

INDUCCIÓN DE ANTOCIANINAS Y COMPUESTOS FENÓLICOS EN CULTIVOS CELULARES DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.) *in vitro*

Alonso de Dios-López¹; Efigenia Montalvo-González²;
Isaac Andrade-González¹; Juan Florencio Gómez-Leyva^{1¶}

¹Laboratorio de Biología Molecular. Instituto Tecnológico de Tlajomulco, Jalisco. km 10 Carretera a San Miguel Cuyutlán, Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco. MÉXICO.

Correo-e: jfgleyva@hotmail.com (¶Autor para correspondencia).

²Instituto Tecnológico de Tepic. Avenida Tecnológico Núm. 2595, Fraccionamiento Lagos del Country, C. P. 63175. Tepic, Nayarit, MÉXICO.

RESUMEN

Las antocianinas representan un grupo de metabolitos vegetales responsables de la pigmentación del cáliz de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). El cultivo de tejidos vegetales se ha utilizado para la producción de metabolitos secundarios; sin embargo, el potencial de los cultivos de células vegetales para la producción de antocianinas es todavía limitado. En el presente estudio, se evaluaron diferentes inductores fitorreguladores como: ácido naftalenacético, ácido 2,4-diclorofenoxiacético, cinetina, así como ácido salicílico, jasmonato de metilo; deficiencia de nitrógeno y estrés osmótico para estimular la producción de antocianinas y compuestos fenólicos, en callos y células en suspensión *in vitro* de tres variedades de jamaica (China, Reyna y Blanca). El mayor contenido de compuestos fenólicos se obtuvo en callos de la variedad Reyna con 670 mg de equivalentes de ácido gálico·100 g⁻¹ de peso seco en condiciones de estrés osmótico. Se indujo la producción de antocianinas en callos de las variedades China y Reyna (94 y 161 µg·g⁻¹ de peso fresco, respectivamente) establecidos en medio MS suplementado con 7.5 mM de nitrógeno inorgánico. Mediante un análisis por RT-PCR en los callos que presentaron producción de antocianinas, se evidenció la expresión transcripcional de los genes que codifica para la antocianina sintasa y la flavonona-3'-hidroxilasa, sugiriendo que la fuente de nitrógeno regula los pasos finales en la ruta de biosíntesis de antocianinas en cultivos celulares de jamaica *in vitro*.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: RT-PCR, estrés, fitohormonas, metabolitos secundarios.

INDUCTION OF ANTHOCYANINS AND PHENOLIC COMPOUNDS IN CELL CULTURES OF ROSELLE (*Hibiscus sabdariffa* L.) *in vitro*

ABSTRACT

Anthocyanins are a group of plant metabolites responsible for the red pigmentation in calyx of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). The plant tissue culture has been used for the production of secondary metabolites; however, the potential of plant cell cultures for the production of anthocyanins is still limited. In the present study, an evaluation was made of different inducers of plant growth regulators such as: naphthaleneacetic acid, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, kinetin and salicylic acid, methyl jasmonate, nitrogen deficiency and osmotic stress to stimulate the production of anthocyanins and phenolic compounds in callus and suspension cells *in vitro* of three varieties of rosette (China, Reyna and White). The highest content of phenolic compounds in callus was obtained from the variety Reyna with 670 mg of gallic acid equivalents·100 g⁻¹ dry weight under osmotic stress conditions. It induced the production of anthocyanins in callus of the varieties China and Reyna (94 and 161 µg·g⁻¹ fresh weight, respectively) established on MS medium supplemented with 7.5 mM of inorganic nitrogen. Using a RT-PCR analysis in the calluses that showed production of anthocyanin, the transcriptional expression was shown of genes coding for anthocyanin and flavones synthase 3'-hydroxylase, suggesting that the nitrogen source regulates the final steps in the biosynthetic pathway of anthocyanins in cell cultures of roselle *in vitro*.

ADDITIONAL KEY WORDS: RT-PCR, stress, phytohormones, secondary metabolites

INTRODUCCIÓN

La jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) pertenece a la familia de las Malvaceas, produce cáliz rojos que pueden ser comestibles y empleados para la elaboración de bebidas (Clydesdale *et al.*, 1979). En el cáliz de la jamaica se acumula una gran cantidad de compuestos fenólicos, ácidos orgánicos, proantocianidinas, flavonoles, flavonas, flavononas, isoflavononas y antocianinas; de estas últimas las que se encuentran en mayor proporción son el 3-sambubiósido de delphinidina y 3-sambubiósido de cianidina (Galicia-Flores *et al.*, 2008). Las antocianinas son altamente reductoras, por lo que exhiben fuerte actividad antioxidante, su consumo puede proteger al organismo contra daños provocados por los radicales libres y la peroxidación de los lípidos (Tsai *et al.*, 2002). Otros estudios han reportado que su ingesta inhibe el desarrollo de algunos tipos de cáncer, enfermedades coronarias, arteriosclerosis y disminución de triglicéridos en pacientes con síndrome metabólico (Chen *et al.*, 2004; Hirunpanich *et al.*, 2006, Gurrola-Díaz *et al.*, 2010).

La biosíntesis de antocianinas y otros flavonoides sigue la ruta de los fenilpropanoides, que inicia con la condensación de la fenilalanina y acetato por acción de la enzima *fenilalanina amonio liasa* (PAL), para producir el 4-cumaroil CoA, posteriormente, la *chalcona sintasa* (CHS) condensa los precursores malonil CoA y 4-coumaril CoA para formar chalcona. Este compuesto intermediario C15 es transformado en una flavanona por la *chalcona isomerasa* (CHI) para producir la naringenina. Finalmente, la flavanona es transformada en la correspondiente antocianina por una reacción de hidroxilación en el carbono C3 seguido por una deshidratación (Zhang *et al.*, 2004). La molécula de antocianina es estabilizada por glicosilación, por acción de una glicosil transferasa.

Existen dos clases de genes que regulan la expresión de antocianinas; los estructurales que codifican las enzimas que participan directamente en la formación de los compuestos fenólicos y los genes regulatorios que controlan la transcripción de los genes estructurales (Fennema, 2000). La regulación de ambos tipos de genes está dada por diferentes factores como la exposición a la luz, el régimen hormonal, estrés osmótico o la deficiencia de nitrógeno o fósforo (Hirasuna *et al.*, 1991; Krisa *et al.*, 1999; Cormier *et al.*, 1990; Do y Cormier 1991).

El potencial de los cultivos de células vegetales *in vitro* para la producción de antocianinas es todavía limitado, debido fundamentalmente a factores que determinan una baja productividad de compuestos de interés. Este problema puede ser superado por la selección de líneas celulares altamente productivas, optimización de condiciones ambientales (temperatura, pH, luz), los componentes del medio (metales, sacarosa, sales, aminoácidos y fitoreguladores) provocando un estrés abiótico o la densidad del inóculo (Zhong y Yoshida, 1995; Luczkiewicz y Cisowski, 2001).

INTRODUCTION

Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) belongs to the family of the Malvaceas, producing red calyces that may be consumed and used for the elaboration of drinks (Clydesdale *et al.*, 1979). In the calyx of the roselle there is an accumulation of a large quantity of phenolic compounds, organic acids, protoanthocyanidins, flavonols, flavons, flavonones, isoflavonones and anthocyanins; of the latter, those that are found in highest proportion are 3-sambubioside of delphinidin and 3-sambubioside of cyanidin (Galicia-Flores *et al.*, 2008). The anthocyanins are highly reductive, thus they exhibit strong antioxidant activity, their consumption can protect the organism against damages provoked by the free radicals and the peroxidation of the lipids (Tsai *et al.*, 2002). Other studies have reported that their ingestion inhibits the development of some types of cancer, coronary diseases, arteriosclerosis and reduction of triglycerides in patients with metabolic syndrome (Chen *et al.*, 2004; Hirunpanich *et al.* 2006; Gurrola-Díaz *et al.*, 2010).

The biosynthesis of anthocyanins and other flavonoids follows the path of the phenylpropanoids, that starts with the condensation of the phenylalanine and acetate from the action of enzyme *phenylalanine ammonium lyase* (PAL), for producing 4-cumaroil CoA, later, *chalcone synthase* (CHS) condenses the precursors malonyl CoA and 4-coumaril CoA to form chalcone, This intermediary compound C15 is transformed into a flavonone by *chalcone isomerase* (CHI) to produce naringenin. Finally, the flavonone is transformed into the corresponding anthocyanin by a reaction of hydroxylation in carbon C3 followed by a dehydration (Zhang *et al.*, 2004). The anthocyanin molecule is stabilized by glycosilation by the action of a transferase glycosil.

There are two classes of genes that regulate the expression of anthocyanins; the structural genes that codify the enzymes that participate directly in the formation of the phenolic compounds and the regulatory genes that control the transcription of the structural genes (Fennema, 2000). The regulation of both types of genes is given by different factors such as the exposure to light, the hormonal regimen, osmotic stress or the deficiency of nitrogen or phosphorus (Hirasuna *et al.*, 1991; Krisa *et al.*, 1999; Cormier *et al.*, 1990; Do and Cormier, 1991).

The potential of the cultures of plant cells *in vitro* for the production of anthocyanins is still limited, principally due to factors that determine a low productivity of compounds of interest. This problem can be overcome by the selection of highly productive cell lines, optimization of environmental conditions (temperature, pH, light), the components of the medium (metals, saccharose, salts, aminoacids and phyto regulators) provoking abiotic stress or the density of the inoculum (Zhong and Yoshida, 1995; Luczkiewicz and Cisowski, 2001).

The objective of the present study was to determine the effect of different phyto regulators and evokers such as osmotic stress and mineral deficiency with the purpose of

El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de diferentes fitoreguladores y evocadores como estrés osmótico y la deficiencia mineral con la finalidad de incrementar la concentración de antocianinas y compuestos fenólicos empleando callos y células en suspensión de jamaica *in vitro*; así como evaluar la expresión transcripcional de algunos genes que codifican para las enzimas involucradas en la ruta de biosíntesis de antocianinas en jamaica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron tres variedades de jamaica: dos con pigmento rojo en cáliz (Reyna y China) del banco de germoplasma de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nayarit y una variedad incolora (Blanca) del laboratorio de Biología Molecular del Instituto Tecnológico de Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco.

Establecimiento de jamaica *in vitro*

Se tomaron 150 semillas de cada variedad y fueron lavadas con agua jabonosa por 20 min. Posteriormente, se adicionaron 50 mL de una solución de hipoclorito de sodio al 50 %, (v/v) en agitación por 2 h. Después de este proceso se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se sembraron en el medio de MS (Murashige y Skoog, 1962) a pH 5.7, gelificado con 2 g·L⁻¹ de gelRite®.

Producción del callo friable y establecimiento de células en suspensión

Se tomaron secciones de hoja de aproximadamente 5 mm² de plántulas germinadas *in vitro* de las tres variedades y se colocaron en medio MS sólido suplementado con 2 mg·L⁻¹ de 2,4-D y 0.5 mg·L⁻¹ de 6-bencilaminopurina (BAP), como medio de mantenimiento de callos (MC). Los explantes se incubaron en una cámara de crecimiento a una temperatura de 25 °C y un fotoperiodo de 16 h luz. Se realizaron resiembras cada dos semanas hasta obtener callos friables (Gómez-Leyva et al., 2008). Para la producción de células en suspensión, se adicionaron 5 g de callos friables de las variedades rojas (China y Reyna) en 50 mL de medio MS líquido con la misma relación hormonal mencionada anteriormente y se mantuvieron en agitación constante a 100 rpm por tres semanas a 27 °C.

Inducción de antocianinas y compuestos fenólicos en callos y capa celular de jamaica *in vitro*.

Se realizaron dos ensayos diferentes para la inducción de antocianinas y fenoles: Ensayo 1. Se utilizó medio de MC adicionado con los siguientes estimuladores: sacarosa a una concentración de 60, 90 y 120 g·L⁻¹; jasmonato de metilo a 10, 100 y 200 µM; ácido naftalenacético (ANA) a 1, 2 y 4 mg·L⁻¹; ácido salicílico a 0.01, 0.1 y 1 mM y cinetina a 1, 5 y 10 mM. En cada caja se colocaron tres callos friables del mismo peso de cada una de las variedades de

increasing the concentration of anthocyanins and phenolic compounds employing calluses and cells in suspension of roselle *in vitro*; as well as to evaluate the enzymes involved in the pathway of biosynthesis of anthocyanins in roselle.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Three varieties of roselle were used: two with red pigment in calyx (Reyna and China) of the germplasm bank of the Facultad de Agronomía of the Universidad Autónoma de Nayarit and a colorless variety (White) of the laboratory of Molecular Biology of the Instituto Tecnológico de Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco.

Establishment of roselle *in vitro*

150 seeds of each variety were taken and washed with soapy water for 20 min. Afterwards, 50 mL of a solution of sodium hypochlorite at 50 % (v/v) were added in agitation for 2 h. After this process, the seeds were rinsed three times with sterile distilled water and were sown in the solution of MS (Murashige and Skoog, 1962) at pH 5.7, gelled with 2 g·L⁻¹ of gelRite®.

Production of friable callus and establishment of cells in suspension

Leaf sections of approximately 5 mm² were taken of germinated seedlings *in vitro* of the three varieties, and were placed in solid MS medium supplemented with 2 mg·L⁻¹ of 2,4-D and 0.5 mg·L⁻¹ of 6-benzylaminopurine (BAP) as maintenance medium of calluses (MC). The explants were incubated in a growth chamber at a temperature of 25 °C and a photoperiod of 16 h light. Reseedings were carried out every two weeks until friable calluses were obtained (Gómez-Leyva et al., 2008). For the production of cells in suspension, 5 g of friable calluses were added of the red varieties (China and Reyna) in 50 mL of MS liquid medium with the same hormonal relationship mentioned previously and were maintained in constant agitation at 100 rpm for three weeks at 27 °C.

Induction of anthocyanins and phenolic compounds in calluses and cell layer of roselle *in vitro*

Two different assays were carried out for the induction of anthocyanins and phenols: Assay 1. MC medium was used added with the following stimulators: saccharose at a concentration of 60, 90 and 129 g·L⁻¹; methyl jasmonate at 10, 100 and 200 µM; naphthalenacetic acid (ANA) at 1, 2 and 4 mg·L⁻¹; salicylic acid at 0.01, 0.1 and 1 mM and kinetin at 1, 5 and 10 mM. In each case three friable calluses were placed of the same weight of each one of the varieties of roselle, having as control the calluses in the MC medium without inducers.

jamaica, teniendo como testigo los callos en el medio MC sin inductores.

Ensayo 2. El segundo ensayo consistió en la formación de callos a partir de una capa delgada de células, siguiendo la metodología propuesta por Santacruz-Ruvalcaba y Portillo (2009), para lo cual se tomó 1 mL de las células en suspensión de jamaica y se adicionaron al medio MC sólido los siguientes inductores: sacarosa a 60, 90 y 120 g·L⁻¹; ácido salicílico a 0.01, 0.1 y 1 mM; nitrógeno inorgánico ajustado a 7.5, 15 y 30 mM y ácido 2,4-diclorofenoxiacético a 4, 6 y 8 mg·L⁻¹. El tratamiento testigo, se preparó agregando 1 mL de la célula en el medio MC sin inductores.

Para el primer ensayo los datos se analizaron por variedad con un diseño experimental 3x5 con tres repeticiones. Para el segundo ensayo los datos se analizaron por variedad con un diseño experimental 3x4 con tres repeticiones. Todos los tratamientos se incubaron a 25 °C con un fotoperiodo de 16 h luz durante ocho semanas. Las variables evaluadas al final del tiempo de experimentación fueron: fenoles totales, antocianinas totales y el análisis de la expresión mediante RT-PCR de los genes antocianina sintasa (ans), flavonona-3'-hidroxilasa (f3'h), flavonona-3'-5'-hidroxilasa (f3'5'h) y dihidrofavona-4-reductasa (dfr). Se realizó un análisis de varianza y prueba de medias con el método de Tukey a $P \leq 0.05$ empleando el paquete estadístico SAS System versión 9.0.

Cuantificación de fenoles totales

Se emplearon 2 g de callos y 1 mL del filtrado de células, las cuales fueron secadas a 45 °C por 24 h. La materia seca fue colocada separadamente en un tubo y se agregaron 10 mL de solución de extracción (metanol al 50 %) en relación 1:5 (p/v). La extracción se llevó a cabo durante 48 h a 4 °C en oscuridad (Vinson *et al.*, 1999). El extracto obtenido se utilizó para la cuantificación de fenólicos totales mediante el método de Folin-Ciocalteu (Waterman y Mole, 1994), que consiste en mezclar 200 µL del extracto, 10 µL solución Folin-Ciocalteu (0,2 N) y 5 mL de Na₂CO₃ (75 g·L⁻¹). La mezcla se homogeneizó y se mantuvo a 45 °C por 15 min; una vez fría se midió la absorbancia a 765 nm. La lectura de cada muestra fue comparada con una curva estándar de ácido gálico (40 a 200 mg·L⁻¹). Los resultados fueron expresados como mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100 gramos de peso seco.

Extracción y cuantificación de antocianinas

Dos gramos de tejido callosos pigmentado fueron macerados en nitrógeno líquido, al polvo obtenido se le adicionó metanol acidificado al 0.01 % con ácido clorhídrico en proporción 1:10, la mezcla se mantuvo en oscuridad por 24 h a 4 °C. Las antocianinas totales se cuantificaron empleando el método de diferencial de pH descrito por Giusti y Wrolstad (2001), en el cual se

Assay 2. The second assay consisted of the formation of calluses from a thin layer of cells, following the methodology proposed by Santacruz-Ruvalcaba and Portillo (2009), for which 1 mL was taken of the cells in suspension of roselle, and the following inducers were added to the solid MC medium: saccharose at 60, 90 and 120 g·L⁻¹; salicylic acid at 0.01, 0.1 and 1 mM; inorganic nitrogen adjusted to 7.5, 15 and 30 mM and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid at 4, 6 and 8 mg·L⁻¹. The control treatment was prepared by adding 1 mL of the cells in the MC medium without inducers.

For the first assay the data were analyzed by variety with a 3x5 experimental design with three replicates. For the second assay the data were analyzed by variety with a 3x4 experimental design with three replicates. All of the treatments were incubated at 25 °C with a photoperiod of 16 h light during eight weeks. The variables evaluated at the end of the experimentation time were total phenols, total anthocyanins and the analysis of the expression by means of RT-PCR of the genes anthocyanin synthase (ans.), flavonone-3'-hydroxylase (f3'h), flavonone-3'-5'-hydroxylase (f3'5'h) and dihydrofavone-4-reductase (sfr). An analysis of variance was made, along with a means test with the Tukey method at $P \leq 0.05$ using the statistical package SAS System version 9.0.

Quantification of total phenols

2 g of calluses were used and 1 mL of cell filtrate, which were dried at 45 °C for 24 h. The dry matter was placed separately in a tube and 10 mL of extraction solution (methanol at 50 %) was added in a ratio of 1:5 (p/v). The extraction was carried out during 48 h at 4 °C in darkness (Vinson *et al.*, 1999). The extract obtained was used for the quantification of total phenols by means of the method of Folin-Ciocalteu (Waterman and Mole, 1994), which consists of mixing 200 µL of the extract, 10 µL of Folin-Ciocalteu solution (0,2 N) and 5 mL of Na₂CO₃ (75 g·L⁻¹). The mixture was homogenized and maintained at 45 °C for 15 min; once it was cold the absorbance was measured at 765 nm. The reading of each sample was compared with a standard curve of gallic acid 840 to 200 mg·L⁻¹. The results were expressed as mg equivalent to gallic acid (EAG) per 100 grams of dry weight.

Extraction and quantification of anthocyanins

Two grams of pigmented callus tissue were macerated in liquid nitrogen, to the obtained powder, acidified methanol was added at 0.01 % with hydrochloric acid at a proportion of 1:10; the mixture was maintained in darkness for 24 h at 4 °C. The total anthocyanins were quantified employing the method of differential of pH described by Giusti and Wrolstad (2001), in which two buffering solutions were employed (KCl, 0.025N Ph 1.0 and CH₃COONa·3H₂O 0.4M at pH 4.5). Two dilutions (1:50) of each extract were prepared in each one of the buffers. The dilutions were stabilized for 15 min and the absorbance of each dilution was registered at 520 and 700 nm. The concentration of monomeric anthocyanins

emplearon dos soluciones amortiguadoras (KCl, 0.025N pH 1.0 y $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.4M a pH 4.5). Dos diluciones (1:50) de cada extracto fueron preparadas en cada uno de los amortiguadores. Las diluciones se estabilizaron por 15 min y la absorbancia de cada dilución fue registrada a 520 y 700 nm. La concentración de antocianinas monoméricas se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Antocianinas totales (mg}\cdot\text{L}^{-1}) = A \cdot \text{PM} \cdot \text{FD} \cdot 1000 \cdot \epsilon^{-1}$$

donde: PM = peso molecular de antocianina como 3-glucósido de cianindina, 449.2; FD = factor de dilución (50); ϵ = coeficiente de extinción 26,900 y el valor A se obtuvo con la ecuación: $A = (A520 - A700)_{\text{pH}1.0} - (A520 - A700)_{\text{pH}4.5}$. Los resultados fueron expresados en mg de antocianinas totales $\cdot\text{g}^{-1}$ de peso fresco.

Análisis de la expresión transcripcional

Para la extracción de ARN total, se trituraron 0.1 g de muestra pigmentada y no pigmentada con nitrógeno líquido y se adicionaron 750 μL de buffer de extracción (CTAB 2 %, PVP 2 %, Tris-HCl 100 mM (pH 8.0), EDTA 25 mM, NaCl 2.0 M, β -mercaptoetanol 10 mM), se incubó por 10 min a 65 °C, se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min a 4 °C y se adicionó al sobrenadante una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) en dos ocasiones. El sobrenadante obtenido se centrifugó a 13,000 rpm y se adicionó $\frac{1}{4}$ de volumen de LiCl 10 M. Se dejó precipitar toda la noche a 4 °C y el pellet formado se lavó con 500 μL de etanol absoluto frío; se centrifugó brevemente y se retiró el etanol. El ARN se redisolvió en 100 μL de buffer SSTE [NaCl 1 M, SDS 0.5 %, Tris-HCl 10 mM (pH 8.0), EDTA 1 mM (pH 8.0)] y se extrajo una vez más con una mezcla de fenol saturado pH 8.0:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1 v/v/v) y una vez con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1 v/v). Después se adicionaron dos volúmenes de etanol absoluto al sobrenadante, dejando precipitar a -20 °C por 2 h. Se centrifugó a 14,000 rpm por 20 min a 4 °C, se lavó el pellet con etanol al 70 % y se dejó secar al aire por 1 h. Por último el ARN se resuspendió en 300 μL de agua tratada con dietil pirocarbonato [DEPC] (Jaakola *et al.*, 2001).

Síntesis de ADN complementario (ADNc)

Para la síntesis de ADNc se empleó el kit SuperScript® III First-Strand Synthesis System RT-PCR (Invitrogen). Se realizó una reacción de un volumen final de 10 μL , se mezclaron los siguientes componentes: ARN (100 ng), oligonucleótidos (dT) 5 μM y dNTP's 1 mM. La mezcla se incubó a 65 °C por 5 min y se enfrió en hielo por un minuto. Después se preparó la siguiente reacción hasta un volumen final de 10 μL : amortiguador RT 1X, MgCl_2 2.5 mM, DTT 10 mM, ARNasa OUT 40U, Super Script III RT 200 U. Se mezclaron ambas reacciones y se incubaron por 50 min a 50 °C, la reacción se detuvo a 85 °C por 5 min y se enfrió en hielo por un minuto. Finalmente, se adicionó 1 μL de ARNasa H incubándose por 20 min a 37 °C.

was determined through the following equation:

$$\text{Total anthocyanins (mg}\cdot\text{L}^{-1}) = A \cdot \text{PM} \cdot \text{FD} \cdot 1000 \cdot \epsilon^{-1}$$

where: PM = molecular weight of anthocyanin as 3-glucoside of cyaniding, 449.2; FD = dilution factor (50); ϵ = coefficient of extinction 26,900 and the value A was obtained with the equation $A = (A520 - A700)_{\text{pH}1.0} - (A520 - A700)_{\text{pH}4.5}$. The results were expressed in mg of total anthocyanins $\cdot\text{g}^{-1}$ of fresh weight.

Analysis of the transcriptional expression

For the extraction of the total ARN, 0.1 g of pigmented and non-pigmented sample was triturated with liquid nitrogen and 750 μL of extraction buffer (CTAB 2 %, PVP 2 %, Tris-HCl 100 mM (pH 8.0), EDTA 25 mM, NaCl 2.0 M, β -mercaptoethanol 10 mM) were added, was incubated for 10 min at 65 °C, was centrifuged at 10,000 rpm for 10 min at 4 °C and a mixture of chloroform:isoamyl alcohol (24:1) was added to the supernatant on two occasions. The supernatant thus obtained was centrifuged at 13,000 rpm and $\frac{1}{4}$ of volume of LiCl 10 M was added. It was left to precipitate all night at 4 °C and the pellet formed was washed with 500 μL of absolute cold ethanol; it was centrifuged briefly and the ethanol was removed. The ARN was re-dissolved in 100 μL of SSTE buffer [NaCl 1 M, SDS 0.5 %, Tris-HCl 10 mM (pH 8.0), EDTA 1 mM (pH 8.0)] and was extracted once more with a mixture of saturated phenol pH 8.0:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1 v/v/v) and once with chloroform: isoamyl alcohol (24:1 v/v). Then two volumes of absolute ethanol were added to the supernatant, letting it precipitate at -20 °C for 2 h. It was centrifuged at 14,000 rpm for 20 min at 4 °C, the pellet was washed with ethanol at 70 % and it was left to air dry for 1 h. Finally the ARN was re-suspended in 300 μL of water treated with dietil pyrocarbonate [DEPC] (Jaakola *et al.*, 2001).

Synthesis of complementary DNA (DNAc)

For the synthesis of DNAc we used the SuperScript® III First-Strand Synthesis System RT-PCR (Invitrogen). A reaction was carried out of a final volume of 10 μL , and the following components were mixed: RNA (100 ng), oligonucleotides (dT) 5 μM and Dntp'S 1 mM. The mixture was incubated at 65 °C for 5 min and was cooled on ice for one minute. Then the following reaction was prepared until reaching a final volume of 10 μL ; buffer RT 1X, MgCl_2 2.5 mM, DDT 10 mM, RNAsa OUT 40U, Super Script III RT 200 U. Both reactions were mixed and incubated for 50 min at 50 °C, the reaction was detained at 85 °C for 5 min and cooled on ice for one minute. Finally, 1 μL of RNAasa H was added, and incubated for 20 min at 37 °C.

Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

The reaction of RT-PCR was carried out in a final volume of 25 μL with the following components in the reaction mixture: MgCl_2 2 mM, dNTP 0.2 μM , 10 pmol of

Reacción en Cadena de la Polimerasa en Transcripción Reversa (RT-PCR)

La reacción de RT-PCR se realizó en un volumen final de 25 μ L con los siguiente componentes en la mezcla de reacción: MgCl₂ 2 mM, dNTP 0.2 μ M, 10 pmol de cada oligonucleótido (específicos para los genes: *ans*, *f3'h*, *f3'5'h* y *dfr*), 2.5 U Taq ADN polimerasa y 2 μ L de ADNc. La amplificación se realizó empleando el siguiente programa en un termociclador marca Techne PT-100: desnaturalización inicial a 94 °C por 2 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineamiento a 52 °C por 1 min, extensión a 72 °C por 2 min y una extensión final a 72 °C por 7 min. Los productos de amplificación fueron separados en un gel de agarosa al 1.2 % y teñidos con bromuro de etidio. Los oligonucleótidos empleados fueron diseñados con el programa PeriPrimer V1.1.15 basadas en regiones homólogas de las proteínas reportadas para cada gen:

f3'h (F 5'ATGAYDMAGAAYTAYGGHCC,
R=5'CTTGDAHYTCHAYCCAARRD);
f3'5'h (F=5'GCWARAGCGTTCYTSAAAAC,
R=5'ATAAKCATSAAHAGGKAGSCMW),
dfr (F=5'DTTTCAYRTGGHACDCCTYT,
R=5'ACWGGGRAYGTCRTRYTCYAT)
ans (F5'RGAVGCMGCNDTSGANTGGGG,
R=5'AANACNGCCCAHGAAAYTMACC).

Donde: N=A, C, G, o T; K= G o T; V= A, C, ó G; B=C, G, ó T; R=A, o G; H=A, C, ó T; Y=C o T; D=A, G, ó T; S=C o G; M=A ó C; W=A ó T.

each oligonucleotide (specific for the genes: *ans*, *f3'h*, *f3'5'h* and *dfr*), 2.5 U Taq DNA polymerase and 2 μ L of DNAc. The amplification was made employing the following program in a Techne PT-100 thermocycler: initial denaturalization at 94 °C for 2 min, followed by 35 denaturalization cycles at 94 °C for 1 min, alignment at 52 °C for 1 min, extension to 72 °C for 2 min and a final extension at 72 °C for 7 min. The amplification products were separated in an agarose gel at 1.2 % and stained with etidium bromide. The oligonucleotides that were used were designed with the program PeriPrimer V1. 1. 15 based on homologous regions of the proteins reported for each gene:

f3'h (F 5'ATGAYDMAGAAYTAGGHCC,
R = 5'CTTGDAHYTCHAYCCAARRD);
f3'5 h (F = 5'GCWARAGCGTTCYTSAAAAC,
R = 5'ATAAKCATSAAHAGGKAGSCMW),
dfr (F = 5'DTTTCAYRTGGHACDCCTYT,
R = 5'ACWGGGRAYGTCRTRYTCYAT)
ans (F5'RGAVGCMGCNDTSGANTGGGG,
R = 5'AANACNGCCCAHGAAAYTMACC).

Where: N= A, C, G or T; K= G or T; V=A, C, or G; b=c, g or t; R=A, or G; H=A, C, or T; Y=C or T; S=C or G; M=A or C; W=A or T.

CUADRO 1. Contenido de compuestos fenólicos en callos de jamaica de las variedades China, Reyna y Blanca a las ocho semanas de inducción.

TABLE 1. Content of phenolic compounds in roselle calluses of the varieties China, Reyna and Blanca at eight weeks of induction.

Tratamiento	mg EAG-100 g ⁻¹ de materia seca		
	China	Reyna	Blanca
Sac 60 g·L ⁻¹	290.70 ef ²	670.67 a	116.22 g
Sac 90 g·L ⁻¹	315.38 de	350.37 bcde	317.75 def
Sac 120 g·L ⁻¹	204.90 f	342.14 bcde	229.66 fg
Jas Met 10 μ M	448.52 bc	424.64 bcd	533.63 ab
Jas Met 100 μ M	435.61 bc	487.14 b	634.29 a
Jas Met 200 μ M	370.86 bcd	430.19 bcd	347.62 cdef
ANA 1 mg·L ⁻¹	273.64 ef	227.92 f	235.06 fg
ANA 2 mg·L ⁻¹	282.32 ef	335.36 cde	312.55 def
ANA 4 mg·L ⁻¹	206.53 f	301.20 ef	293.08 def
Ac Salic 0.01 mM	450.79 bc	459.41 bcd	613.07 a
Ac Salic 0.1 mM	315.87 de	480.20 bc	342.89 def
Ac Salic 1 mM	518.58 b	411.10 bce	500.06 abc
Cinetina 1 mM	641.28 a	315.61 def	245.01 efg
Cinetina 5 mM	287.93 ef	454.69 bcd	392.06 bcde
Cinetina 10 mM	420.33 abc	356.35 bcd	390.57 bcde
Testigo	428.57 bc	322.34 def	421.40 bcd
CV(%)	7.23	9.23	10.42

²Valores con la misma letra dentro de factor en cada columna son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a una P \leq 0.05.

CV: Coeficiente de Variación, Sac: sacarosa, Jas Met: Jasmonato de metilo, ANA: ácido naftelénacético, Ac Salic: ácido salicílico. EAG: Equivalentes de Ácido Gálico.

²Values with the same letter within factor in each column are equal according to the Tukey test at P \leq 0.05.

CV: Coefficient of Variation, Sac: saccharose, Jas Met: Methyl jasmonate, ANA: naphthalenacetic acid, Ac Salic: salicylic acid; EAG: Equivalentents of Gallic Acid.

CUADRO 2. Contenido de compuestos fenólicos en callos generados a partir de una capa de células de jamaica de las variedades China y Reyna a las ocho semanas de inducción.

TABLE 2. Content of phenolic compounds in calluses generated from a layer of cells of roselle of the varieties China and Reyna at eight weeks from induction.

Tratamientos	Fenólicos totales		Antocianinas totales	
	mg EAG·100 g ⁻¹ de peso seco		μg g ⁻¹ de peso fresco	
	China	Reyna	China	Reyna
Sac 60 g·L ⁻¹	60.21 b ²	73.35 def	nd	nd
Sac 90 g·L ⁻¹	52.47 b	47.29 de	nd	nd
Sac 120 g·L ⁻¹	83.63 ab	39.75 e	nd	nd
Ac Salic 0.01 mM	111.69 ab	75.64 bcd	nd	nd
Ac Salic 0.1 mM	126.00 ab	80.30 abc	nd	nd
Ac Salic 1 mM	125.98 ab	82.34 abc	nd	nd
Nitrogéno 7.5 mM	72.43 ab	73.56 bcd	94.6	161.1
Nitrógeno 15 mM	69.21 ab	72.68 def	nd	nd
Nitrógeno 30 mM	52.19 b	59.90 cde	nd	nd
2,4-D 4 mg·L ⁻¹	114.96 ab	82.22 abc	nd	nd
2,4-D 6 mg·L ⁻¹	76.88 ab	94.18 ab	nd	nd
2,4-D 8 mg·L ⁻¹	149.73 a	95.44 ab	nd	nd
Testigo	83.90 bcd	111.17 a	nd	nd
CV (%)	24.98	11.68	0	0

²Valores con la misma letra dentro de factor en cada columna son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

CV: Coeficiente de Variación, Sac: sacarosa, Ac Salic: ácido salicílico. EAG: equivalentes de ácido gálico, nd: no detectado

²Values with the same letter within factor in each column are equal according to the Tukey test at $P \leq 0.05$.

CV: Coefficient of Variation; Sac: saccharose; Ac Salic: salicylic acid, EAG: Equivalent of Gallic Acid, nd: not detected.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Acumulación de compuestos fenólicos en callos friables de jamaica

Al emplear callos friables completos en el primer ensayo, no se indujo pigmentación en ninguno de los tratamientos; sin embargo, sí se indujo la producción de compuestos fenólicos (Cuadro 1). En los tratamientos testigo se encontraron 428.57, 322.34 y 421.49 mg EAG·100 g⁻¹ de peso seco de las variedades China, Reyna y Blanca, respectivamente; mientras que el mayor contenido de fenoles totales se presentó en la variedad China con 642.28 mg EAG·100 g⁻¹ peso seco al ser estimulado con cinetina a 1 mM; la variedad Reyna, 670.67 mg EAG·100 g⁻¹ peso seco a una concentración de 60 g·L⁻¹ de sacarosa, mientras que en la variedad Blanca se obtuvo 634.29 y 613.07 mg EAG·100 g⁻¹ peso seco inducidos por jasmonato de metilo a 100 μM y ácido salicílico 0.01 mM, respectivamente. El efecto de las citocininas como la cinetina promueve el desarrollo celular y algunos reportes han demostrado que la acumulación de antocianinas es inversamente proporcional a la tasa de crecimiento celular, esto puede explicar el hecho de que no se hayan sintetizado pigmentos y que el metabolismo se haya dirigido hacia la producción de biomasa y compuestos fenólicos (Gleitz y Seitz, 1989). La sacarosa mostró ser un buen inductor de compuestos fenólicos, este efecto se debe a que la sacarosa aumenta la presión osmótica en el medio de cultivo, disminuyendo la captación de nutrientes por la célula y bloqueando algunas rutas metabólicas, dirigiendo el metabolismo hacia la

RESULTS AND DISCUSSION

Accumulation of phenolic compounds in friable calluses of roselle

In using complete friable calluses in the first assay, pigmentation was not induced in any of the treatments; however, the production of phenolic compounds was induced (Table 1). In the control treatments 428.57, 322.34 and 421.49 mg EAG·100 g⁻¹ of dry weight were found of the varieties China, Reyna and Blanca, respectively; while the highest content of total phenols appeared in the variety China with 642.28 mg EAG·100 g⁻¹ dry weight when stimulated with kinetin at 1 mM; the variety Reyna, 670.67 mg EAG·100 g⁻¹ dry weight at a concentration of 60 g·L⁻¹ of saccharose, while in the variety Blanca 634.29 and 613.07 mg EAG·100 g⁻¹ dry weight induced by methyl jasmonate at 100 μM and salicylic acid 0.01 mM, respectively. The effect of the cytokinins such as kinetin promotes cell development, and some reports have demonstrated that the accumulation of anthocyanins is inversely proportional to the cellular growth rate. This can explain the fact that pigments have not been synthesized and that the metabolism has been directed toward the production of biomass and phenolic compounds (Gleitz and Seitz, 1989). The saccharose proved to be a good indicator of phenolic compounds. This effect is due to the fact that the saccharose increases osmotic pressure in the culture medium, reducing the capture of nutrients by the cell and blocking some metabolic pathways, directing the metabolism toward the biosynthesis of phenolic compounds (Cormier and Do, 1993). The production of

biosíntesis de compuestos fenólicos (Cormier y Do, 1993). La producción de metabolitos secundarios en respuesta a la elicitación es un fenómeno fisiológico de respuesta contra el ataque de patógenos, donde el ácido salicílico y el jasmonato de metilo juegan un papel importante generando un aumento en el flujo del canal de Ca^{2+} citoplasmático que es una parte esencial de la ruta de transducción de señales de estrés abiótico, lo cual induce a la síntesis de antocianinas y ácidos orgánicos (Grassmann *et al.*, 2002). Sin embargo, se ha demostrado también que el uso de jasmonato de metilo tiene un efecto negativo sobre la producción de antocianinas (Saigne-Soulard *et al.*, 2006). El ANA no mostró efecto en la síntesis de antocianinas, ni en el aumento de la producción de fenólicos totales en las tres variedades de jamaica, ya que se encontró incluso una menor cantidad de compuestos fenólicos que el tratamiento testigo, debido probablemente al efecto antagónico con otras fitohormonas sintetizadas naturalmente por el tejido (Ozeki y Komamine, 1986).

Inducción de compuestos fenólicos y antocianinas en callos generados a partir de una capa de células

En el ensayo 2 se obtuvo una respuesta distinta al empleo de masas callosas. En general, los tratamientos de sacarosa y bajas concentraciones de nitrato (Cuadro 2) limitan la producción de compuestos fenólicos respecto a los testigos, mientras que el ácido salicílico y el 2,4-D tienden a incrementar entre un 60 a 70 % en promedio el contenido de compuestos fenólicos en las líneas celulares de jamaica de las variedades China y Reyna. En el caso de las auxinas como el 2,4-D, se ha observado que éstas inducen la diferenciación de la células y disminuye la tasa de crecimiento celular promoviendo la síntesis de fenoles (Kokubo *et al.*, 2001).

Por otra parte, se observó una acumulación de antocianinas en callos de jamaica para las dos variedades rojas (Figura 1) al disminuir la concentración de nitrógeno inorgánico (NH_4NO_3 y KNO_3) en el medio MS, de 30 mM a 7.5 mM; mientras que el testigo no mostró pigmentación roja. La concentración de antocianinas en la variedad Reyna fue de 161 μg de antocianinas totales $\cdot\text{g}^{-1}$ de peso fresco, mientras que en la variedad China fue de 94.6 μg antocianinas $\cdot\text{g}^{-1}$ de peso fresco (Cuadro 2). El NH_4^+ está relacionado con el metabolismo secundario mientras que el NO_3^- tiene un efecto sobre la limitación del desarrollo celular, en este sentido la disponibilidad de amonio se convierte en un factor limitante, induciendo la acumulación de antocianinas cuando se disminuye la densidad celular (Rajendran *et al.*, 1992). Debido a las limitaciones de nitrógeno, la ruta metabólica puede detenerse y dirigirse hacia la producción de antocianinas desde un estado de desarrollo celular. Konczak-Islam *et al.* (2001), demostraron que una reducción en los niveles de nitrógeno hasta 7.5 mM causa un cambio en el tipo de antocianinas disminuyendo la glucosilación y aumentando los derivados acilados.

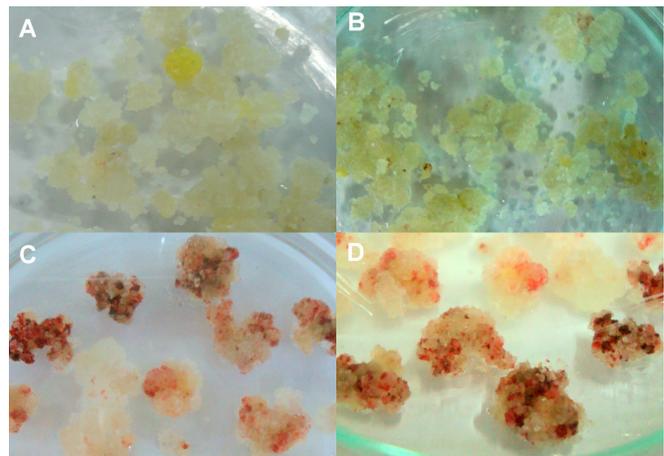


FIGURA 1. Callos no pigmentados generados a partir de una capa delgada de células de jamaica en medio MS con nitrógeno a una concentración de 7.5 mM. A y B variedad Reyna y Variedad China a las cuatro semanas de cultivo. C y D. Callos de jamaica de las variedades Reyna y China pigmentados a las ocho semanas de cultivo.

FIGURE 1. Non-pigmented calluses generated from a thin layer of cells of rosette in MS medium with nitrogen at a concentration of 7.5 mM. A and B variety Reyna and Variety China at four weeks of culture, C and D. Calluses of rosette of the varieties Reyna and China pigmented at eight weeks of culture.

secondary metabolites in response to the elicitation is a physiological phenomenon of response against the attack of pathogens, where salicylic acid and methyl jasmonate play an important role generating an increase in the flow of the channel of cytoplasmic Ca^{2+} , which is an essential part of the pathway of transduction of signals of abiotic stress, which induces the the synthesis of anthocyanins and organic acids (Grassman *et al.*, 2002). However, it has also been demonstrated that the use of methyl jasmonate has a negative effect on the production of anthocyanins (Saigne-Soulard *et al.*, 2006). The ANA did not have an effect on the synthesis of anthocyanins, nor on the increase of the production of total phenols in the three varieties of rosette, given that an even smaller amount of phenolic compounds was found that in the control treatment, probably due to the antagonistic effect with other phytohormones naturally synthesized by the tissue (Ozeki and Komamine, 1986).

Induction of phenolic compounds and anthocyanins in calluses generated from a layer of cells

In assay 2 a response was obtained that was different from the use of callus masses. In general, the treatments of saccharose and low concentrations of nitrate (Table 2) limit the production of phenolic compounds with respect to the controls, while the salicylic acid and the 2,4-D tend to increase by an average of 60 to 70 % the content of phenolic compounds in the cell lines of rosette of the varieties China and Reyna. In the case of the auxins such as the 2,4-D, it has been observed that these induce the differentiation of the cells and decrease the cellular growth rate, promoting the synthesis of phenols (Kokubo *et al.*, 2001).

Análisis de la expresión genética en callos de jamaica

En el análisis por RT-PCR, se obtuvo un fragmento de 490 pb para el gen de la flavonona-3' hidroxilasa (*f3'h*), a partir del cDNA de la variedad China no pigmentada, mientras que en la variedad Reyna pigmentada se observó un fragmento de mayor intensidad (Figura 2). La alta expresión del gen de la *f3'h* en la variedad China coincide con la mayor acumulación del pigmento observada en los callos. Las enzimas flavonona-3'-hidroxilasa y flavono-3'5'-hidroxilasa catalizan la hidroxilación de las flavononas a dihidroflavonoles (Leguizamón *et al.*; 2005); sin embargo, la expresión de estos genes en un tejido no pigmentado sugiere que la regulación de la pigmentación en la variedad China se lleva a cabo en etapas posteriores de la biosíntesis; por otro lado, el mismo gen se expresó en el tejido pigmentado de la variedad Reyna indicando que en esta variedad la pigmentación también puede estar regulada por la expresión de este gen, lo que hace aún más evidente las diferencias en la regulación genética entre las dos variedades.

En la expresión del gen que codifica para la antocianidina sintasa (*ans*) se obtuvo un fragmento de 400 pb (Figura 3) en células pigmentadas e incoloras de ambas variedades, mientras que ninguno de los tejidos mostró expresión para el gen de la enzima flavonon-3'5'hidroxilasa (*f3'5'h*). Este resultado sugiere que la pigmentación en jamaica puede estar controlada por genes regulatorios o estructurales implicados en las últimas etapas de la biosíntesis. Existe evidencia que el nitrógeno regula algunas rutas del metabolismo secundario incluyendo parte del metabolismo de los fenilpropanoides, flavonoides y antocianinas. En plantas de *A. thaliana* se demostró

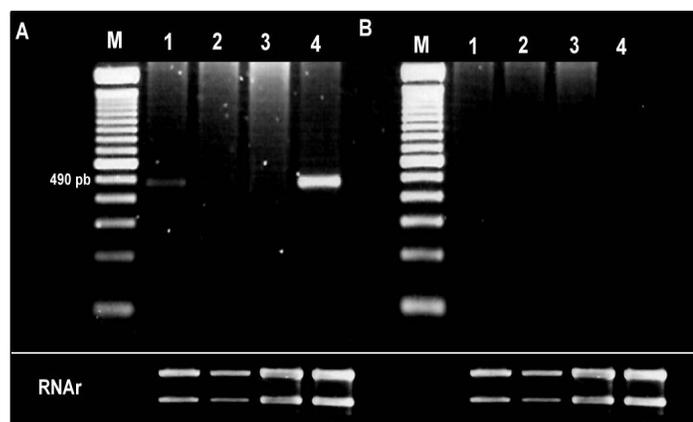


FIGURA 2. Expresión de gen *f3'h* (A) y *dfr* (B). Carriles: A1 y B1. Variedad China sin pigmentos. A3 y B3 Variedad China pigmentada. A2 y B2. Variedad Reyna sin pigmentos. A4 y B4 Variedad Reyna con pigmentos. ARNr como control de expresión.

FIGURE 2. Expression of gene *f3'h* (A) and *dfr* (B). Rows: A1 and B1. Variety China without pigments. A3 and B3 pigmented variety China. A2 and B2. Variety Reyna without pigments. A4 and B4 variety Reyna with pigments. ARNr as control of expression.

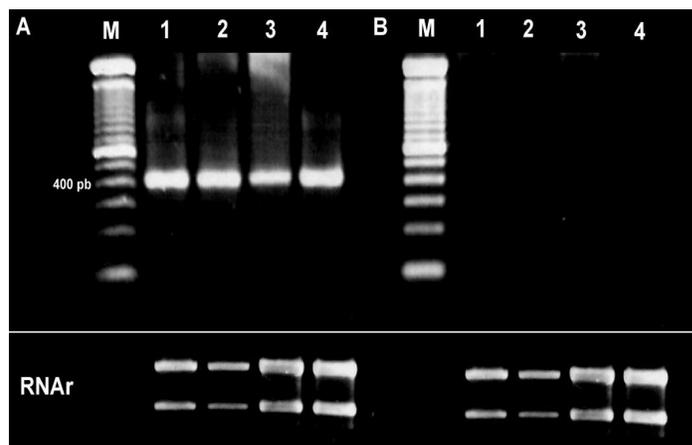


FIGURA 3. Expresión de gen *ans* (A) y *f3'5'h* (B). Carriles: A1 y B1. Variedad China sin pigmentos. A3 y B3 Variedad China pigmentada. A2 y B2. Variedad Reyna sin pigmentos. A4 y B4 Variedad Reyna con pigmentos. ARNr como control de expresión.

FIGURE 3. Expression of gene *ans* (A) and *f3'5'h* (B). Rows: A1 and B1. Variety China without pigments. A3 and B3 pigmented variety China. A4 and B4 Variety Reyna with pigments. ARNr as control of expression.

On the other hand, an accumulation of anthocyanins was observed in calluses of roselle for the two red varieties (Figure 1) by reducing the concentration of inorganic nitrogen (NH_4NO_3 and KNO_3) in the MS medium, from 30 mM to 7.5 mM; while the control did not exhibit red pigmentation. The concentration of anthocyanins in the variety Reyna was $161 \mu\text{g}$ of total anthocyanins $\cdot\text{g}^{-1}$ of fresh weight, whereas in the variety China it was $94.6 \mu\text{g}$ anthocyanins $\cdot\text{g}^{-1}$ of fresh weight (Table 2). The NH_4^+ is related with the secondary metabolism, while the NO_3^- has an effect on the limitation of cellular development. In this sense, the availability of ammonia becomes a limiting factor, inducing the accumulation of anthocyanins when cellular density decreases (Rajendran *et al.* 1992). Due to the limitations of nitrogen, the metabolic pathway may be halted and directed toward the production of anthocyanins from a state of cellular development. Konczak-Islam *et al.* (2001) demonstrated that a reduction in the levels of nitrogen of up to 7.5 mM causes a change in the type of anthocyanins, decreasing the glucosilation and increasing the acylated derivatives.

Analysis of genetic expression in calluses of roselle

In the analysis by RT-PCR, a fragment of 490 pb was obtained for the gene of the flavonone-3' hydroxylase (*f3'h*), from the cDNA of the non-pigmented variety of China, whereas in the pigmented variety of Reyna a fragment of greater intensity was observed (Figure 2). The high expression of the gene of the *f3'h* in the variety China coincides with the higher accumulation of the pigment observed in the calluses. The enzymes flavonone-3'-hydroxylase and flavones-3'5'-hydroxylase catalyze the hydroxylation of the flavonones to de-hydroflavonoles

que la adición de nitrógeno en sus formas de KNO_3 y NH_4NO_3 reprimen rápidamente los genes de la biosíntesis de antocianinas junto con un descenso en los niveles de la fenilalanina (Scheible *et al.*, 2004), lo cual coincide con los resultados encontrados en las líneas celulares de jamaica. Se sabe que algunos factores de transcripción como PAP1 (Production Antocyanin Pigment) están involucrados en la expresión de genes de la ruta de biosíntesis de antocianinas y pueden ser estimulados por sacarosa, la cual actúa como molécula de señalización (Borevits *et al.*, 2000).

CONCLUSIONES

Se indujo la formación de callos de Jamaica a partir de segmentos de hojas y células en suspensión en el medio de cultivo MS adicionado con $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D y $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP. La mayor cantidad de compuestos fenólicos en callo se presentó al emplear los inductores: cinetina (1 mM) para la variedad China, sacarosa ($60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) para la variedad Reyna, así como ácido salicílico (0.01 mM) y jasmonato de metilo ($100 \mu\text{M}$) para la variedad Blanca. La disminución en la concentración de nitrógeno inorgánico de 30 mM a 7.5 mM, estimuló la biosíntesis y acumulación de antocianinas en las variedades de jamaica China y Reyna. La expresión de los genes *ans* y *f3'h* están relacionados con la disminución en la fuente de nitrógeno del medio y la acumulación de antocianinas en células de jamaica de las variedades China y Reyna.

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección General de Educación Superior Tecnológica (DGEST) por el financiamiento del proyecto.

LITERATURA CITADA

- BOREVITZ, J. O.; XIA, Y.; BLOUNT, J.; DIXON, R. A.; LAMB, C. 2000. Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* 12: 2383–2394.
- CHEN, S. A.; ZHAO, B.; WANG, X.; YUAN, X.; WANG, Y. 2004. Promotion of the growth of *Carotus sativus* cells and the production of crovin by rare earth elements. *Biotechnology Letters* 26: 27–30
- CLYDESDALE, F. M.; MAIN, J. H.; FRANCIS, F. J. 1979. Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) anthocyanin as colorants for beverages and gelatin desserts. *Journal of Food Protection* 42: 204–207.
- CORMIER, F.; CREVIER, H. A.; DO, C. B. 1990. Effects of sucrose concentration on the accumulation of anthocyanins in grape (*Vitis vinifera*) cell suspension. *Canadian Journal of Botany* 68: 1822–1825.
- CORMIER, F.; DO, C. B. 1993. *Vitis vinifera* L. (Grapevine): In vitro production of anthocyanins. *Biotechnology in Agriculture and Forestry Medicinal and Aromatic Plants* 24: 373–386.
- DO, C. B.; CORMIER, F. 1991. Effects of low nitrate and high sugar concentrations on anthocyanin content and composition of (Leguizamón *et al.*, 2005); however, the expression of these genes in a non-pigmented tissue suggests that the regulation of the pigmentation in the variety China took place in later stages of the biosynthesis. On the other hand, the same gene was expressed in the pigmented tissue of the variety Reyna, indicating that this variety of pigmentation can also be regulated by the expression of this gene, which makes even more evident the differences in the genetic regulation between the two varieties.
- In the expression of the gene that codifies for the anthocyanidin synthase (*ans*), a fragment of 400 pb was obtained (Figure 3) in pigmented and colorless cells of both varieties, whereas none of the tissues exhibited expression for the gene of the enzyme flavonon-3'5'hydroxylase (*f3'5'h*). This result suggests that the pigmentation in roselle may be controlled by regulatory or structural genes implied in the final stages of biosynthesis. There is evidence that nitrogen regulates some pathways of the secondary metabolism including part of the metabolism of the fenilpropanoids, flavonoids and anthocyanins. In plants of *A. thaliana* it was demonstrated that the addition of nitrogen in its forms of KNO_3 and NH_4NO_3 rapidly represses the genes of the biosynthesis of anthocyanins along with a decrease in the levels of fenilalanine (Scheible *et al.*, 2004), which coincides with the results found in the cell lines of roselle. It is known that some factors of transcription such as PAP1 (Production Anthocyanin Pigment) are involved in the expression of genes of the pathway of biosynthesis of anthocyanins and may be stimulated by saccharose, which acts as a molecule of signaling (Borevits *et al.*, 2000).

CONCLUSIONS

The formation of calluses in roselle was induced from segments of leaves and cells in suspension in the MS culture medium added with $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of 2,4-D and $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of BAP. The highest amount of phenolic compounds in callus appeared when using the inducers kinetin 81 mM) for the variety China, saccharose ($60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) for the variety Reyna, as well as salicylic acid (0.01 mM) and methyl jasmonate ($100 \mu\text{M}$) for the variety Blanca. The reduction in the concentration of inorganic nitrogen from 30 mM to 7.5 mM stimulated the biosynthesis and accumulation of anthocyanins in the roselle varieties China and Reyna. The expression of the genes *ans* and *f3'h* are related with the reduction in the source of nitrogen of the medium and the accumulation of anthocyanins I cells of roselle of the varieties China and Reyna.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Dirección General de Educación Superior Tecnológica (DGEST) for financing the project.

End of English Version

- grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension. *Plant Cell* 9: 500-504.
- FENNEMA, O. R. 2000. *Química de los Alimentos*. Vol. 2. Editorial ACRIBIA, S.A. Zaragoza, España. 1280 p.
- GALICIA-FLORES, L. A.; SALINA-MORENO, Y.; ESPINOSA-GARCIA, B. M.; SANCHEZ-FERIA, C. 2008. Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de extractos de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) nacional e importada. *Rev. Chapingo Serie Horticultura* 12(2): 121-129.
- GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. 2001. Anthocyanins. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-Visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Incorporation. New York, USA. 13 p.
- GLEITZ, J.; SEITZ, H. U. 1989. Induction of chalcone synthase in cell suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L. spp. *sativus*) by ultraviolet light: evidence for two different forms of chalcone synthase. *Planta* 179: 323-330.
- GÓMEZ-LEYVA, J. F.; MARTINEZ-ACOSTA, L. A.; LÓPEZ-MURAIRA, I. G.; SILOS-ESPINO, H.; RAMIREZ-CERVANTES F.; ANDRADE-GONZÁLEZ, I. 2008. Multiple shoot regeneration of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) from a shoot apex culture system. *International Journal of Botany*, 4: 326-330.
- GRASSMANN, J.; HIPPELI, S.; ELSTNER, E. F. 2002. Plants defense and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 471-478.
- GURROLA-DÍAZ, C. M., GARCÍA-LÓPEZ, P. M., SÁNCHEZ-ENRÍQUEZ, S., TROYO-SANROMÁN R., ANDRADE-GONZÁLEZ I., GÓMEZ-LEYVA J. F. 2010. Effects of *Hibiscus sabdariffa* extract powder and preventive treatment (diet) on the lipid profiles of patients with metabolic syndrome (MeSy). *Phytomedicine*: 17(7): 500-505.
- HIRASUNA, T. J.; SHULER, M. L.; LACKNEY, V. K.; SPANSWICK, R. M. 1991. Enhanced anthocyanin production in grape cell cultures. *Plant Science* 78: 107-120.
- HIRUNPANICH, V; UTAIPAT, A.; PHUMALA-MORALES, N.; BUNYAPRAPHATSARA, N.; SATO, H.; HERUNSALE, A.; SUTHISISANG, C. 2006. Hypocholesterolemic and antioxidant effects of aqueous from the dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* L. in hypercholesterolemic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 103: 252-260.
- JAAKOLA, L.; PIRTTILA, A. M.; HALONEN, M.; HOHTOLA, A. 2001. Isolation of high quality ARN from the bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit. *Molecular Biotechnology* 19: 201-203.
- KOKUBO, T.; AMBE-ONO, Y.; NAKAMURA, M.; ISHIDA, H.; YAMAKAWA, T.; KODAMA, T. 2001. Promotive effect of auxins on UDP-glucose: flavonol glucosyltransferase activity in *Vitis* sp cell cultures. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 91: 564-569.
- KONCZAK-ISLAM, I.; NAKATANI, M.; YOSHINAGA, M.; YAMAKAWA, O. 2001. Effect of ammonium ion and temperature on anthocyanin composition in sweet potato cell suspension culture. *Plant Biotechnology* 18: 109-117.
- KRISA, S.; VITRAC, X.; DECENDIT, A.; LARRONDE, F.; DEFFIEUX, G.; MÉRILLON, J. M. 1999. Obtaining *Vitis vinifera* cell cultures producing higher amounts of malvidin-3-O-glucoside. *Biotechnology Letters* 21: 497-500.
- LEGIZAMON G. V.; LEON, A. G.; SAÑUDO R. B. 2005. Antocianinas en uva (*Vitis vinifera* L.) y su relación con el color. *Rev. Fitotec. Mexicana* 28(4): 359-368.
- LUCZKIEWCZ, M., CISOWSKI, W. 2001. Optimization of the second phase of a two phase growth system for anthocyanin accumulation in callus culture of *Rudbeckia hirta*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 65: 57-68.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-479.
- OZEKI, Y.; KOMAMINE, A. 1986. Effects of growth regulators on the induction of anthocyanin synthesis in carrot suspension cultures. *Plant Cell Physiol.* 27(7): 1361-1368.
- RAJENDRAN, L.; RAVISHANKAR, G. A.; VENKATARAMAN, L. V.; PRATHIBA, K. R. 1992. Anthocyanin production in callus cultures of *Daucus carota* as influenced by nutrient stress and osmoticum. *Biotechnology Letters* 14: 707-712.
- SAIGNE-SOULARD, C.; RICHARD, T.; MÉRILLON, J. M.; MONTI, J. P. 2006. ¹³C NMR analysis of polyphenol biosynthesis in grape cells: impact of various inducing factors. *Analytica Chimica Acta* 563: 137-144.
- SANTACRUZ-RUVALCABA, F.; PORTILLO, L. 2009. Thin cell suspension layer as a new methodology for somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul. *Industrial Crops and Products* 29: 609-614.
- SCHEIBLE, W. R.; MORCUENDE, R.; CZECHOWSKI, T.; FRITZ, C., OSUNA, D.; PALACIOS-ROJAS, N.; SCHINDELASCH, D.; THIMM, O.; UDVARDI, M. K.; STITT, M. 2004. Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of Arabidopsis in response to nitrogen. *Plant Physiol.* 136: 2483-2499.
- TSAI, P. J.; MCINTOSH, J.; PEARCE, P.; CAMDEN, B.; JORDAN, B. R. 2002. Anthocyanin and antioxidant capacity in roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. *Food Research International* 35: 351-356.
- VINSON, J.; JANG, J.; YANG, J.; DABBAGH, Y.; LIANG, X.; SERRY, M.; PROCH, J.; CAI, S. 1999. Vitamins and especially flavonoids in common beverages are powerful *in vitro* antioxidants which enrich low density lipoproteins and increase their oxidative resistance after ex vivo spiking in human plasma. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 47: 2502-2504.
- WATERMAN P. G.; MOLE, S. 1994. *Analysis of phenolic Plant Metabolites*. Methods in Ecology. Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK. 238 p.
- ZHANG, W. C.; HIDENARI, K.; MASAYUKI, N. 2004. To stretch the boundary of secondary metabolite production in plant cell-based bioprocessing: anthocyanin as a case study. *J. Biomed. Biotechnol* 5: 264-271.
- ZHONG, J. J., YOSHIDA, T. 1995. High density cultivation of *Perilla frutescens* cell suspensions for anthocyanin production: Effects of sucrose concentration and inoculum size. *Enzyme Microb. Technol.* 17(12): 1073-1079.