Nombre: Stephani León Cisneros

Nombre: Ana Isabel Quirola Garcés

C. I.: 1718134941

C. I.: 1715527527

Fecha: Quito, mayo de 2014

Fecha: Quito, mayo de 2014

Dedicatoria

Dedicamos este proyecto a nuestra familia que nos ha dado el apoyo y la guía necesaria para culminar este reto tan grande.

A nuestra amistad que a pesar de todos los momentos duros logró mantenernos juntas en este desafío y lograr nuestras metas.

A nuestros profesores y amigos Antonio León y Lucía Ramírez por nunca dejarnos vencer y empujarnos hasta el último día, gracias por su tiempo y consideración.

Agradecimientos

A nuestros familiares que nos han dado su apoyo, comprensión y las fuerzas para lograr este proyecto.

También queremos agradecer a nuestros profesores Antonio León, Lucía Ramírez y Mario Caviedes por su constante consejo y guía para la elaboración de esta investigación.

Por último, agradecer a nuestros compañeros de laboratorio especialmente a Jhon Jairo Venegas por su ayuda y por compartirnos su experiencia.

RESUMEN

La factibilidad de producción de antocianinas *in vivo* e *in vitro* a partir de maíz morado y blanco (*Zea mays L.*) fueron investigados como una alternativa para la producción de metabolitos secundarios. Se indujo la producción de callo a partir de ambas variedades de maíz para posteriormente producir antocianinas *in vitro* en estos cultivos celulares. Los mejores tratamientos de inducción de callo *in vitro* fueron diferentes para ambas variedades de maíz. En maíz blanco, el tratamiento elegido fue medio Murashige y Skoog (MS) con semilla germinada y concentraciones de 2,4-dichlorofenoxiacético (2,4-D) de 2. En maíz morado, el tratamiento elegido fue medio N6 con semilla germinada y 2 mg/L de 2,4-D.

Como estudio preliminar los mejores cultivos celulares fueron seleccionados para la aplicación de metil jasmonato y la producción de antocianinas. Aquí con el tratamiento de este elicitor no se obtuvo respuesta a la acumulación de antocianinas, por lo que posteriormente se realizaron los tratamientos de elicitación *in vivo* usando como sistema de elicitación metil jasmonato, deficiencia de fósforo y exceso de sacarosa. El mejor tratamiento de elicitación fue en la variedad de maíz blanco con deficiencia de fósforo que indujo una producción de antocianinas de 0.06 mg cianidina-3- β -glucósido/g peso fresco en comparación con su control. Por lo tanto la elicitación *in vivo* es un método potencialmente interesante para la producción de metabolitos secundarios, aunque deben ser optimizadas las condiciones de temperatura y luz, tipos de elicitor y concentraciones de elicitores.

ABSTRACT

The feasibility of anthocyanin production in white and purple maize cultivated *in vivo* and *in vitro* was studied in order to create a protocol to elicitate secondary metabolites. Calli was produced from both maize varieties with the purpose to induce anthocyanin production. The treatments for the induction of *in vitro* calli were different for each maize variety. In white maize the best effects were obtained from Murashige and Skoog (MS) medium with sprouts and 2,4-D concentrations of 2 and 3mg/L. In purple maize the best effect was obtained from N6 medium with sprouts and 2,4-D 2mg/L. A preliminary study was conducted using the best tissue cultures and methyl jasmonate was applied to elicitate anthocyanins. *In vitro* anthocyanin elicitation was not possible. In order to induce anthocyanins the treatments (methyl jasmonate, phosphorous deficiency and sucrose excess) were conducted *in vivo* in white and purple maize. The elicitation with white maize and phosphorous deficiency produced anthocyanins in greater quantity compared to its control (0.06 mg cyanidine-3- β -glucoside/g fresh weight). *In vivo* elicitation is an interesting method for the production of secondary metabolites, although the protocol needs conditions adjustments such as temperature, light, different types of elicitors and elicitor concentrations.

Tabla de Contenido

RESUMEN	5
ABSTRACT	6
Lista de Figuras y Tablas.....	8
INTRODUCCIÓN	9
MATERIALES Y MÉTODOS	14
Desinfección y siembra de semillas en medio de cultivo <i>in vitro</i>.....	14
Inducción de callo en medio <i>in vitro</i>	14
Estudio preliminar 1.....	14
Estudio experimental.....	15
Estudio experimental 1 y 2.....	15
Elicitación con diferentes estímulos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> en maíz morado y blanco.....	17
Estudio preliminar 2: elicitación de antocianinas <i>in vitro</i>	17
Elicitación de antocianinas <i>in vivo</i>	17
Lavado y desinfección superficial de semillas.....	17
Estudio preliminar 3.....	17
Estudio experimental 3.....	17
Diseño experimental.....	18
Extracción y determinación de antocianinas mediante el método de pH diferencial [15].	18
RESULTADOS Y DISCUSIONES	19
Inducción de Callo en medio <i>in vitro</i>	19
Inducción de callo en maíz morado.....	19
Inducción de callo en maíz blanco	21
Elicitación de antocianinas <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>.....	24
Estudio preliminar 2: Elicitación de antocianinas en callo.....	24
Elicitación de antocianinas <i>in vivo</i>	27
Estudio preliminar 3.....	27
Estudio experimental 3.....	27
CONCLUSIONES	31
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
ANEXOS.....	41
Anexo 1: Preparación de Medios.....	41

Lista de Figuras y Tablas

Fig. 1 Contenido de antocianinas en mg/g de muestra fresca de varias especies de uso agrícola y culinario.....	10
Fig. 2 Inducción de callo en maíz morado.....	21
Fig. 3 Inducción de callo en maíz blanco.....	23
Fig. 4 Callo tratados con diferentes concentraciones de metil jasmonato.....	26
Fig. 5 Elicitación <i>in vivo</i> de maíz blanco con metil jasmonato.....	28
Fig. 6 Elicitación <i>in vivo</i> de antocianinas medida como mg cianidina-3- β -glucósido/g peso fresco en maíz blanco y morado.....	29
Tabla 1 Tratamientos para inducción de callo en maíz morado.....	15
Tabla 2 Análisis de Varianza (ANOVA) del porcentaje de callo en maíz morado.....	20
Tabla 3 Análisis de Varianza (ANOVA) del porcentaje de callo en maíz blanco.....	22
Tabla 4 Elicitación de antocianinas medidas como mg de cianidina-3- β -glucósido/g de peso fresco en callo con diferentes concentraciones de metil jasmonato.....	26
Tabla 5 Análisis de Varianza (ANOVA) de elicitación de antocianinas <i>in vivo</i> medidas como mg cianidina-3- β -glucósido/g peso fresco	28

INTRODUCCIÓN

En Ecuador, en la zona sierra, el cultivo de maíz es uno de los más importantes debido a la amplia superficie sembrada y a que es uno de los principales componentes de la dieta de la población que habita en las áreas rurales. Se cosecha como maíz suave alrededor de 76.417 ha con una producción de 44.447 Tm y con un rendimiento promedio de 0,58 Tm/ha [1]. El maíz morado también conocido como la variedad racimo de uva, se origina de los Andes del Perú, y se caracteriza por su color morado de la coronta y granos, debido a su pigmento denominado antocianinas [2]. En el Perú, su consumo es popular y masivo en forma de chicha y mazamorra morada [3]. Al contrario del Ecuador, en el que no tiene variedad de usos, más que en la época de noviembre para la elaboración de la colada morada.

El maíz morado ha despertado un gran interés debido a su alto contenido de antocianinas que se presenta mayoritariamente como cianidina-3- β -glucósido [4]. Se elige al maíz morado como materia prima potencial para la extracción de antocianinas debido a que las antocianinas que se encuentran en el maíz morado presentan una mayor estabilidad que la enocianina de la uva, a factores como luz, calor y sobre todo a cambios de pH [5]. Además, el contenido de antocianinas en el maíz morado es superior al de otros vegetales como se muestra en la Fig. 1 .

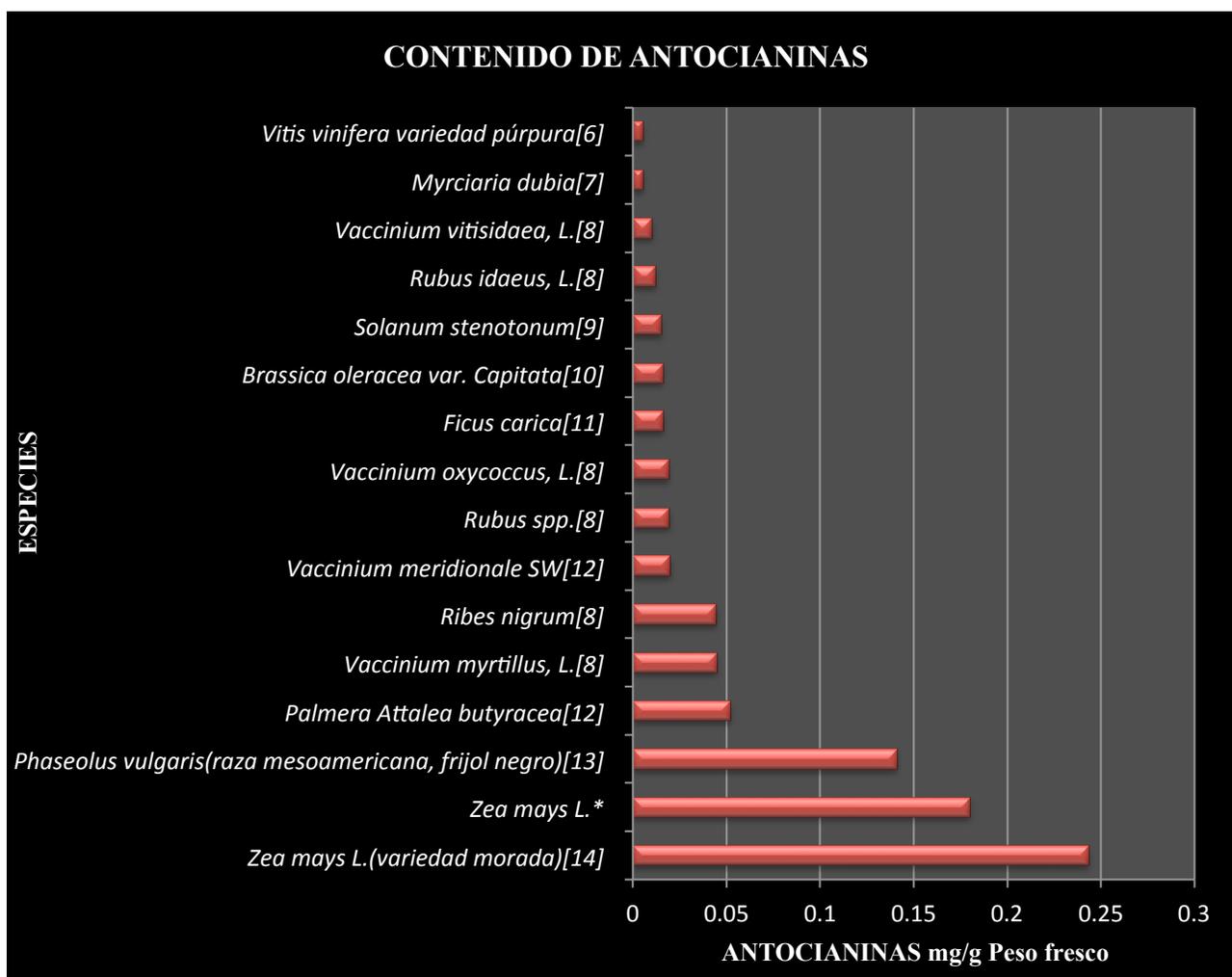


Fig. 1 Contenido de antocianinas en mg/g de muestra fresca de varias especies de uso agrícola y culinario. * Cuantificación en maíz morado del contenido en mg de cianidina-3- β -glucósido/ g de muestra por el método de pH diferencial [15], realizado en 3 determinaciones, en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad San Francisco de Quito.

Las antocianinas son parte de la familia de los compuestos fenólicos y están dentro de la clasificación de los flavonoides [16]. Los compuestos fenólicos son parte del metabolismo secundario de las plantas, es decir, que tienen un papel indirecto en el metabolismo primario relacionado con el crecimiento y la reproducción. A los metabolitos secundarios se les atribuye una variedad muy heterogénea de roles en las plantas como la protección UV, la defensa contra patógenos y plagas, la intervención en la fertilización, la señalización con

microorganismos, la regulación de auxinas y la pigmentación [17,18]. Las funciones de las antocianinas en la planta son la coloración en flores, semillas y hojas, la atracción de los polinizadores en los pétalos y la dispersión de semillas [16].

La importancia de las antocianinas se debe a su capacidad para ayudar a la prevención de enfermedades coronarias, cáncer, y diabetes. Además de sus efectos antiinflamatorios y su habilidad para mejorar la agudeza visual y comportamiento cognitivo [19]. Los efectos funcionales de las antocianinas se atribuyen a su capacidad antioxidante. Las antocianinas son excelentes donadores de electrones o hidrógenos ya que forman radicales intermedios relativamente estables y por lo tanto, tienen la capacidad de quelar metales, inhibir la enzima lipooxigenasa y captar radicales libres [20]. Estudios realizados con antocianinas obtenidas de vino han demostrado que son efectivas para atrapar especies reactivas de oxígeno además de inhibir la oxidación de lipoproteínas y la agregación de plaquetas [5]. En cuanto al mejoramiento de la agudeza visual y el comportamiento cognitivo se demostró este beneficio de las antocianinas en ratas de laboratorio que fueron alimentadas con extractos de arándanos y fresas [11].

Las antocianinas son categorizadas como colorante natural para la creación de productos funcionales con valor agregado [19]. La preferencia por los colorantes naturales se debe a que la seguridad de los pigmentos sintéticos ha sido cuestionada, ya que pueden generar diferentes tipos de reacciones en la salud y como consecuencia se ha reducido el número de colorantes sintéticos permitidos [4]. Debido a esta limitación y a la tendencia mundial hacia el consumo de productos amigables con el ambiente y la salud, la extracción de colorantes naturales ha aumentado. Las antocianinas son responsables de los colores naranja, rojo y azul. Además son solubles en agua, lo que facilita su incorporación en sistemas acuosos en los alimentos [21].

Actualmente, se utilizan los cultivos celulares *in vitro* para la producción de metabolitos secundarios con valor nutricional y medicinal. La producción *in vitro* de metabolitos secundarios elimina las desventajas estacionarias, las variaciones geográficas y anuales en los cultivos, y los cambios en los rendimientos debido a enfermedades y plagas [22]. La producción biotecnológica de metabolitos secundarios en cultivos celulares o en órganos de plantas es una alternativa atractiva [23]. Sin embargo, el potencial de estos cultivos celulares todavía es limitado ya que no se logra obtener el compuesto que se necesita o se produce en muy bajas cantidades lo que dificulta el proceso industrial [22]. Este problema se ha visto parcialmente superado por la selección de líneas celulares altamente productivas, modificación genética, optimización de condiciones físicas y químicas del medio de cultivo, adición a estos medios de precursores biosintéticos y elicitores para hacer que haya una mayor producción de los metabolitos secundarios [24]. En un estudio realizado en células en suspensión de cultivos de *Morinda citrifolia L.* se logró exitosamente inducir metabolitos secundarios mediante la adición de hormonas al medio de cultivo MS. Comprobándose que las suspensiones celulares de raíces y frutas pueden ser sistemas efectivos para la producción a gran escala de metabolitos secundarios como: antraquinonas, flavonoides y compuestos fenólicos [25]. En la especie *Vitis vinifera L.* mediante la adición de sucrosa (0.12 M) se indujo la acumulación de fenoles totales y antocianinas en explantes de hoja. Cuando se adicionó ácido abscísico (20 μ M) y ácido 2-cloroetilfosfónico se obtuvo un efecto sinérgico con la sucrosa para mejorar la inducción de los fenoles totales y de las antocianinas [26].

Un elicitador puede ser definido como una sustancia, que introducida en pequeñas concentraciones a un sistema de células vivas inicia o mejora la biosíntesis de compuestos específicos [23]. Estos compuestos son inducidos debido al estrés producido por el elicitador y

tienen funciones antimicrobianas o antiestrés en células vegetales. En el caso de las antocianinas se puede potencializar su producción utilizando inductores y factores de estrés [22]. Existen diferentes investigaciones que comprueban esta teoría. En un estudio realizado en un mutante de *Arabidopsis thaliana* (con deficiencia en la habilidad de mantener un nivel de fósforo interno adecuado) se demostró que la insuficiencia de fósforo aumenta la acumulación de las antocianinas al menos 100 veces la cantidad que en su fenotipo normal [27].

La acumulación de antocianinas inducidas por azúcares ha sido observada en diferentes investigaciones y en distintas especies de plantas. En petunias, los azúcares fueron necesarios para la pigmentación de las corolas en desarrollo, mientras que en la piel de las bayas de las uvas indujeron varios de los genes involucrados en la síntesis de antocianinas. Recientemente en *Arabidopsis*, se ha demostrado una inducción específica de los azúcares a la biosíntesis de antocianinas [16]. El metil jasmonato como inductor aumenta la síntesis de antocianinas en semillas de soya, en semillas de *Arabidopsis*, en los bulbos de tulipanes y en raíces de duraznos [28]. Sudha y Ravishankar (2011) demostraron que existe un aumento en la síntesis de antocianinas al cultivar callo de *Daucus carota* en presencia de metil jasmonato y ácido salicílico, sustancias relacionadas con la respuesta estrés y la activación de mecanismos de defensa en plantas, respectivamente [22]. El ácido jasmónico y su metil éster, son ciclo pentanonas que modulan muchos procesos fisiológicos en las plantas, incluyendo la respuesta a heridas y a la pudrición de las frutas [28].

El objetivo de este trabajo fue estudiar la factibilidad de producción de antocianinas *in vivo* e *in vitro* a partir de maíz morado y blanco utilizando tres tipos de elicitores (deficiencia de

fósforo, altas concentraciones de sacarosa y adición de la hormona metil jasmonato) como una alternativa para la producción de metabolitos secundarios.

MATERIALES Y MÉTODOS

El maíz blanco (*Zea mays L.* variedad mishka) utilizado provino del sector Nayón (Quito – Ecuador). El maíz morado (*Zea mays L.* variedad morada) fue donado por el Departamento de Agroempresa de la Universidad San Francisco de Quito proveniente de una selección artificial de semillas cultivadas en El Quinche y Yaruquí (Ecuador).

Desinfección y siembra de semillas en medio de cultivo *in vitro*

Se utilizó una desinfección con gas, siendo las semillas colocadas en tubos Falcom dentro de un desecador con una mezcla de 3 mL de ácido clorhídrico al 37% y 100 mL de cloro comercial. Se desinfectó por 24 horas [29].

Las semillas desinfectadas fueron sembradas en aproximadamente 30 mL del medio MS en frascos de 250 mL. Se ajustó el pH de los medios a 5.8 y se autoclavó a 121°C por 45 min. Fueron sembradas 5 semillas por frasco en la cámara de flujo laminar.

Inducción de callo en medio *in vitro*

Estudio preliminar 1.

Los medios N6 y MS, preparados según las fórmulas del Anexo 1, fueron suplementados con cuatro niveles de la hormona 2,4-D (0.5, 1, 2 y 3 mg/L), y ajustados a pH 5.8 antes de ser autoclavados a 121°C por una hora. Los explantes utilizados (cuatro por frasco) fueron semilla germinada, raíz, hoja y meristema. Estos fueron expuestos a la luz por 24 h a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C) y después transferidos a la oscuridad también a temperatura ambiente por tres semanas. Se escogió las concentraciones de hormonas y los

explantes que produjeron callo en mayor cantidad y magnitud (Protocolo modificado de Rakchit et al., 2010) [30].

Estudio experimental.

Siguió el proceso anterior con las concentraciones de hormona (2 mg/L, 3 mg/L y 0 mg/L para el control) y explantes seleccionados (meristema y semilla germinada). A las tres semanas se contó (en porcentaje) el número de callo producidos por frasco. Los callos fueron subcultivados en medios frescos con la misma composición por 15-20 días en oscuridad [30].

Los diferentes tratamientos para inducción de callo se hicieron de acuerdo a la Tabla 1.

Tratamientos	Medio	Explante	Hormona 2,4-D (mg/L)
1	N6	Meristema	0
2	N6	Meristema	2
3	N6	Meristema	3
4	N6	Semilla germinada	0
5	N6	Semilla germinada	2
6	N6	Semilla germinada	3
7	MS	Meristema	0
8	MS	Meristema	2
9	MS	Meristema	3
10	MS	Semilla germinada	0
11	MS	Semilla germinada	2
12	MS	Semilla germinada	3

Tabla 6 Tratamientos para inducción de callo en maíz morado.

Los tratamientos para la inducción de callo en maíz blanco fueron los mismos de la Tabla 1.

Estudio experimental 1 y 2.

Para cada una de las variedades de maíz estudiadas se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con arreglo factorial 2x2x3 y tres repeticiones por tratamiento; dando un total de 36 unidades experimentales. Los datos fueron analizados con el análisis de varianza

(ANOVA) y las medias evaluadas mediante la prueba de Tuckey al 5 % de probabilidad utilizando el programa IBM SPSS Statistics Versión 19.

Los factores utilizados fueron explantes (semilla germinada y meristema); medios de cultivo (N6 y MS), y concentraciones de hormona 2,4-D (0 mg/L, 2 mg/L y 3 mg/L). La variable medida fue porcentaje de producción de callo por explante [30].

Diseño Experimental 1: maíz morado.

Diseño Experimental 2: maíz blanco.

Elicitación con diferentes estímulos *in vivo* e *in vitro* en maíz morado y blanco

Estudio preliminar 2: elicitación de antocianinas *in vitro*.

Se colocaron los callo provenientes de los mejores medios del Estudio experimental 1 en diferentes concentraciones de metil jasmonato (100 μM , 30 μM , y control 0 μM ,) [16,31,32,33] después de 7 días se determinó la cantidad de antocianinas con el método de pH diferencial [15].

Elicitación de antocianinas *in vivo*.

Lavado y desinfección superficial de semillas.

Debido a que las semillas fueron obtenidas de campo se realizó un lavado y lavado superficial para controlar contaminación durante la siembra y evitar que afecte los resultados. Las semillas se sumergieron en una solución con detergente en polvo durante 5 minutos, luego fueron enjuagadas con agua corriente hasta retirar los residuos de jabón; en seguida las semillas se colocaron en una solución con fungicida (Benlate 4 g/L más Captan 4 g/L) durante 20 minutos. Se enjuagaron las semillas 5 veces con agua destilada estéril para eliminar el fungicida [34].

Estudio preliminar 3.

Se utilizó plantas de maíz blanco y morado de 3 cm de alto y se sembró en frascos que contenían agua estéril con papel filtro y concentraciones de 30 μM , 10 μM , y 0 μM de metil jasmonato, después de 7 días se observaron los cambios de color para detectar elicitación de antocianinas.

Estudio experimental 3.

Las semillas desinfectadas se sembraron en frascos que contenían papel filtro y medio estéril MS o agua dependiendo del tratamiento a seguir. Las plántulas de una semana de vida y 3 cm de alto se colocaron en los siguientes tratamientos para la elicitación de antocianinas:

deficiencia de fósforo (0 mg/L) (Protocolo modificado de Ulrychová et al., 2009) [35], exceso de sacarosa (60 g/L) y cuatro concentraciones de metil jasmonato (Protocolo modificado de López et al., 2011) [33]. Después de 7 días de tratamiento, a temperatura ambiente, 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, se cuantificaron las antocianinas por el método de pH diferencial [15].

Diseño experimental

Los 16 tratamientos fueron dispuestos en un Diseño Completamente al Azar (DCA) con tres repeticiones por tratamiento; dando un total de 48 unidades experimentales. Los datos fueron interpretados con el análisis de varianza (ANOVA) y las medias evaluadas mediante la prueba de Tuckey al 5 % de probabilidad utilizando el programa IBM SPSS Statistics Versión 19.

Los tratamientos utilizados fueron: control (MS), control (Agua), contenido de fósforo (KH_2PO_4) 0 mg/L, contenido de azúcar 60 g/L, metil jasmonato 3.3 μM , 10 μM , 30 μM y 100 μM . Estos tratamientos se realizaron en las dos variedades de maíz. La variable de medición fue contenido de antocianinas en mg cianidina-3- β -glucósido/g peso fresco [15].

Extracción y determinación de antocianinas mediante el método de pH diferencial [15].

Por cada unidad experimental 0.3 g de muestra fueron macerados en nitrógeno líquido. Al polvo obtenido se adicionó 3 mL de metanol acidificado (1:99; HCl 37%: metanol al 98%) [33]. La mezcla se mantuvo en oscuridad por 24 horas a 4°C. Se tomaron dos alícuotas de 1 mL. A la primera alícuota se adicionó 4 mL de buffer de cloruro de potasio pH 1 (0.025 M) y a la segunda 4 mL de buffer acetato de sodio pH 4.5 (0.4 M). Se midieron las absorbancias a 530 nm y 700 nm y se utilizó agua destilada como blanco [15].

Se calculó la absorbancia con la siguiente fórmula:

$$A = (A_{530\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH1}} - (A_{530\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH4,5}}$$

(1)

Donde: A= absorbancia

El contenido de antocianinas fue calculado con la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de cianidina - 3 - } \beta \text{ - glucósido } \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{(A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 1000)}{\epsilon} \times l$$

(2)

Donde: MW= peso molecular de la antocianina como cianidina-3- β -glucósido, 449.2 g/mol; DF= factor de dilución (volumen final/volumen inicial); ϵ = coeficiente de extensión molar para la cianidina-3- β -glucósido, 26900; l= longitud del recorrido en cm.

Se transformaron los datos a mg de cianidina-3- β -glucósido/ g de muestra fresca.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Inducción de Callo en medio *in vitro*

Del Estudio preliminar 1 se eligieron los explantes (semilla germinada y meristema) y concentraciones de hormona 2,4-D (2 mg/L y 3 mg/L), estos produjeron la mayor cantidad y calidad de callo.

Inducción de callo en maíz morado.

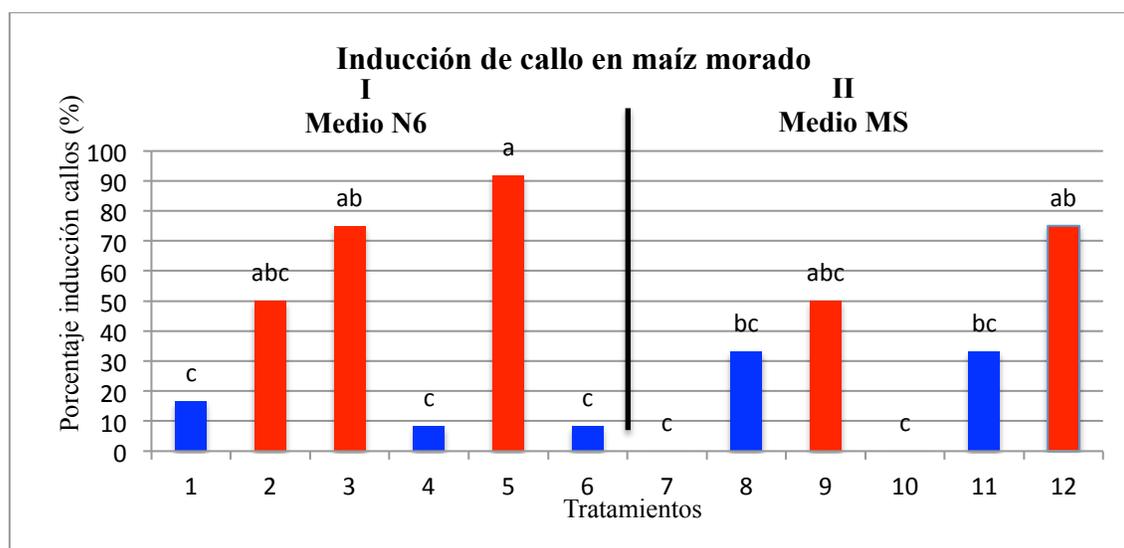
Para crear el cultivo de células se indujo diferentes explantes de maíz morado con medios (N6 y MS) que contenían diferentes niveles de hormona 2,4-D. En la Tabla 2 se presenta el análisis de varianza (ANOVA) de la inducción de callo en el maíz morado, observándose que existió diferencia significativa entre los tratamientos. Los factores que influenciaron en el porcentaje

de producción de callo fueron: concentración de hormona, interacción medio-hormona, interacción explante-hormona, interacción medio-explante-hormona.

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft
Total	35	41857,639			
Tratamientos	11	33107,639	3009,785	8,255*	2,22
Medio (A)	1	850,694	850,694	2,333 ^{N.S.}	4,26
Explante (B)	1	17,361	17,361	,048 ^{N.S.}	4,26
Hormona (C)	2	16805,556	8402,778	23,048*	3,40
AxB	1	850,694	850,694	2,333 ^{N.S.}	4,26
AxC	2	5138,889	2569,444	7,048*	3,40
BxC	2	2638,889	1319,444	3,619 ^{N.S.}	3,40
AxBxC	2	6805,556	3402,778	9,333*	3,40
Error	24	8750,000	364,583		
Experimental					

*significativo al 5% de probabilidad por la prueba F. N.S. no significativo al 5% de probabilidad por la prueba F.
Tabla 7 Análisis de Varianza (ANOVA) del porcentaje de callo en maíz morado.

En la Fig. 2 se observa que los tratamientos 2, 3, 5, 9 y 12 fueron los mejores y estadísticamente iguales.



Medias seguidas por las mismas letras no difieren entre sí al 5% de probabilidad por la Prueba de Tuckey
Fig. 2 Inducción de callo en maíz morado. I. Tratamientos con medio N6. II. Tratamientos con medio MS.
Tratamiento 1: Medio N6, explante meristema y 0mg/L de 2,4-D. Tratamiento 2: Medio N6, explante meristema

y 2mg/L de 2,4-D. Tratamiento 3: Medio N6, explante meristema y 3mg/L de 2,4-D. Tratamiento 4: Medio N6, explante semilla germinada y 0 mg/L de 2,4-D. Tratamiento 5: Medio N6, explante semilla germinada y 2mg/L de 2,4-D. Tratamiento 6: Medio N6, explante semilla germinada y 3mg/L de 2,4-D. Tratamiento 7: Medio MS, explante meristema y 0mg/L de 2,4-D. Tratamiento 8: Medio MS, explante meristema y 2mg/L de 2,4-D. Tratamiento 9: Medio MS, explante meristema y 3mg/L de 2,4-D. Tratamiento 10: Medio MS, explante semilla germinada y 0 mg/L de 2,4-D. Tratamiento 11: Medio MS, explante semilla germinada y 2mg/L de 2,4-D. Tratamiento 12: Medio MS, explante semilla germinada y 3mg/L de 2,4-D.

Inducción de callo en maíz blanco

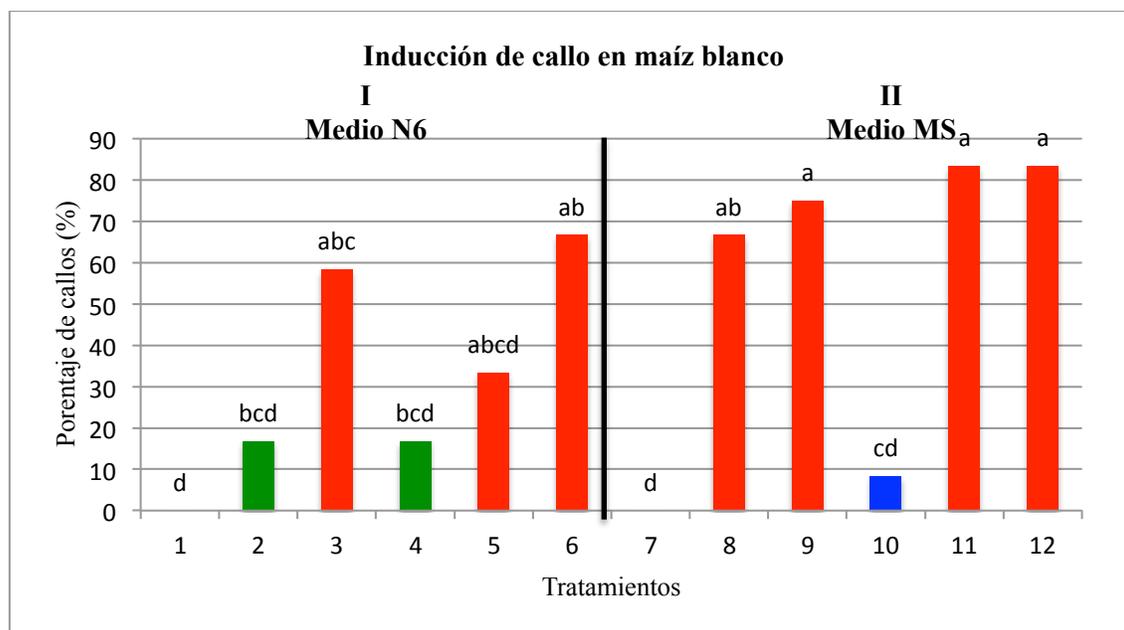
Para la inducción de callo se utilizaron explantes de maíz blanco en dos diferentes medios N6 y MS con 3 diferentes concentraciones de hormona 2,4-D. Según los resultados obtenidos del análisis de varianza (ANOVA) de la inducción de callo en el maíz blanco (Tabla 3) existió diferencia significativa entre los tratamientos. Los factores que influyeron en el porcentaje de producción de callo fueron: medio, explante, concentración de hormona, interacción medio-hormona.

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft
Total	35	41857,639			
Tratamientos	11	36024,306 ^a	3274,937	10,480*	2,22
Medio (A)	1	3906,250	3906,250	12,500*	4,26
Explante (B)	1	1406,250	1406,250	4,500*	4,26
Hormona (C)	2	26076,389	13038,194	41,722*	3,40
AxB	1	17,361	17,361	,056 ^{N.S.}	4,26
AxC	2	4479,167	2239,583	7,167*	3,40
BxC	2	104,167	52,083	,167 ^{N.S.}	3,40
AxBxC	2	34,722	17,361	,056 ^{N.S.}	3,40
Error Experimental	24	7500,000	312,500		

*significativo al 5% de probabilidad por la prueba F. N.S. no significativo al 5% de probabilidad por la prueba F.

Tabla 8 Análisis de Varianza (ANOVA) del porcentaje de callo en maíz blanco.

En la Fig. 3 se observa que los tratamientos 3, 5, 6, 8, 9, 11 y 12 fueron los mejores y estadísticamente iguales.



Medias seguidas por las mismas letras no difieren entre sí al 5% de probabilidad por la Prueba de Tuckey

Fig. 3 Inducción de callo en maíz blanco. I. Tratamientos con medio N6. II. Tratamientos con medio MS.

Tratamiento 1: Medio N6, explante meristema y 0mg/L de 2,4-D. Tratamiento 2: Medio N6, explante meristema y 2mg/L de 2,4-D. Tratamiento 3: Medio N6, explante meristema y 3mg/L de 2,4-D. Tratamiento 4: Medio N6, explante semilla germinada y 0 mg/L de 2,4-D. Tratamiento 5: Medio N6, explante semilla germinada y 2mg/L de 2,4-D. Tratamiento 6: Medio N6, explante semilla germinada y 3mg/L de 2,4-D. Tratamiento 7: Medio MS, explante meristema y 0mg/L de 2,4-D. Tratamiento 8: Medio MS, explante meristema y 2mg/L de 2,4-D. Tratamiento 9: Medio MS, explante meristema y 3mg/L de 2,4-D. Tratamiento 10: Medio MS, explante semilla germinada y 0 mg/L de 2,4-D. Tratamiento 11: Medio MS, explante semilla germinada y 2mg/L de 2,4-D. Tratamiento 12: Medio MS, explante semilla germinada y 3mg/L de 2,4-D.

La composición y concentración de los reguladores de crecimiento son factores que determinan la formación de callo y la regeneración de plantas en el cultivo de tejidos. Según García et al. (2006) los callos presentan un mayor crecimiento a medida que se incrementan las concentraciones de 2,4-D en los medios de cultivo [36].

En el estudio realizado por Espinosa et al. (2012) en *Morus alba L.* al sembrar los explantes de hojas, pecíolos y tallos con 2,4-D en diferentes concentraciones, se determinó que todas las mayores a 0.5 mg/L obtuvieron 100% de formación de callo; paralelamente, en los tratamientos que no contenían este regulador del crecimiento no formaron callo [37]. En el presente estudio se pudo observar rangos de 17-92% en la inducción de callo en maíz morado y blanco, similar a los resultados obtenidos por Espinosa et al. (2012) y por Jakubeková et al. (2011) que en maíz observó la iniciación de producción de callo a partir de embriones inmaduros desde el séptimo día con un porcentaje de callo formado de 95% [37,38].

En las dos variedades de maíz se pudo observar que cuando no se aplicó 2,4-D se obtuvo bajo porcentaje de formación de callo. En maíz morado y blanco el porcentaje de producción de callo con 0 mg/L de 2,4-D fue de 6.25%. Esta formación de callo se puede explicar debido a la presencia de auxinas a nivel endógeno en los meristemas o en la semilla germinada que permiten la dediferenciación y proliferación celular [39].

Las inconcordancias observadas en los resultados de inducción de callo en maíz morado y blanco se pueden explicar por las diferencias genotípicas de cada variedad como se reporta en estudios realizados por Danson et al. (2006) en que el genotipo juega un rol crucial en la formación de callo y en la regeneración de plantas [40]. En una investigación realizada por González et al. (2012) en líneas de maíz argentinas se obtuvieron resultados heterogéneos de formación de callo, identificándose solamente 48 líneas que desarrollaron callo y solo 7 líneas que lograron hacer embriogénesis somática y regeneración [41].

La eficiencia de la micropropagación difiere debido a variaciones en concentración de reguladores de crecimiento y otros suplementos que se añaden al medio. En un estudio hecho

en maíz de la India no se obtuvieron callo usando solamente 2,4-D, por el contrario, se obtuvieron resultados positivos al combinar dos hormonas: 2,4-D y BAP. Concentraciones excesivas de 2,4-D y BAP afectaban negativamente a la formación de callo (2.5-3.5 mg/L de 2,4-D y 1.5-2.5 mg/L de BAP) [42].

El callo obtenido de embriones maduros regenera con mayor eficiencia que otros explantes [43]. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en esta investigación ya que en las dos variedades de maíz se obtuvo el mayor porcentaje de callo utilizando semilla germinada (embriones maduros) con hormona 2 y 3 mg/L. La iniciación, el mantenimiento de las células, tejidos y la regeneración exitosa de las plantas dependen del genotipo y tejido usado, del estado de desarrollo de la planta, del medio de cultivo y del entorno en cada etapa del desarrollo. La edad de los embriones, su emplazamiento en el medio y su composición son los factores más importantes [44]. Son estas razones por las que se pudo observar una diferencia en la obtención de callo en los dos tipos de maíz usados para esta investigación, cada una de las variedades tiene sus condiciones óptimas para la generación de callo.

Elicitación de antocianinas *in vivo* e *in vitro*.

Estudio preliminar 2: Elicitación de antocianinas en callo.

Posteriormente, los callo provenientes de los mejores tratamientos del Estudio experimental 1 fueron utilizados para la elicitación de antocianinas antes de desarrollar la suspensión de células, como ensayo de factibilidad de la inducción. Para el caso del maíz morado se escogió el tratamiento 5 debido a que el explante de semilla germinada es más fácil de obtener y se utiliza menor cantidad de hormona, y para maíz blanco se eligió el tratamiento 11 por las razones descritas anteriormente. En la Tabla 4, se puede observar que después de la aplicación de la hormona a los callo, no hubo respuesta en la producción de antocianinas.

Variedad	Tratamientos	*mg cianidina-3- β - glucósido/g peso fresco
Callo	Control agua	0
Maíz	Metil jasmonato 30 μ M	0
Blanco	Metil jasmonato 100 μ M	0
Callo	Control agua	0
Maíz	Metil jasmonato 30 μ M	0
Morado	Metil jasmonato 100 μ M	0

* Tres determinaciones

Tabla 9 Elicitación de antocianinas medidas como mg de cianidina-3- β -glucósido/g de peso fresco en callo con diferentes concentraciones de metil jasmonato

Estos resultados se pueden justificar por dos hipótesis. La primera, el efecto adverso que pueden tener las auxinas sobre la producción de antocianinas. Han sido reportadas algunas especies de plantas en donde las auxinas logran suprimir la producción de antocianinas evitando su formación. En un estudio en zanahorias donde se probó la afectación de algunos reguladores de crecimiento (auxinas) en la síntesis de antocianinas se observó que el 2,4-D tuvo el mayor efecto inhibitor [45]. Resultados similares se obtuvieron en un estudio realizado por Stickland y Sunderland (1971) en callo de *Haplopappus gracilis* [46]. La segunda, las funciones de los cultivos celulares desdiferenciados cambian ya que deben focalizarse en la reorganización de del metabolismo celular y el cambio de su desarrollo para la formación del callo, por lo tanto, funciones específicas no vitales para la supervivencia del cultivo son inhibidas [47]. Los callo tratados con metil jasmonato se pueden observar en la Fig. 4. La falta de cambio de color corrobora la ausencia de producción de antocianinas.

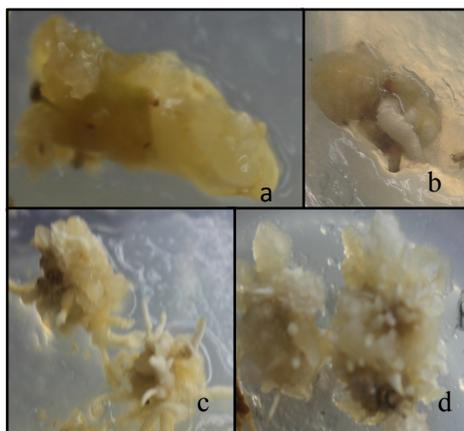


Fig. 4 Callo tratados con diferentes concentraciones de metil jasmonato. a. Callo maíz morado en 30 μ M. b. Callo maíz morado 100 μ M. c. Callo proveniente de maíz blanco en 30 μ M d. Callo maíz blanco 100 μ M..

Elicitación de antocianinas *in vivo*.

Estudio preliminar 3.

Debido a que no se logró la elicitación de antocianinas a partir cultivo de callo *in vitro* por las hipótesis antes mencionadas, se cambió a un sistema de elicitación *in vivo*. Se realizó un estudio preliminar donde se logró la elicitación de antocianinas con varias concentraciones de metil jasmonato. El maíz blanco elicitado con 10 μM de metil jasmonato se muestra en la Fig. 5 donde se observa el cambio de color y la producción de antocianinas. Los resultados positivos obtenidos de estas pruebas preliminares determinaron viable el experimento *in vivo*.

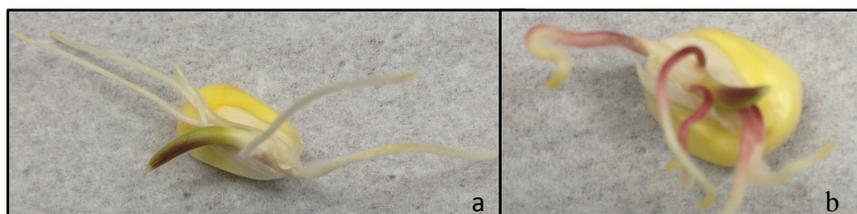


Fig. 5 Elicitación *in vivo* de maíz blanco con metil jasmonato. a. Maíz blanco control agua. b. Maíz blanco 10 μM metil jasmonato.

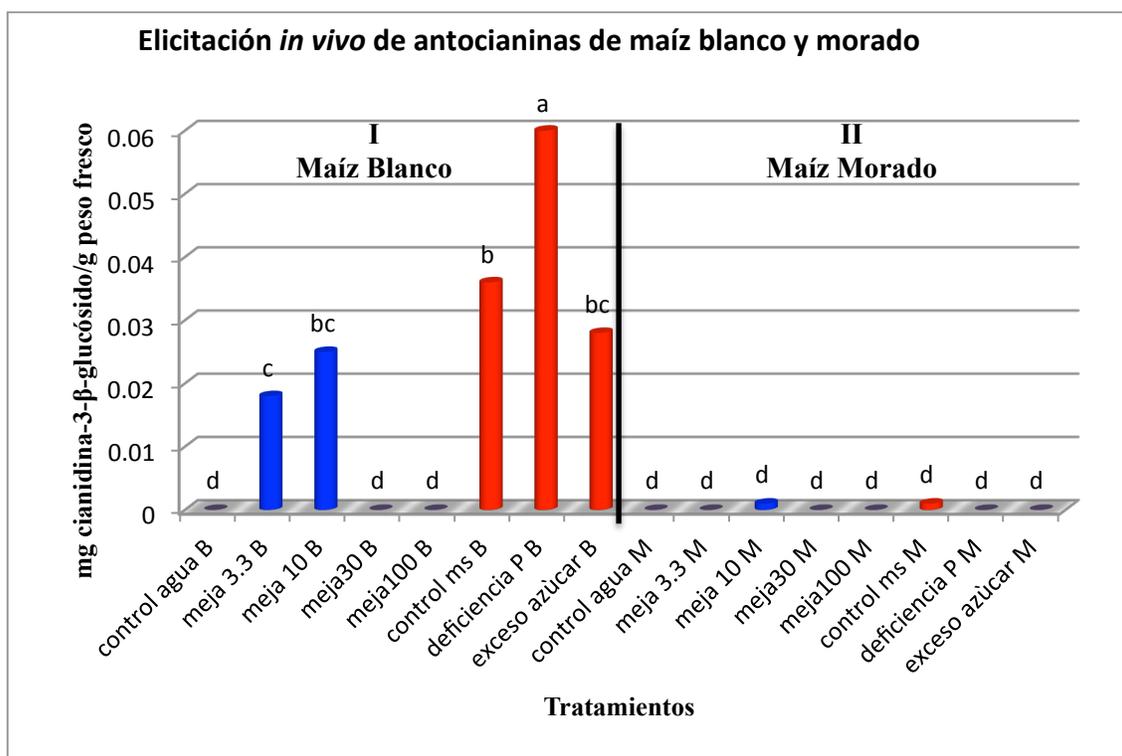
Estudio experimental 3.

Para la elicitación de antocianinas *in vivo* se utilizó elicitors como: deficiencia de fósforo, hormona metil jasmonato y exceso de sacarosa. Mediante el Análisis de Varianza (ANOVA) de la elicitación de antocianinas de los tratamientos (elicitación *in vivo*) (Tabla 5) se determinó que existió diferencia significativa entre tratamientos.

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft
Total	47	0,015			
Tratamientos	15	0,015	0,001	42,319*	2,015
Error Experimental	32	0,001	$2,302 \times 10^{-5}$		

*significativo al 5% de probabilidad por la prueba F. N.S. no significativo al 5% de probabilidad por la prueba F.
Tabla 10 Análisis de Varianza (ANOVA) de elicitación de antocianinas *in vivo* medidas como mg cianidina-3- β -glucósido/g peso fresco

Al observar la Fig. 6, se identifica diferencias entre ambas variedades de maíz. El maíz blanco logró elicitar antocianinas en los tratamientos metil jasmonato 3,3 μ M y 10 μ M, 0.018 y 0.025 mg cianidina-3- β -glucósido/g peso fresco respectivamente, en comparación con el control en agua 0 mg cianidina-3- β -glucósido/g peso fresco. Así mismo, la deficiencia de fósforo, exceso de sacarosa y control MS produjeron antocianinas en rangos de 0.028 – 0.06 mg cianidina-3- β -glucósido/g peso fresco. Mientras que los tratamientos en maíz morado presentaron resultados estadísticamente iguales a su control que es 0 mg cianidina-3- β -glucósido/g peso fresco. La acumulación de antocianinas sigue siendo un campo de investigación intrigante ya que algunas discrepancias pueden ser explicadas teniendo en cuenta las diferentes especies de plantas y los tejidos analizados [16].



Medias seguidas por las mismas letras no difieren entre sí al 5% de probabilidad por la Prueba de Tuckey
 Fig. 6 Elicitación *in vivo* de antocianinas medida como mg cianidina-3- β -glucósido/g peso fresco en maíz blanco y morado. I. Tratamientos en maíz blanco. II. Tratamientos en maíz morado. Barras azules tratamientos de

control en agua y metil jasmonato. Barras rojas tratamientos control MS, deficiencia de fósforo y exceso de sacarosa.

La producción de antocianinas en el tratamiento de deficiencia de fósforo en plantas de maíz blanco fue el más alto y diferente estadísticamente (0.06 mg cianidina-3- β -glucósido/g peso fresco). En un estudio hecho en *Lens culinaris* Medik la deficiencia de fósforo también logró elicitación de antocianinas logrando una concentración de hasta 0.3 mg de compuestos fenólicos/ g de peso fresco [48]. La inducción por deficiencia de fósforo ocurre debido a que la composición y cantidad de los nutrientes disponibles para la planta tiene una importante repercusión en el contenido fenólico, de modo que condiciones de estrés nutricional, sobre todo por limitación de fósforo, pueden aumentar el nivel de antocianinas en la planta [18].

Kim et al. (2006) al aplicar bajas concentraciones de metil jasmonato (3.3 μ M y 10 μ M) en maíz indujo la formación de antocianinas con resultados de 51.8% al comparar con el control; mientras que concentraciones mayores de hormona inhibieron la producción de antocianinas [49]. Esto fue observado en los tratamientos de maíz blanco en los que concentraciones mayores a 30 μ M no indujeron la producción de antocianinas. Al contrario, en la especie *Gynura bicolor* sometida a concentraciones de 25-50 μ M de metil jasmonato se logró una gran acumulación de antocianinas en las raíces de la planta cultivada [50]. Estas diferencias de resultados de producción de antocianinas se deben probablemente a la diferencia de especie y condiciones del experimento.

Existen dos teorías que respaldan el aumento de la cantidad de antocianinas al utilizar azúcar como elicitador. La primera, es debido al estrés causado por ósmosis, la producción de antocianinas va aumentando conforme se incrementa la cantidad de sacarosa [24]. La segunda, es su capacidad de actuar como molécula de señalización, su concentración en un tejido puede

llevar a activar o desactivar determinados genes [22]. Los azúcares tienen una función similar a una hormona debido a su acción de señalización. Actúan como mensajeros primarios en procesos de señalización de transducción que regulan varios procesos importantes en todas las fases del ciclo de vida de una planta [51]. Existen reportes en cultivos celulares indicando que un aumento en la concentración de sacarosa de 2 a 6%, e incluso al 12%, al medio de cultivo estimula la producción de antocianinas al desarrollar una osmomolaridad en el medio [24]. Esto se evidenció en la variedad de maíz blanco donde el aumento de sacarosa de 6% tuvo elicitación de antocianinas. Sin embargo, en la Fig. 6 se observa que el tratamiento exceso de sacarosa y el tratamiento control MS para maíz blanco fueron estadísticamente iguales, lo que puede ser debido a que el medio MS contiene nitratos y amonios como fuentes de nitrógeno dando una concentración de 60 mM que ya se considera alta y puede influenciar en la inducción de antocianinas [52]. La influencia de las diferentes sales que constituyen el medio MS a diferentes concentraciones puede determinar la elicitación de antocianinas en las plantas. La biosíntesis de antocianinas es regulada por interacciones complejas de varias influencias internas y externas, incluyendo la temperatura, la luz, los carbohidratos, hormonas de la planta y estrés por agua [48]. Por lo tanto, se necesita tener bajo control estas condiciones.

El mejor tratamiento fue maíz blanco con deficiencia de fósforo obteniendo un valor de antocianinas de 0.06 mg cianidina-3- β -glucósido/g peso fresco siendo 3 veces menor al obtenido a partir de la semilla de maíz morado realizado con el método de pH diferencial [15] en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad San Francisco de Quito cuyo resultado fue 0.18 mg cianidina-3- β -glucósido/g peso fresco, sin embargo, el método de inducción resulta ser muy interesante, ya que el valor de 0.06 mg cianidina-3- β -glucósido/g peso fresco

es mayor que otras especies estudiadas previamente incluyendo la uva, arándano y mortiño (Fig 1).

CONCLUSIONES

La elicitación de antocianinas *in vitro* en las variedades maíz blanco y maíz morado utilizadas no tuvo resultados positivos, sin embargo, la inducción de antocianinas *in vivo* sí. En maíz blanco se logró elicitación en medio con deficiencia de fósforo y metil jasmonato. A pesar de obtener un contenido de antocianinas menores por medio de elicitación que el que se obtuvo de semilla de maíz morado, el método de inducción es interesante ya que permitió la obtención de antocianinas de una especie que normalmente no presenta y logró una concentración mayor a la de algunas especies analizadas como se observa en la Fig. 1. Por lo tanto, se recomienda optimizar el método de elicitación controlando factores externos como luz y temperatura y utilizando otros tipos y concentraciones de elicitors para justificar la producción *in vivo* de antocianinas. Por otro lado, se recomienda medir el contenido de antocianinas en el tiempo para determinar si estos compuestos se mantienen estables. Se debe estudiar y lograr la estabilidad de las antocianinas antes de que se pueda implementar su uso a nivel industrial.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Lizano, A. 2012. “Efecto del proceso de fritura en el contenido de antocianinas en empanadas elaboradas con mezclas de harina de trigo-maíz morado”, Universidad San Francisco de Quito, Tesis de Grado: Quito.
- [2] Jacho, L. 2009. “Caracterización molecular y análisis químico nutritivo de 27 accesiones de maíz chulpi (*Zea mays L.*) y 65 accesiones de maíz morado colectadas

en la serranía del Ecuador”, Universidad Central de Ecuador, Previa a la obtención del Título: Sangolquí.

- [3] Arroyo, J.; Raez, E.; Rodríguez, N.; Chumpitaz, V.; Burga, J.; De la Cruz, W.; Valencia, J. 2007. “Reducción del colesterol y aumento de la capacidad antioxidante por el consumo crónico de maíz morado *Zea mays L.* en ratas hipercolesterolémicas”, *Revista Peruana de Medicina experimental y Salud Pública*, 24(2): 050103085

- [4] Downham, A.; Collins, P. 2000. “Colouring our foods in the last and next millennium”, *International Journal of Food Science and Technology*, 35(1): doi:10.1046/j.1365-2621.2000.00373.x

- [5] Cuevas, M. E.; Antezana, A.; Winterhalter, P. 2008. “Análisis y caracterización de antocianinas en diferentes variedades de maíz *Zea mays* Boliviano”, Enlace: http://educon.javeriana.edu.co/lagrotech/images/elyana_cuevas.pdf, Red-Alfa Lagrotech: Cartagena, Fecha de consulta: 03 Marzo2013.

- [6] Pastrana, E.; Gutiérrez, N. 2009. “Identificación y cuantificación de antocianinas en uvas muscadinas por cromatografía líquida y espectrometría de masas”, *Entornos*, (21): ISSN0124-7905

- [7] Villanueva, J.; Condezo, L.; Asquiere, E. 2010. "Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante en la cáscara de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K) McVaugh)", *Ciència e Tecnologia de Alimentos*, 30(1): <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612010000500023>
- [8] Leyva, D. 2009. "Determinación de antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante en licores y fruta de mora", Enlace: http://jupiter.utm.mx/~tesis_dig/10876.pdf, Universidad Tecnológica de la Mixteca: Oaxaca, Fecha de consulta: 12 de Abril de 2012.
- [9] Polit, M. F. 2009. "Characterization and Quantification of anthocyanins and other phenolics in native andean potatoes", Enlace: <https://dspace.lib.ohio-state.edu/dspace/handle/1811/36576>, The Ohio State University, Fecha de consulta: 29 de Abril de 2012.
- [10] Yuan, Y.; Chiu, L.; Li, L. 2009. "Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in red cabbage", *Biomedical and Life Sciences* , 230 (6): doi:10.1007/s00425-009-1013-4
- [11] Aguilera, M.; Reza, D.; Chew, R.; Meza, J. 2011. "Propiedades funcionales de las antocianinas", *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, 13(2)
- [12] Gaviria, C.; Ochoa, C.; Sánchez, N.; Medina, C.; Lobo, M.; Galeano, P. 2009. "Actividad antioxidante e inhibición de la peroxidación lipídica de extractos de frutos de mortiño (*Vaccinium meridionale SW*)", *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8 (6): ISSN:0717-7917

- [13] Salinas, Y.; Rojas, L.; Sosa, E.; Pérez, P. 2005. “Composición de antocianinas en variedades de frijol morado (*Phaseolus vulgaris L.*) cultivadas en México”, *Agrociencia*, 39(4): ISSN:e 1405-3195
- [14] Gorriti, A.; Arroyo, J.; Negrón, L.; Jurado, B.; Purizaca, H.; Santiago, I. 2009. “Antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidantes de las corontas del maíz morado (*Zea mays L.*): método de extracción”, *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas medicinales y aromáticas*, 8 (6): ISSN:0717-7917
- [15] Giusti, M.; Wrolstad, R. 2001. “Characterization and measurement of anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy”, In *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*: doi:10.1002/0471142913.faf0102s00
- [16] Loreti, E.; Povero, G.; Novi, G.; Solfanelli, S.; Alpi, A.; Perata, P. 2008. “Gibberellins, jasmonate and abscisic modulate the sucrose-induced expression of anthocyanin biosynthetic genes in *Arabidopsis*” . *New Phytologist*, 179(4): doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02511.x.
- [17] Rodríguez, B. 2008. “Efecto de la disponibilidad de fósforo y variabilidad genética en las defensas constitutivas e inducidas con metil jasmonato: concentración foliar de fenoles totales en juveniles de *Pinus pinaster*”, Universidad de Santiago de Compostela, Departamento Escuela Politécnica Superior de Lugo, Trabajo de investigación: Santiago de Compostela.

- [18] Guo, J.; Han, W.; Wang, M.H. 2008. "Ultraviolet and Environmental Stresses Involved in the Induction and Regulation of Anthocyanin Biosynthesis: A review", *African Journal of Biotechnology*, 7(25): ISSN:1684-5315
- [19] Astrid, G. 2008. "Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión", *Acta Biol. Colom.*, 13(3)
- [20] Muñoz, C.; Maihua, R.; Peralta, F.; Tereschuk, M.; González, M.; Albarracín, P. 2009. "Análisis de antocianinas en arándanos del NOA (*Vaccinium corymbosum L.*)", Enlace: <http://www.fcailuncu.edu.ar/upload/04atc-coria-munoz-utn.pdf>, Universidad Nacional de Tucuman: Tucuman, Fecha de consulta: 04 abril 2013.
- [21] Liu, X.; Xiao, G.; Chen, W.; Xu, Y.; Wu, J. 2004. "Cuantitification and purification of mulberry anthocyanins with macroporous resins", *Journal of Biomedicine and biotechnology*, (5): doi:10.1155/S1110724304403052
- [22] Gómez, J.; Jiménez, V. 2011. "Producción *in vitro* de Antocianinas – Revisión", *Acta Biológica Colombiana*, 16 (1): ISSN:0120-548X
- [23] Namdeo, A. G. 2007. "Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolites: A Review", *Pharmacognosy Reviews*, 1 (1)
- [24] Miñano, A.; Chico, J.; López, E.; Sisniegas, M.; Bobadilla, M. 2004. "Efecto de la concentración de sacarosa en la producción de antocianinas a partir de cultivos celulares de *Vitis vinifera L.* var. redglove", *Rev Perú Biol*, 2 (11): ISSN:1727-9933
- [25] Deshmukh, R.; Wadegaonkar, V.; Bhagat, R.; Wadegaonkar, P. 2011. "Tissue specific expression of anthraquinones, flavonoids and phenolics in leaf, fruit and root

- suspension cultures of Indian Mulberry (*Morinda citrifolia L.*), *Journal of Plant Molecular Biology & Omics*, 4(1): ISSN:1836-3644
- [26] Pirie, A.; Mullins, M. 1976. "Changes in anthocyanin and phenolics content of grapevine leaf and fruit tissues treated with sucrose, nitrate, and abscisic acid", *Plant Physiology*, 58 (4): PMC543243
- [27] Steyn, W.; Wand, S.; Holcroft, D.; Jacobs, G. 2012. "Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection", *New Phytologist*, 155(3): doi:10.1046/j.1469-8137.2002.00482.x
- [28] Rudell, D.; Mattheis, J.; Fan, X.; Fellman, J. 2012. "Methyl Jasmonate Enhances Anthocyanin Accumulation and Modifies Production of Phenolics and Pigments in "Fuji apples", *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127(3): erm331v1-erm331
- [29] Comunicación personal. Antonio León Reyes, Universidad San Francisco de Quito, *Metodos de desinfección de semillas: Quito.*
- [30] Rakshit, S.; Zerka, R.; Sekhar, J.C.; Fatma, T.; Dass, S. 2010. "Callus induction and whole plant regeneration in elite Indian maize (*Zea mays L.*) inbreds", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 100 (1): doi:10.1007/s11240-009-9613-z

- [31] Shan, X.; Zhang, Y.; Peng, W.; Wang, Z.; Xie, D. 2009. "Molecular mechanism for jasmonate-induction of anthocyanin accumulation in *Arabidopsis*", *Journal of Experimental Botany*, 60(13): doi: 10.1093/jxb/erp223
- [32] Ram, M.; Prasad, K.; Singh, S.; Hada, B.; Kumar, S. 2013. "Influence of salicylic acid and methyl jasmonate elicitation on anthocyanin production in callus cultures of *Rosa hybrida L.*", *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*, 113(3): doi: 10.1007/s11240-013-0287-1
- [33] López, A. D.; Montalvo, E.; Andrade, I.; Gómez, J. 2011. "Inducción de antocianinas y compuestos fenólicos en cultivos celulares de jamaica (*Hibiscus sabdariffa L.*) *in vitro*", *Chapingo*, 17(2): ISSN:1027-152X
- [34] Castro, Ivonne. 2008. "Selección *in vitro* de maíz por tolerancia al estrés osmótico", *Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas, Colegio de postgraduados, Requisito parcial para obtener el grado de maestra en ciencias: Montecillo.*
- [35] Ulrychová, M.; Sosnová, V. 1970. "Effect of phosphorus deficiency on anthocyanin content in tomato plants", *Biologia Plantarum*, 12(3): doi:10.1007/BF02920805
- [36] García, L.; Pérez, J.; Torres, D.; Padrón, Y.; Romero, C. 2006. "Influencia de reguladores del crecimiento en la formación de los callo de *Phaseolus vulgaris L. cv. CIAP 7247*", *Bioteología Vegetal*, 6 (2): ISSN:1609-1841

- [37] Espinosa, A.; Silva, J.; Sariego, S.; Cholo, L.; Delgado, H. 2012. “Efecto del tipo de explante y la concentración de ácido 2,4-diclorofenoxiacético en la formación de callo en *Morus alba L.*”, *Pastos y Forrajes*, 35 (4): ISSN:0864-0394
- [38] Jakubekova, M.; Pretova, A.; Obert, B. 2011. “Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryo induced callus of maize (*Zea mays L.*)”, *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 1(4)
- [39] Matos, A.; Sánchez, A. 2010. “Evaluación de reguladores de crecimiento para la inducción de callo en *Aloe vera L.*”, Universidad de Sulia, Laboratorio de Citogenética Vegetal: Maracaibo.
- [40] Danson, J.; Lagat, M.; Mbogori, M. 2006. “Screening tropical maize lines for the production and regeneration of friable embryogenic type II callus”, *African Journal of Biotechnology*, 5(23): ISSN:1684–5315
- [41] González, G.; Pacheco, M.; Oneto, C.; Etchart, V.; Kandus, M.; Salerno, J.; Eyherabide, G.; Presello, D.; Lewi, D. 2012. “Somatic embryogenesis and plant regeneration capacity in Argentina maize (*Zea mays L.*) inbred lines”, *Electronic Journal of Biotechnology*, 15(1): doi:10.2225/vol15-issue1-fulltext-7
- [42] Pathi, K.; Tula, S.; Kamrul, K.; Kumar, V.; Tuteja, N. 2013. “An efficient and rapid regeneration via multiple shoot induction from mature seed derived embryogenic and organogenic callus of Indian maize (*Zea mays L.*)”, *Plant signaling & Behavior*, 8(10): doi:10.4161/psb.25891

- [43] Ghafoor, A.; Masood, A. 1994. "Response of maize inbreds to callus induction", *Pakistan J. Agric*, 15(1).
- [44] Shohael,A.M.; Akanda, M.A.L.; Parvaez, S.; Mahfuja, S.; Alam, M.F.; Islam, R.; Joarder, S. 2003." Somatic embryogenesis an plant regeneration from immature embryo derived callus of inbred maize (*Zea mays L.*)", *Biothecnology*, 2(2): ISSN:1682-2978
- [45] Ozeki, Y.; Komamine, A. 1986. "Effects of growth regulators on the induction of anthocyanin synthesis in carrot suspension cultures", *Plant & Cell Physiology*, 27(7): ISSN:1471-9053
- [46] Stickland, R. G.; Sunderland, N. 1971. "Production of anthocyanins flavonols and chlorogenic acid by cultured callus tissues of *Haplopappus gracilis*", *Annals of Botany*, 36(3): ISSN:1095-8290
- [47] Fehér, Attila; Pasternak, Taras; Dudits, Dénes. 2003. "Transition of somatic plant cells an embryogenic state", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74(3): ISSN: 0167-6857
- [48] Sarker, B. C.; Karmoker, J. 2011. "Effects of phosphorous deficiency on Accumulation of Biochemical Compounds in Lentil (*Lens culinaris medik*)", *Bangladesh Journal of Botany*, 40(1): doi:<http://dx.doi.org/10.3329/bjb.v40i1.7992>
- [49] Kim, J. S.; Lee, B.-H.; Kim, S.-H.; Oh, K.-H.; Cho, K.-Y. 2006. "Responses to Enviromental and Chemical Signals for Anthocyanin Biosynthesis in Non-Chlorophyllous Corn (*Zea mays L.*) Leaf", *Journal of Plant Biology*, 49 (1), 16-25: doi:10.1007/BF03030784

- [50] Shimizu, Y.; Maeda, K.; Kato, M.; Shimomura, K. 2010. "Methyl jasmonate induces anthocyanin accumulation in *Gynura bicolor* cultured roots", *In vitro Cellular and Development Biology-Plant*, 46(5): doi:10.1007/s11627-010-9294-7
- [51] Teng, S.; Keurentjes, J.; Bentsink, L.; Koornneef, M.; Smeekens, S. 2005. "Sucrose-specific induction of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* requires the MYB75/PAP1 GENE", *Plant Physiology*, 139 (4): doi:<http://dx.doi.org/10.1104/pp.105.066688>
- [51] Vinterhaltar, B.; Ninkovic, S.; Snezana, Z.K.; Subotic, A.; Vinterhalter, D. 2007. "Effect of Nitrogen Salts on the growth of *Ceratonia siliqua* L. shoot cultures", *Archives of Biological Sciences*, 59(3): doi:10.2298/ABS0703217V

ANEXOS

Anexo 1: Preparación de Medios.

MEDIO N6		
MACRONUTRIENTES	mg/L	STOCK X10 (g/L)
KNO ₃	2830	28.3
KH ₂ PO ₄	400	4
CaCl ₂ 2 H ₂ O	166	1.66
MgSO ₄ 2 H ₂ O	185	1.85
(NH ₄) ₂ SO ₄	463	4.63
MICRONUTRIENTES	mg/L	STOCK X100 (mg/L)
KI	0.8	80
H ₃ BO ₃	1.6	160
MnSO ₄ H ₂ O	3.3	330
ZnSO ₄ 7 H ₂ O	1.5	150
HIERRO	mg/L	STOCK X200 (mg/100ml)
FeSO ₄ 7 H ₂ O	27.85	557
Na ₂ EDTA	37.25	745
VITAMINAS	mg/L	STOCK X200 (mg/100ml)
GLICINA	2	40
TIAMINA HCl	1	20
PIRIDOXINA HCl	0.5	10
AC. NICOTINICO	0.5	10

MEDIO MS		
MACRONUTRIENTES	mg/L	STOCK X10 (g/L)
KNO ₃	1900	19
KH ₂ PO ₄	170	1.7
CaCl ₂ 2 H ₂ O	440	4.4
MgSO ₄ 2 H ₂ O	370	3.7
NH ₄ NO ₃	463	4.63
MICRONUTRIENTES	mg/L	STOCK X100 (mg/L)
KI	0.83	83
H ₃ BO ₃	6.2	620
MnSO ₄ H ₂ O	16.9	1690
ZnSO ₄ 7 H ₂ O	8.6	860
Na ₂ MoO ₄ 2 H ₂ O	0.25	25
CuSO ₄ 5 H ₂ O	0.025	2.5
CoCl ₂ 6 H ₂ O	0.025	2.5
HIERRO	mg/L	STOCK X200 (mg/100ml)
FeSO ₄ 7 H ₂ O	27.8	556
Na ₂ EDTA	37.2	744
VITAMINAS	mg/L	STOCK X200 (mg/100ml)
GLICINA	2	40
TIAMINA HCl	0.1	2
PIRIDOXINA HCl	0.5	10
AC. NICOTINICO	0.5	10
MIO-INOSITOL	100	2000

PARA 1 L DE N6 O MS	
MACROS	100ml
MICROS	10ml
HIERRO	10ml
VITAMINAS	10ml

- adicionar 3% de sacarosa y 15g de agarosa
- colocar los stocks correspondientes