



División de Estudios de Posgrado



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ÁREA TEMÁTICA: BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

RELACIÓN DEL CONTENIDO DE FENOLES, FLAVONOIDES Y
ANTOCIANINAS CON LA VARIACIÓN DEL COLOR DE LAS
FLORES DE *Laelia speciosa* (ORCHIDACEAE)

T E S I S

Que como requisito para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Presenta:

MED. SALVADOR MIGUEL CASTILLO FIGUEROA

Director de Tesis:

Doctor en Ciencias en Biotecnología de Plantas
RAFAEL SALGADO GARCIGLIA

Co-Director de Tesis:

Doctor en Ciencias en Biotecnología de Plantas
D.C. RODOLFO LÓPEZ GÓMEZ



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

DR. HÉCTOR GUILLÉN ANDRADE
COORDINADOR GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E

Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "Relación del contenido de fenoles, flavonoides y antocianinas con la variación del color de las flores de *Laelia speciosa* (Orchidaceae)", presentado por el MCyP. Salvador Miguel Castillo Figueroa, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Maestro en Ciencias.

Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

ATENTAMENTE
Morelia, Michoacán, a 06 julio de 2016

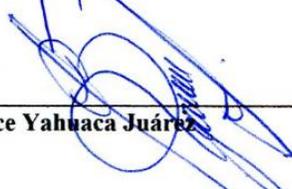
MIEMBROS DE LA COMISIÓN REVISORA



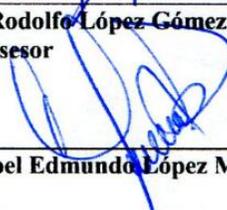
Dr. Rafael Salgado Garciglia
Asesor



Dr. Rodolfo López Gómez
Co Asesor



Dra. Berenice Yahuaca Juárez



Dr. Joel Edmundo López Meza



Dr. Marco Antonio Cortés Rodríguez

El presente trabajo se realizó en los Laboratorios de Biotecnología Vegetal y Fisiología Molecular de Plantas del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH, bajo la dirección del Dr. Rafael Salgado Garciglia y del Dr. Rodolfo López Gómez.

DEDICATORIA

A la mujer que me trajo a este mundo

Mi madre Oliva Figueroa Correa por ser ejemplo de lucha, trabajo, responsabilidad, constancia, dedicación, tenacidad, honestidad, amor y fe. Por haberme acercado las herramientas necesarias para ser lo que ahora soy.

A mis hermanas

Oliva e Ireri quienes han estado y están a mi lado, por su amor, comprensión y apoyo, por ser ejemplos de capacidad y lucha para salir adelante. Sé que cuento con ustedes y saben que ustedes conmigo.

A mis sobrinos

Ariadna y Emiliano por siempre recibirme con una sonrisa, un abrazo y un beso, por gritar, brincar y estar contentos y despertar la alegría en mí.

A G R A D E C I M I E N T O S

A mi alma mater, la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, a la Facultad de Químico Farmacobiología, al Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, a los Laboratorios de Biotecnología Vegetal y Fisiología Molecular de Plantas y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Agradezco muy especialmente al D.C. Rafael Salgado Garciglia por aceptarme para realizar esta tesis bajo su asesoría, por brindarme sus conocimientos, experiencia y amistad, por su orientación y paciencia.

También a mi co-asesor el D.C. Rodolfo López Gómez por su apoyo, orientación, disponibilidad y paciencia, invaluable en el desarrollo de este trabajo y en la adquisición de nuevos conocimientos. Gracias por compartir conmigo su experiencia

A la Dra. Berenice Yahuaca Juárez por compartirme sus conocimientos, confianza, orientación, apoyo, disponibilidad y paciencia.

Además, agradezco a los profesores integrantes de la mesa sinodal: D.C. Joel Edmundo López Meza y D.C. Marco Antonio Cortés Rodríguez.

También a los M.C. Alejandra Hernández García y Luis María Suárez Rodríguez, técnicos de los Laboratorios de Biotecnología Vegetal y Fisiología Molecular de Frutos, por su participación activa en la investigación, por compartir sus conocimientos, experiencia y su paciencia.

Por último quiero agradecer a mis compañeros de la Maestría del Área Temática de Biotecnología Alimentaria, así como a todos mis compañeros de ambos laboratorios, por orientarme, compartir sus conocimientos, buenos ratos, complicidad y generosidad, en especial a: M.C. Sarai Suárez, L.G.A. Marco A. Hernández, Biol. Ana María Huerta, M.C. Marisol Báez, M.C. Rafael Torres, M.C. Lili García e I.B.Q. Violeta Campos.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	<i>i</i>
RESUMEN	<i>iv</i>
ABSTRACT	<i>v</i>
I.INTRODUCCIÓN GENERAL	1
II.ANTECEDENTES GENERALES	4
2.1. COMPUESTOS FENÓLICOS DE PLANTAS.....	4
2.1.1. Ácidos fenólicos.....	5
2.1.2. Flavonoides	5
2.1.3. Antocianinas	6
2.1.4. Biosíntesis de compuestos fenólicos	7
2.2. EL COLOR EN LAS FLORES.....	9
2.2.1. Regulación de la síntesis de antocianinas en flores	13
2.2.2. Determinación del color en flores	15
2.3. <i>Laelia speciosa</i> (ORCHIDACEAE)	19
III. JUSTIFICACIÓN	21
IV. HIPÓTESIS	22
V. OBJETIVO GENERAL	22
5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	23
VII. RESULTADOS	24
7.1. DETERMINACIÓN DEL COLOR Y SU RELACIÓN CON EL CONTENIDO DE ANTOCIANINAS EN FLORES DE LA ESPECIE TIPO DE <i>Laelia</i> <i>speciosa</i> Y LAS VARIETADES ALBA, ALBESCENS Y RUBRA.	24

	Página
7.2. CONTENIDO DE ÁCIDOS FENÓLICOS, FLAVONOIDEOS Y ANTOCIANINAS EN CUATRO ESTADIOS DE FLORACIÓN EN LA ESPECIE TIPO DE <i>Laelia speciosa</i> Y LAS VARIEDADES ALBA, ALBESCENS Y RUBRA	36
VIII. CONCLUSIONES GENERALES	55
IX. LITERATURA CITADA GENERAL	56

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema de la ruta biosintética de las antocianinas (Narbona <i>et al.</i> , 2014).	8
Figura 2. Principales clases de flavonoides y los colores que les proporcionan a las flores según son percibidos por los humanos (Modificado de Narbona <i>et al.</i> , 2014).	11
Figura 3. El color de las flores en <i>Petunia x hybrida</i> (petunia) es regulado por la expresión de genes de las principales enzimas involucradas en la ruta de síntesis de las antocianinas, llevando a la formación de flores blancas, amarillas, rosas, rojas y púrpuras (Durbin <i>et al.</i> , 2001; Jaakola <i>et al.</i> , 2002; Mori <i>et al.</i> , 2005).	14
Figura 4. Cartas para la medición de color. A) Árbol del color de Munsell; B) Cartas de Color de la Real Sociedad de Horticultura (Pérez, 2008).	16
Figura 5. A la izquierda esquema de los dispositivos 0/45 donde el receptor se encuentra a 45° entre la fuente de luz y la muestra a medir, para excluir el componente especular. A la derecha esquema de un colorímetro tri-estímulo que utiliza filtros rojo, verde y azul para emular la respuesta del ojo humano a la luz (X-Rite, 2002).	17
Figura 6. Escala de color CIELAB en un espacio tridimensional donde L denota la luminosidad y va de arriba abajo, de 0 a 100; en un eje horizontal a+ para el rojo y a- para el azul y en un eje perpendicular a este, b+ para el amarillo y b- para el azul (X-Rite, 2002).	18
Figura 7. Flores de las diferentes variedades de <i>L. speciosa</i> : A), variedad alba; B), variedad albescens; C), variedad rubra; y D), variedad tipo (Foto y Cultivo: CAFISMO SPR de RL).	20

	Pág.
Figura 8. Colorimetría de las flores de la especie tipo de <i>Laelia speciosa</i> y de sus variedades alba, albescens y rubra (N=3). Para L; $F=<0.0031$, $R^2=0.807$. Para °h; $F=<0.0001$, $R^2=0.999$. Para C; $F=<0.0001$, $R^2=0.984$; Tukey-Kramer, letras diferentes muestran diferencias significativas.	31
Figura 9. Contenido de antocianinas en flores de la especie tipo de <i>L. speciosa</i> y las variedades alba, albescens y rubra, expresado como equivalentes a cianidina (N=3). $F=<0.0001$, $R^2=0.995$; Tukey-Kramer, letras diferentes muestran diferencias significativas.	32
Figura 10. Espectros (400-800 nm) de los extractos de flores de la especie tipo de <i>L. speciosa</i> , las de las variedades alba, albescens, rubra y de cianidina.	33
Figura 11. Estadios de desarrollo en estudio de las flores de <i>Laelia speciosa</i> : I, Botón floral de 10mm de 2 semanas de edad; II, Botón floral de 35mm de 3 semanas; III, Botón floral de 75mm de 4 semanas; IV, Flor abierta de 6 semanas.	40
Figura 12. Curva de calibración para fenoles totales equivalentes a ácido gálico (μ moles Ác. Gálico/g peso fresco).	42
Figura 13. Curva de calibración para flavonoides equivalentes a quercetina (μ moles Quercetina/g peso fresco).	44
Figura 14. Actividad de Fenilalanina amonio liasa en cuatro estadios de las flores de la especie tipo de <i>L. speciosa</i> y las variedades alba, albescens y rubra, expresado en U de PAL por mg de proteína por hora de peso (N=3). Para la variedad alba $F=0.279$, $R^2=0.365$; para la albescens $F=0.004$, $R^2=0.795$; para la tipo $F=0.673$, $R^2=0.167$; para la rubra $F=0.186$, $R^2=0.434$; Tukey-Kramer, letras diferentes muestran diferencias significativas.	47
Figura 15. Contenido de fenoles totales en cuatro estadios de las flores de la especie tipo de <i>L. speciosa</i> y las variedades alba, albescens y rubra, equivalentes a μ moles de ácido gálico/g de peso (N=3). $F=<0.0001$, $R^2=0.985$; Tukey-Kramer, letras diferentes muestran diferencias significativas.	49

	Pág.
Figura 16. Contenido de flavonoides en cuatro estadios de las flores de la especie tipo de <i>L. speciosa</i> y las variedades alba, albescens y rubra, equivalentes a μ moles de quercetina/g de peso fresco (N=3). $F=<0.0001$, $R^2=0.972$; Tukey-Kramer, letras diferentes muestran diferencias significativas.	50
Figura 17. Contenido de antocianinas en cuatro estadios de las flores de la especie tipo de <i>L. speciosa</i> y las variedades alba, albescens y rubra, equivalentes a μ g de cianidina/g de peso fresco (N=3). Para la variedad alba $F=0.000$, $R^2=0.910$; para la albescens $F=0.002$, $R^2=0.826$; para la tipo $F=<0.001$, $R^2=0.998$; para la rubra $F=<0.0001$, $R^2=0.995$; Tukey-Kramer, letras diferentes muestran diferencias significativas.	51

SALVADOR MIGUEL CASTILLO FIGUEROA. 2016. Relación del contenido de fenoles, flavonoides y antocianinas con la variación del color de las flores de *Laelia speciosa* (Orchidaceae). Tesis de Maestría en Ciencias, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas, Facultad de Químico Farmacobiología, Área Temática de Biotecnología Alimentaria. Morelia, Michoacán, México (Directores de Tesis. Dr. Rafael Salgado Garciglia y Dr. Rodolfo López Gómez), 72 p.

RESUMEN

En esta investigación se realizó la determinación del color de las flores de la especie tipo de *Laelia speciosa* y las variedades alba, albescens y rubra mediante colorimetría tri-estímulo, con el método CIELab, obteniendo el matiz ($^{\circ}h$) y la saturación o croma (C). Las flores de *L. speciosa* de la especie tipo y las variedades albescens y rubra presentan un matiz que va de $313^{\circ}h$ a $315^{\circ}h$, lo que las ubica en el rango del color que se ha observado en las flores pigmentadas por antocianinas. Los valores de C fueron de 4.18 para la variedad albescens, 30.99 para la especie tipo y 37.70 para la variedad rubra, lo que demuestra que la saturación incrementa conforme el color o la pigmentación de la variedad aumenta de intensidad. Estos valores fueron menores en la variedad alba, con un valor de matiz de $117.14^{\circ}h$ y un C de 2.96, esto debido a la ausencia de color y pigmentos. Para relacionar estos resultados con el contenido de antocianinas en flores de *L. speciosa*, se determinó el contenido de éstas en las diferentes variedades y en la especie tipo, con la cuantificación de antocianinas totales, equivalentes a cianidina. Las flores de la especie tipo presentaron $131.65 \mu\text{g/g}$ de antocianinas, observándose un contenido mayor ($243.68 \mu\text{g/g}$) en la variedad rubra; la variedad albescens mostró un contenido menor ($29.44 \mu\text{g/g}$) y en las flores de la variedad alba solo se cuantificaron $2.64 \mu\text{g/g}$. Estos resultados demuestran una relación directa entre el color de las flores de *L. speciosa* y el contenido de antocianinas, las flores de la variedad alba (flores blancas) contienen una baja concentración de antocianinas y los valores de matiz y croma más bajos, opuesto a lo observado en la variedad rubra (flores púrpuras) con el mayor contenido de antocianinas y los parámetros de color. Además, se determinó la actividad de fenilalanina amonio liasa (PAL) y el contenido de ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas en cuatro estadios del desarrollo de las flores de la especie tipo de *L. speciosa* y de las tres variedades naturales alba (flores blancas), albescens (flores rosa pálido) y rubra (flores púrpura). En general se observó una mayor actividad de PAL en los dos primeros estadios de desarrollo de cada variedad y la especie tipo, disminuyendo hasta casi desaparecer en el último estadio, que corresponde a flor abierta (estadio IV). La mayor actividad se detectó en el estadio I de la variedad alba y la menor actividad en el estadio IV de la variedad albescens, con 0.286 u 0.117 U PAL/mg de proteína por hora, respectivamente. La relación indica mayor actividad de PAL en flores aciánicas (alba y albescens) que ciánicas (especie tipo y variedad rubra). El contenido de ácidos fenólicos totales mostró una variación dependiente de cada estadio de floración y de cada una de las variedades y la especie tipo. En cada una de las variedades y la especie tipo de *L. speciosa*, el contenido de ácidos fenólicos fue mayor en el estadio I. En la especie alba se obtuvo un contenido de $0.354 \mu\text{moles/g}$ de peso fresco, seguidos de la variedad albescens, especie tipo y variedad rubra con 0.268, 0.192 y $0.194 \mu\text{moles/g}$ de peso fresco, respectivamente. En el estadio IV, el contenido fue similar (de 0.268 a $0.079 \mu\text{moles/g}$ de tejido fresco). No se observó una fuerte variación en el contenido de flavonoides en los primeros estadios de la especie tipo y en las tres variedades, sin embargo, el mayor contenido se presentó en estadio III. La producción de antocianinas fue más alta en las flores ciánicas de *L. speciosa*, observando una relación directa del desarrollo de la flor y el color. Estos resultados se relacionan con la acumulación de las antocianinas y el color, demostrando que en estadios tempranos del desarrollo de la flor, cuando el color aún no se define, el contenido de antocianinas es menor; y cuando las flores están definidas, el contenido de éstas es mayor. Los resultados demuestran que la variación de las flores en las tres variedades y la especie tipo de *L. speciosa*, se debe a la acumulación de antocianinas (estadio IV), con una previa síntesis de flavonoides (estadio III) y ácidos fenólicos (estadios I y II), así como con la actividad de la PAL en las etapas tempranas de la formación de las flores.

Palabras clave: Color, orquídea, PAL, pigmentos, variación floral.

SALVADOR MIGUEL CASTILLO FIGUEROA. 2016. Relationship of the content of phenols, flavonoids and anthocyanins with the variation in the flower color of *Laelia speciosa* (Orchidaceae). Tesis de Maestría en Ciencias, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas, Facultad de Químico Farmacobiología, Área Temática de Biotecnología Alimentaria. Morelia, Michoacán, México (Directores de Tesis. Dr. Rafael Salgado Garciglia y Dr. Rodolfo López Gómez), 72 p.

ABSTRACT

In this research was determined the color of the flowers of the species type of *Laelia speciosa* and their varieties alba, albescens and rubra, by colorimetry tri-stimulus analysis with the CIE Lab method, obtaining the hue (°h) and the saturation or chroma (C). The flowers of *L. speciosa* of the species type and varieties albescens and rubra have a hue between 313 °h to 315 °h, which places them in the range of the color which has been observed in flowers pigmented by anthocyanin. The C values were 4.18 for variety albescens, 30.99 for the species type and 37.70 to the variety rubra, which shows a saturation increases as the color or intensity increases the pigmentation of the variety. These values were lower in the alba variety, with a hue of 117.14 °h value and a 2.96 C, this is due to the absence of color and pigments. To relate these results with the content of anthocyanins in flowers of *L. speciosa*, the content of anthocyanins was determined in the species type and varieties with the quantification of anthocyanins total, equivalent to cyaniding. The flowers of the species type presented 131.65 µg/g of anthocyanins, observing a content greater (243.68 µg/g) in the rubra variety; the albescens variety showed a lower content (29.44 µg/g) and in the flowers of the alba variety was quantified only 2.64 µg/g. These results show a direct relationship between the color of the flowers of *L. speciosa* and content of anthocyanins, the alba variety flowers (white flowers) contained a low concentration of anthocyanins and the values of hue and chroma lower, opposite to that observed in the rubra variety (purple flowers) with the highest content of anthocyanins and color parameters. In addition, was determined the activity of phenylalanine ammonia lyase (PAL) and the content of phenolic acids, flavonoids and anthocyanins in four stages of the development of the flowers of the species type of *L. speciosa* and their natural varieties alba (white flowers), albescens (pink flowers) and rubra (purple flowers). In general was observed a greater activity of PAL in the stage I and II of each variety and the species type, decreasing to almost disappear in the last stage that corresponds to flower open (stage IV). The increased activity was detected in stage I of the alba variety and lower activity in stage IV of the variety albescens, with 0.286 and 0.117 U PAL/mg protein per hour, respectively. The ratio indicates higher activity of PAL in acianicas flowers (alba and albescens) to cyan (species type and rubra). The relationship indicates higher activity of PAL in acyanic flowers (alba and albescens) to cyanic (species type and variety rubra). The contents of total phenolic acids showed a dependent variation of each stage of flowering and each of the varieties and the type species. In each the varieties and the type species of *L. speciosa*, phenolic acids content was higher in stage I. The alba variety showed a content of 0.354 µmol/g galic acid equivalent of fresh weight, followed by the variety albescens, species type and variety rubra with 0.268, 0.192 and 0.194 µmol/g galic acid equivalent of fresh weight, respectively. In the stage IV, the content was similar (of 0.268 to 0.079 µmol/g galic acid equivalent of fresh weight). A strong variation in the content of flavonoids not was observed in the first stages of the species type and in their three varieties, however, the greater content is presented in stage III. The production of anthocyanins was higher in the cyanic flowers of *L. speciosa*, noting a direct relationship of the development of the flower and color. These results are related to the accumulation of anthocyanins and color, showing that in the early stages of the development of the flower, when color is not yet defined, the content of anthocyanins is lower; and when the flowers are defined, the content of these is higher. The results show that variation in flowers in the three varieties and the type species of *L. speciosa*, is due to the accumulation of anthocyanins (stage IV), with a preliminary synthesis of flavonoids (stage III) and phenolic acids (stages I and II), as well as the activity of the PAL in the early stages of the formation of flowers.

Keywords: Color, Orchid, PAL, pigments, flower variation.

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Los principales pigmentos que generan la coloración floral, en general son los carotenoides, flavonoides, antocianinas y betalaínas, aunque otros pigmentos como clorofilas, fenilfenalenonas y quinochalconas pueden generar esta coloración aunque son ejemplos raros en la naturaleza (Davies, 2009). Los flavonoides y fenilpropanoides, denominados generalmente como compuestos fenólicos, son de gran variación en estructura y función, y aquellos involucrados en la coloración de las flores son solubles en agua y generalmente se localizan en la vacuola, siendo los flavonoides y las antocianinas los más comunes, éstos son la base para casi todas las flores amarillo-naranja, rosadas, rojas, escarlatas, púrpuras y azules (Davies, 2009).

Este tipo de moléculas, se caracterizan por la presencia de un anillo bencénico como mínimo, el cual está directamente unido al menos un grupo hidroxilo, libre o ligado con otra función (ésteres, metil ésteres, glucósidos, etc.). Estos compuestos protegen principalmente a las plantas contra los daños oxidativos (Bravo, 1998; Shahide y Naczki, 2004).

Los flavonoides y antocianinas son sintetizados a partir de los precursores acetato y fenilalanina por la vía de los fenilpropanoides o ruta del ácido shiquímico (Dixon, 2005). Ésta es regulada a nivel genético (Davies y Schwinn, 2003) y altamente regulada por factores ambientales, principalmente por luz (Winkler *et al.*, 1974). La síntesis ocurre en el citoplasma con acumulación en vacuolas, aunque el mecanismo de transporte no ha sido completamente elucidado (Zhang *et al.*, 2004). Desde el punto de vista funcional y debido a su alto poder reductor, actúan como antioxidantes al prevenir o detoxificar procesos que conducen a la producción de radicales libres y a la muerte celular (Kong *et al.*, 2003); en plantas se asocian con mecanismos de protección en casos de excesos de luz (O'Neill y Gould, 2003), estrés al frío y defensa contra patógenos (Kong *et al.*, 2003), así como en la coloración de flores y frutos (Steyn *et al.*, 2000).

La diferencia en la pigmentación de las flores se debe a la actividad de las principales enzimas involucradas en la ruta biosintética de los ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas, como la fenilalanina amonio liasa (PAL, por las siglas del inglés Phenylalanine Ammonio Lyase) que transforma la fenilalanina a ácido cumárico; la chalcona sintasa (CHS) que controla el primer paso en la ruta biosintética de flavonoides en la síntesis de la naringenina, la que posteriormente es modificada a través de varios pasos enzimáticos de la ruta para producir una amplia variedad de compuestos importantes en la pigmentación floral como flavonas, flavonoles y antocianinas, que dan origen a los colores blanco, amarillo, rosado o rojos (Durbin *et al.*, 2001). En esta última etapa de la ruta de síntesis, es importante la actividad de la flavanona-3-hidroxilasa (F3H), la dihidroflavonol reductasa (DFR), la antocianidina sintetasa (ANS) y la UDP flavonoide glucosil transferasa (UFGT) (Zhang *et al.*, 2004).

La síntesis de ácidos fenólicos es directamente la responsable del color de las flores, la producción de éstos durante su desarrollo se relaciona con el color, el que depende de la cantidad y tipo de compuestos fenólicos. Por ejemplo, el color ciánico de muchas flores (rosas, rojas, púrpuras) se debe a la acumulación de las antocianinas, la coloración de flores amarillas se debe a la acumulación de chalconas y auronas y los colores amarillo-naranja principalmente a las flavonas y flavonoles (Paiva, 2000; Steyn *et al.*, 2000; Shahide y Naczka, 2004).

Varias especies de plantas tienen variación en el color de las flores, desde flores blancas hasta azul-púrpura, amarillas y naranja, en las que se ha relacionado el contenido de compuestos fenólicos con el color: en cultivares de *Nymphaea* (lili de agua) las flores blancas y amarillas no presentaron antocianinas, en las rojas hay un mayor contenido de las antocianinas delfinidina y cianidina, y en las azules solamente delfinidina (Zhu *et al.*, 2012); un resultado similar ha sido reportado para flores de clemátides (*Clematis patens*), con un alto contenido de antocianinas en las flores púrpuras y de flavonoles en las de color rosa (Masanori *et al.*, 2008); e igualmente en estudios con flores de gloria de la mañana (*Ipomoea purpurea*) (Zufall y Rausher, 2003) y de crisantemo (*Chrysanthemum grandiflorum*) (Chen *et al.*, 2012).

Las flores blancas o también denominadas aciánicas, se debe a que no hay producción de este tipo de compuestos fenólicos (Kobayashi *et al.*, 2002). En reportes recientes se ha determinado que las flores blancas de algunas orquídeas como *Dendrobium* y *Cymbidium*, se debe a cambios en la actividad enzimática y en la expresión de genes de las enzimas de síntesis de antocianinas, principalmente en PAL, CHS, F3H y DFR (Wang *et al.*, 2009). En la naturaleza existen variedades de orquídeas con flores blancas (albas), flores de color rosa claro (albescens) y flores de color rosa fuerte a púrpura (rubra), variaciones en el color de las flores de la especie denominado “tipo” (flores de color rosa). Esta pigmentación es regulada a nivel génico y no a las condiciones ambientales, por lo que las plantas que las producen han sido clasificadas como variedades. En México, algunos géneros de orquídeas como *Encyclia*, *Barkeria* y *Laelia*, presentan este tipo de variedades.

La especie *Laelia speciosa* es una de las orquídeas endémicas más importantes y demandadas en nuestro país debido a la belleza de sus flores (Halbinger y Soto-Arenas, 1997), por lo que es considerada en riesgo de extinción en la categoría de protección especial (Pr) en el listado de especies en peligro de extinción (NOM-Ecol-059, SEMARNAT, 2010). La especie tipo de *L. speciosa* presenta flores de color rosa, de la que se han clasificado tres variedades basándose en la variación del color de sus flores, la variedad alba de flores blancas, la variedad albescens de flores rosa pálido y la variedad rubra de flores púrpura. Debido a estas características, las flores de esta planta se presentan como un modelo de estudio para analizar la relación del color con la síntesis o acumulación de compuestos fenólicos como las antocianinas.

Por lo anterior, en esta investigación se realizaron estudios comparativos en las flores de las diferentes variedades de *L. speciosa* con la especie tipo, teniendo como objetivo general el relacionar el contenido de ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas, con el color de las flores.

II. ANTECEDENTES GENERALES

2.1. COMPUESTOS FENÓLICOS DE PLANTAS

Las rutas metabólicas básicas, también denominado metabolismo primario, constituyen los orígenes del metabolismo secundario de las plantas, del que se sintetizan una gran diversidad de compuestos, llamados metabolitos secundarios, que son responsables del aroma y color de las hojas, flores y frutos de los vegetales. Otros son importantes antioxidantes, antimicrobianos, anti-alimentarios, repelentes y atrayentes, producidos durante la interacción con agentes bióticos y abióticos (Wink, 2007).

Las plantas producen una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo hidroxilo en un anillo aromático, que les confiere una estructura fenólica. Existen dos rutas básicas implicadas en su biosíntesis: La ruta del acetato que conduce a la formación de cadenas policíclicas que mediante ciclación, dan lugar a compuestos policíclicos aromáticos; y la ruta del ácido shikímico, que es precursor principal de uno de los grupos más importantes en plantas, denominados de forma general como fenoles, a los que pertenecen los fenoles simples, ácidos fenólicos, taninos, cumarinas, lignanos, quinonas, flavonoides y antocianinas (Bravo, 1998).

Los compuestos fenólicos poseen una estructura química responsable de ejercer acción antioxidante, actuando como captadores de radicales libres y neutralizando especies reactivas de oxígeno e iones metálicos quelantes. Además, debido a su reactividad, se encuentran en la mayoría de los casos combinadas con un ácido orgánico, un azúcar o bien, con ellos mismas para formar un polímero. Los grupos que presentan la mayor cantidad de compuestos son los ácidos fenólicos y los flavonoides, las antocianinas pertenecen a este último grupo de compuestos fenólicos (Skerget *et al.*, 2005).

Respecto a sus funciones, los compuestos fenólicos pueden ejercer una función estructural como el caso de la lignina y suberina. Actúan como protectores frente a las radiaciones ultravioleta y forman los pigmentos naturales de las plantas (p.ej., antocianinas, flavonas y flavonoles). Intervienen como reguladores de interacciones planta-microorganismos (p.ej., *Rhizobium*, *Agrobacterium*). También están implicados en procesos de defensa de las plantas como es el caso de los taninos o las furanocumarinas (isoflavonoides). Otros compuestos fenólicos tienen efectos alelopáticos (p.ej., ácido cafeico, ácido ferúlico) y de atracción de polinizadores. Algunos fenoles también juegan un importante papel en la tolerancia al estrés (Williams y Graver, 2004; Wink, 2007).

2.1.1. Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos consisten en dos grupos: los ácidos hidroxibenzoicos y los ácidos hidroxicinámicos: Los ácidos hidroxibenzóicos son compuestos que presentan un grupo carboxílico (grupo ácido) y grupos hidroxilo (uno o más) en un anillo aromático, ejemplos de éstos son el ácido gálico, ácido vainílico y el ácido protocatecuico; los ácidos hidroxicinámicos se caracterizan por la presencia del grupo $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ en remplazo del grupo COOH presente en los ácidos hidroxibenzoicos, los ácidos cinámico, cumárico, ferúlico y cafeico, son un ejemplo de ellos (Wink, 2007).

2.1.2. Flavonoides

Los flavonoides son un tipo particular de los polifenoles presentes en plantas y son los compuestos responsables del color de las flores y frutas. El término flavonoide viene del latín "flavus", que significa amarillo, ya que muchos flavonoides purificados son de color amarillo. Éstos son clasificados en chalconas, auronas, flavonas y flavonoles, isoflavonas y neoflavonoides, catequinas y antocianinas (Markham, 1996).

Las flavonas son amarillas y pueden estar en algunas flores, como en la prímula, dándoles un color amarillo a sus pétalos, o en frutos, como en la piel de las uvas, son

las responsables del color amarillento de los vinos blancos. Hay tres flavonas importantes: la tricetina, presente en el polen de algunas mirtáceas, y también en las podocarpáceas (*Podocarpus* spp.); apigenina, presente en muchas plantas como la manzanilla (*Matricaria recutita*) o el tejocote (*Crataegus laevigata*), da un color marrón marfileño a las flores si se presenta sola; y luteolina, de color amarillo, que incluso sirve para teñir lana y otros tejidos (López-Luengo, 2002).

Los flavonoles suelen ser incoloros o amarillos y se encuentran en las hojas y en muchas flores. Los más importantes son tres: quercetina, es el flavonol amarillo del polen de varias especies de encinos (*Quercus* spp.); miricetina, presente en la uva; y kaempferol, que está presente en las inflorescencias de muchas plantas y las protege de la luz ultravioleta. A los flavonoles y las flavonas se unen azúcares, preferentemente a la posición C3 y con menor frecuencia al C7 del anillo A, de forma que estos compuestos se encuentran comúnmente como O-glicósidos, siendo la D-glucosa el residuo azúcar más frecuente. Otros residuos de azúcares son la D-galactosa, la L-ramnosa, la L-arabinosa, la D-xilosa, así como el ácido D-glucurónico. La parte sin azúcares de la molécula flavonoide se llama aglicona. Los glicósidos son más solubles en agua y menos reactivos frente a radicales libres que su aglicona o flavonoide respectivo (López-Luengo, 2002; Williams y Grayer, 2004).

2.1.3. Antocianinas

Este tipo de compuestos fenólicos presentan moléculas simples sin unión a compuestos glucósidos (agliconas) y unidas a azúcares. Las primeras son las antocianidinas, las agliconas de las antocianinas, que se encuentran ampliamente distribuidas en las plantas. Las antocianidinas principales son la cianidina, pelargonidina, peonidina, delphinidina, petunidina y la malvidina, responsables del color rojo, naranja, azul, violeta y morado en las frutas, flores y demás partes de plantas. Su color depende del pH, los iones metálicos presentes y la combinación de las diferentes antocianidinas (Kong *et al.*, 2003; Dixon, 2005; Vermerris y Nicholson, 2008).

Las antocianinas son glucósidos de antocianidinas, siendo la glucosa el glucósido más presente en estas moléculas. Junto con los taninos, son los responsables del color rojo de los vinos añejos (Rovner, 2006). Las antocianinas son utilizadas en la industria de alimentos como colorantes naturales, y se enumeran en el Codex Alimentarius bajo el código E169. Debido a su capacidad antioxidante, las antocianinas y antocianidinas se asocian como compuestos beneficiosos para la salud. Por ejemplo, su consumo se ha asociado con la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, como la enfermedad cardíaca coronaria y el cáncer (Lazze *et al.*, 2006; Pascual-Teresa y Sanchez-Ballesta, 2008).

2.1.4. Biosíntesis de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos mayormente son sintetizados por la ruta del ácido shiquímico, A partir de eritrosa-4-fosfato y de ácido fosfoenolpirúvico se inicia una secuencia de reacciones que conduce a la síntesis de ácido shiquímico y, derivados de éste, los aminoácidos aromáticos fenilalanina, triptófano y tirosina. La mayoría de los compuestos fenólicos derivan de la fenilalanina a través de una ruta metabólica presente en plantas, hongos y bacterias, pero no en animales. La enzima fenilalanina amonio liasa (PAL, por sus siglas en inglés: Phenylalanine Ammonia Lyase) cataliza la formación de ácido cinámico por eliminación de una molécula de amonio de la fenilalanina. Esta enzima está situada en un punto de ramificación entre el metabolismo primario y secundario por lo que la reacción que cataliza es una importante etapa reguladora en la formación de muchos compuestos fenólicos (Figura 1) (Narbona *et al.*, 2014).

Las reacciones posteriores a la catalizada por PAL son básicamente adiciones de más grupos hidroxilo y otros sustituyentes. Los ácidos trans-cinámico y p-cumárico se metabolizan para formar ácido ferúlico y ácido caféico (Figura 1) cuya principal función es ser precursores de otros derivados más complejos como las cumarinas, lignina, taninos, flavonoides y antocianinas. En la ruta de biosíntesis de flavonoides, la primera etapa consiste en la condensación de 3 moléculas de malonil-CoA con una molécula

de p-cumaril-CoA, reacción catalizada por chalcona sintasa y da lugar a naringerina chalcona, el precursor de los flavonoles y las antocianinas (Figura 1).

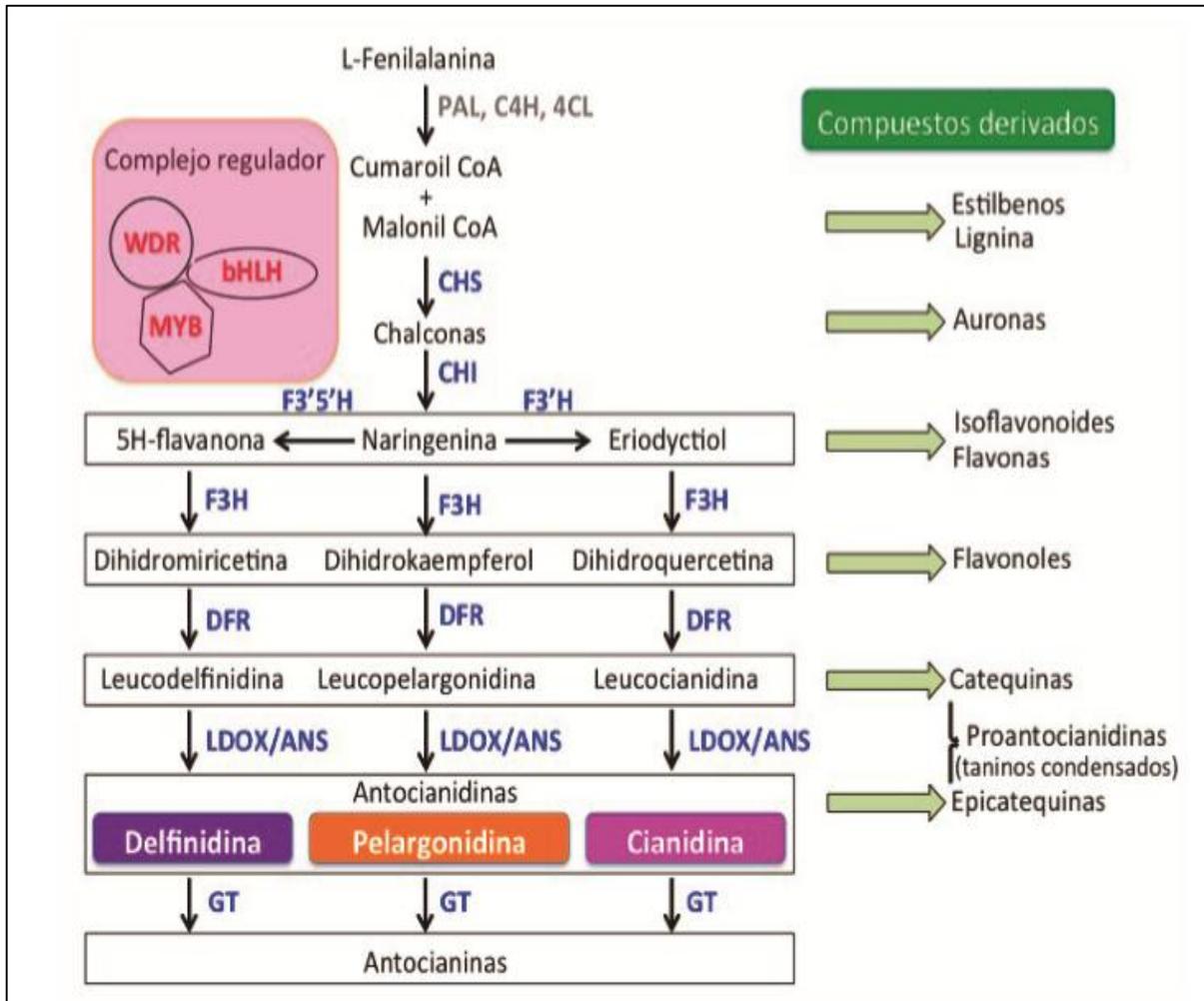


Figura 1. Esquema de la ruta biosintética de las antocianinas (Narbona *et al.*, 2014).

En la figura 1 se muestran las enzimas principales (azul), las enzimas pertenecientes a la ruta superior de los fenilpropanoides (gris), los compuestos producidos por éstas (negro) y las proteínas reguladoras de los genes que codifican a las enzimas (rojo). Las flechas verdes indican ramas que mediante otras reacciones enzimáticas darán lugar a distintos compuestos secundarios. Las proteínas reguladoras (factores de transcripción) se encuentran formando el complejo MBW, el cual puede controlar la

síntesis de una o varias enzimas de la ruta. Para las enzimas y proteínas reguladores se utiliza la abreviatura de sus siglas en inglés. WDR, WD40 repeats; bHLH, beta helix-loop-helix; MYB, R2R3-MYB o R3-MYB; PAL, phenylalanine ammonia lyase; C4H, cinnamic acid 4-hydroxylase; 4CL, coumarate CoA ligase; CHS, chalcone synthase; CHI, chalcone isomerase; F3'H, flavonoid 3'-hydroxylase; F3'5'H, flavonoid 3' 5'-hydroxylase; F3H, flavonoid 3-hydroxylase; DFR, dihydroflavonol 4-reductase; ANS, anthocyanidin synthase; GT, glycosyl transferase (Narbona *et al.*, 2014).

2.2. EL COLOR EN LAS FLORES

Los pigmentos son compuestos químicos que cuando la luz incide sobre ellos, absorben unas determinadas longitudes de onda y reflejan el resto (que es lo que los humanos percibimos como color), generalmente éstos son detectados con longitudes de onda comprendidas entre 380 y 730 nm; sin embargo, los polinizadores, principalmente insectos y aves, además perciben longitudes de onda más corta (ultravioleta) (Kevan *et al.*, 1996; Kelber *et al.*, 2003). Los pigmentos en las plantas se clasifican en cuatro grandes grupos: clorofilas, carotenoides, flavonoides y betalaínas. Las clorofilas, que proporcionando un color verde, forman parte constitutiva de los tejidos vegetativos y sépalos.

Se acumulan raramente en los pétalos o tépalos, aunque existen excepciones como por ejemplo en la familia Orchidaceae (Lee, 2007; Vignolini *et al.*, 2012). Los carotenoides son isoprenoides y generan los colores amarillo, naranja y rojo en algunas flores; son frecuentes en especies del género *Narcissus* o en la familia Asteraceae (Grotewold, 2006; Lee, 2007). Los flavonoides son los pigmentos que más diversidad de color proporcionan a las flores. Entre ellos, las antocianinas son los flavonoides más importantes y proporcionan una coloración roja, azul, rosa, púrpura y en algunos casos casi negra (Lee, 2007; Miller *et al.*, 2011).

Las auronas, chalconas, flavonas y flavonoles son flavonoides y generan un color blanquecino, amarillo pálido o amarillo; además absorben la radiación ultravioleta

(Tanaka *et al.*, 2008). Flavonas y flavonoles también pueden actuar como copigmentos (Davies, 2009), es decir, sustancias de coloración débil que se unen de forma estable a las antocianinas para reforzar su color, haciéndolo más intenso o brillante. Las betalaínas producen una coloración similar a la de los flavonoides y se producen únicamente en algunas familias del orden Caryophyllales (Shimada *et al.*, 2007; Brockington *et al.*, 2011). Mientras que antocianinas y carotenoides pueden producirse en la misma especie, la acumulación de betalaínas y antocianinas es mutuamente excluyente (Brockington *et al.*, 2011) (Figura 2).

El color blanco en los pétalos responde generalmente a la falta de pigmentos; al no haber pigmentos que absorban una parte del espectro de luz, ésta es reflejada completamente. En los pétalos rara vez se acumula un sólo tipo de pigmento (Glover, 2007; Lee, 2007). Incluso en las flores que poseen un color uniforme suelen encontrarse varios tipos de compuestos, por ejemplo distintos tipos de antocianinas (Schmitzer *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013). Un cambio del tipo de pigmento o en la proporción de mezcla de varios pigmentos afectaría al color resultante (es decir el matiz o longitud de onda predominante), mientras que cambios en la concentración de los compuestos afectaría a la intensidad del color (es decir, saturación o pureza del color) (Figura 2). En el caso de las antocianinas, otros factores, como el tipo de copigmento unido a la antocianina o el pH vacuolar, podrían afectar en gran medida al color del pétalo (Andersen y Jordheim, 2006; Glover, 2007).

Cuando en los estudios se usa el término polimorfismo de color floral, se refieren generalmente al polimorfismo en el color de los pétalos. En los pétalos, las antocianinas y betalaínas se acumulan generalmente en células de la epidermis mientras que los carotenoides se acumulan en células inferiores a la epidermis (Lee, 2007; Hughes, 2011). A nivel celular, los primeros se acumulan en las vacuolas ya que son hidrosolubles, mientras que los segundos se acumulan en plastidios al ser liposolubles (Tanaka *et al.*, 2008).

Algunos autores sugieren que no todos los polimorfismos de color son igual de frecuentes. Warren y Mackenzie (2001), encontraron que los polimorfismos malva-blanco y rosa-blanco (causados por ausencia de antocianinas) eran más frecuentes que los polimorfismos verde-blanco (ausencia de clorofilas) y amarillo-blanco (ausencia de carotenoides o algunos flavonoides). Como ejemplo de los primeros estaría el caso de *Claytonia virginica*, con tonalidades que van entre el blanco, rosa claro, malva y carmesí (Frey, 2004) y de *Parrya nudicaulis*, con flores sin antocianinas de color blanco frente al morfotipo con antocianinas de color púrpura (Dick *et al.* 2011) (Figura 2).



Figura 2. Principales clases de flavonoides y los colores que les proporcionan a las flores según son percibidos por los humanos (Modificado de Narbona *et al.*, 2014).

La pérdida de antocianinas en las flores ocurre con más frecuencia que la ganancia (Rausher, 2008; Sobel y Streisfeld, 2013). Así, uno de los tipos más comunes de polimorfismo en el color de las flores es el que conlleva la presencia de una baja frecuencia de plantas con flores blancas en poblaciones de plantas con flores

pigmentadas (Levin y Brack, 1995). Este tipo de polimorfismo ha sido descrito en diferentes especies, como *Digitalis purpurea*, *Echium plantagineum*, *Phlox drummondii* y *Phlox pilosa* (Levin y Brack, 1995). Otros estudios más recientes incluyen el polimorfismo azul claro-blanco de *Wahlenbergia albomarginata* (Campbell *et al.*, 2012), el púrpura-blanco de *Hesperis matronalis* (Majetic *et al.*, 2007) y el rosa-blanco de *Mimulus lewisii* (Wu *et al.*, 2013).

Por otra parte, en especies como *Lobularia maritima*, el blanco es el morfotipo más frecuente mientras que el menos frecuente sería el violeta (Gómez, 2000). En los casos anteriores, la ausencia de producción de pigmentos florales supone la aparición de un morfotipo blanco. Sin embargo, cuando la especie tiene la capacidad de producir varios tipos de pigmentos, la pérdida de uno de ellos causa un morfotipo pigmentado pero de color diferente al original. Así, uno de los polimorfismos mejor documentados es cuando algunos individuos acumulan antocianinas y carotenoides en sus pétalos (flores de color púrpura a rojo intenso), frente a individuos que han perdido la capacidad de sintetizar antocianinas (flores de color amarillo debido a los carotenoides) como en *Mimulus aurantiacus* (Streisfeld y Kohn, 2005), en *Iris lutescens* (Wang *et al.*, 2013).

En otras especies, el polimorfismo se produce por un cambio en el pigmento predominante en las flores, generalmente entre distintos tipos de antocianinas (pelargonidinas, cianidinas o delfinidinas), lo que genera cambios de naranja a azul, de rosa a azul o de rojo a azul (Quintana *et al.*, 2007; Hopkins y Rausher, 2012). Por último, hay ejemplos de extrema diversidad de colores florales en las especies silvestres. Así, *Lycoris longituba* presenta colores púrpura, rojo, naranja y amarillo en poblaciones naturales debido tanto a la acumulación de distintos pigmentos como a la distinta concentración de los mismos (He *et al.*, 2011).

2.2.1. Regulación de la síntesis de antocianinas en flores

La diferencia en la pigmentación de las flores se debe a la actividad de las principales enzimas involucradas en la ruta biosintética de las antocianinas (Durbin *et al.*, 2001), por lo que los patrones de color de las flores están controlados a diferente niveles, por ausencia o mutaciones de uno o más de los genes de la vía de síntesis de las antocianinas (Kobayashi *et al.*, 2002), por cambios en la expresión de algunos de estos genes (Jaakola *et al.*, 2002) y por regulación transcripcional (Winkel-Shirley, 2001; Mori *et al.*, 2005).

La gama de colores de rosa a rojos muy intensos es producida por la expresión de los genes de las enzimas F3H, DFR, ANS y UFGT; cuando la expresión de algunos de estos genes se ve inhibida, la pigmentación de las flores es diferente al de las flores cianicas. Cuando se produce chalcona-2-glucósido a partir de chalcona o glucósido de flavonol de dihidroflavonol y se ve inhibido el gen *dfr*, no se producen antocianinas y las flores son de color amarillo (Itoh *et al.*, 2002) (Figura 3).

Los análisis genéticos en muchas especies de plantas que producen flores blancas, han demostrado que se debe a la pérdida de actividad de tres enzimas primordiales en la síntesis de flavonoides: chalcona sintasa (CHS), dihidroflavonol 4-reductasa (DFR) y flavonoide 3',5' hidroxilasa (F3'5'H) (Zufall y Rausher, 2003). Las plantas de petunia que producen flores blancas, carecen de la actividad de estas enzimas (Franken *et al.*, 1991; Napoli *et al.*, 1999) (Figura 3).

Los estudios indican que la producción de flores blancas, se debe a la nula actividad de CHS principalmente porque es la enzima puntual de la ruta de síntesis de flavonoides, responsables del color de las flores (Jez *et al.*, 2002). La baja actividad de dichas enzimas se debe principalmente a mutaciones en la región promotora de los genes correspondientes o a mutaciones en factores de transcripción (Rauscher, 2008).

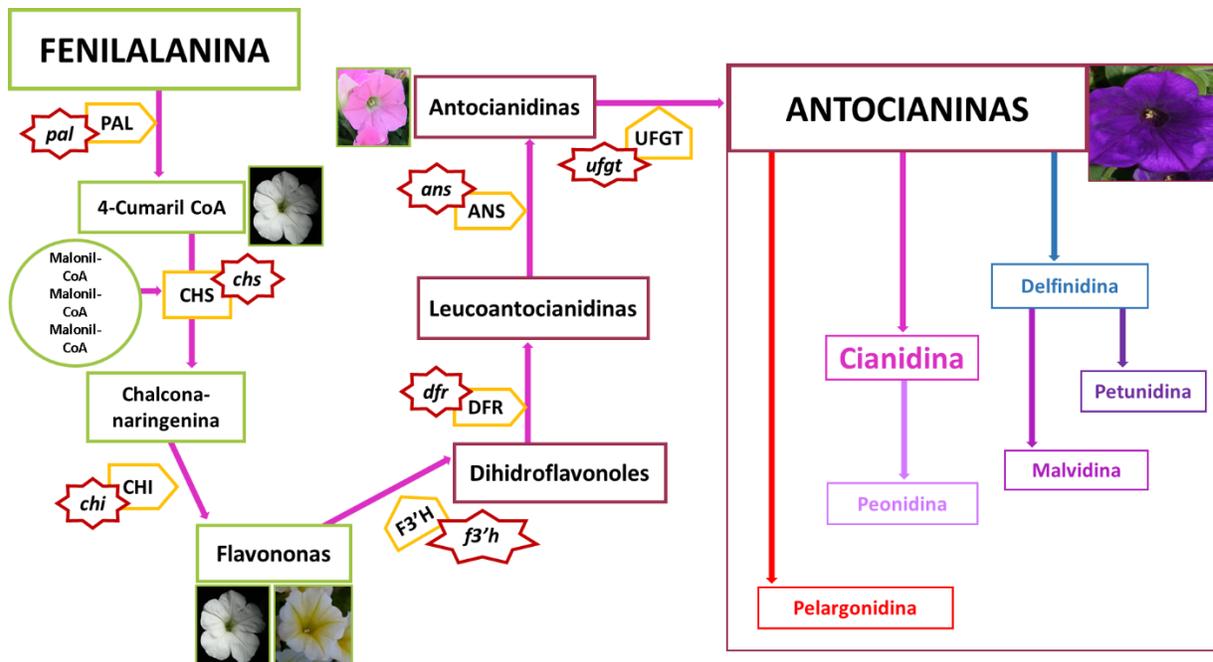


Figura 3. El color de las flores en *Petunia x hybrida* (petunia) es regulado por la expresión de genes de las principales enzimas involucradas en la ruta de síntesis de las antocianinas, llevando a la formación de flores blancas, amarillas, rosas, rojas y púrpuras (Durbin *et al.*, 2001; Jaakola *et al.*, 2002; Mori *et al.*, 2005).

La ausencia de algunos de estos genes, como *dfr* en *Bromheadia finlaysoniana*, la hace producir flores blancas (Liew *et al.*, 1998). Nishihara y col. (2006) produjeron plantas de genciana (*Gentiana triflora*) con flores blancas por supresión del gen de chalcona sintasa (*chs*) mediante transformación genética con *Agrobacterium*. Los estudios más completos relacionados con el color de las flores, se han realizado con *Ipomoea purpurea* 'gloria de la mañana', con los cuales se ha demostrado que la ausencia o presencia de diversos pigmentos derivados de la ruta de síntesis de flavonoides, son responsables del color de las flores. La responsabilidad de la pigmentación del color de las flores en *I. purpurea* recae principalmente en CHS y DFR (Clegg y Durbin, 2000).

Particularmente en orquídeas se ha reportado que los genes de CHS (*chs*), de DFR (*dfr*) y de F3H (*Hf1*), son responsables en la pigmentación de sus flores, sin embargo

se desconocen los factores fundamentales que la regulan (Liew *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 1999).

2.2.2. Determinación del color en flores

Cada persona percibe el color de manera distinta, de tal manera que hacerlo se basa en una interpretación subjetiva, que depende de varios factores como la edad y el estado de salud del individuo, incluso de su estado de ánimo. Es por estas razones que es muy difícil describir un color específico de manera objetiva sin tener algún tipo de norma como base de referencia. Es por ello que se utilizan instrumentos de medición que identifican específicamente un color, es decir, que distinguen un color de todos los demás y se les asigna un valor numérico (X-Rite, 2002).

Cada color tiene su propia apariencia basada en tres elementos: matiz, luminosidad y croma. Al describir un color, utilizando estos tres atributos se identifica con precisión un color específico y se distingue de cualquier otro. El matiz es el atributo de color mediante el cual un color se percibe como rojo, amarillo, verde, azul, violeta, etc. El blanco, el negro y el gris no tienen matiz; el croma se describe como la intensidad o nivel de saturación de un tono en particular (rojo, amarillo, verde, azul, etc.), definido como la distancia de separación de un color cromático y el color neutral (gris) con el mismo valor. Lo llamativo o lo apagado de un color, es decir, que tan cerca está el color ya sea al gris o al matiz puro; y la luminosidad, intensidad lumínica o valor, indica el grado de claridad u oscuridad de un color en relación con la escala neutral de grises. La escala del valor (V) va desde 0 para negro puro hasta 100 para blanco puro. La escala de valor es neutral, es decir, sin matiz. Los colores pueden clasificarse como tenues u oscuros al comparar sus valores (X-Rite, 2002).

Existen diferentes propuestas para medir el color, las cartas de colores se han usado en taxonomía para la descripción de plantas y animales desde 1686. Dos de las más utilizadas actualmente son las Cartas del Color de Munsell (MBC: The Munsell Book

of Color) y las Cartas de Color de la Real Sociedad de Horticultura (RHSCC: Horticultural Society's Color Charts) (Pérez, 2008).

Cartas del Color de Munsell.- Es donde el matiz se representa en un círculo y establece 10 sectores de matices definidos por sus iniciales en inglés: R, YR, Y, GY, G, BG, B, PB, P y RP, para definir colores intermedios se establecen 100 divisiones. Permitiendo mediante la numeración, el tratamiento estadístico de datos. La intensidad tiene una escala de 0 (negro puro) a 10 (blanco puro) y el croma es el grado de salida de un color desde el color neutro del mismo valor. La escala empieza en cero pero es arbitraria, y varía según la intensidad para un mismo matiz. La referencia Munsell para un color es HV/C. Para un rojo 5R con una luminosidad de 6 y un croma de 14 se definiría como 5R 6/14 (Pérez, 2008) (Figura 4A).

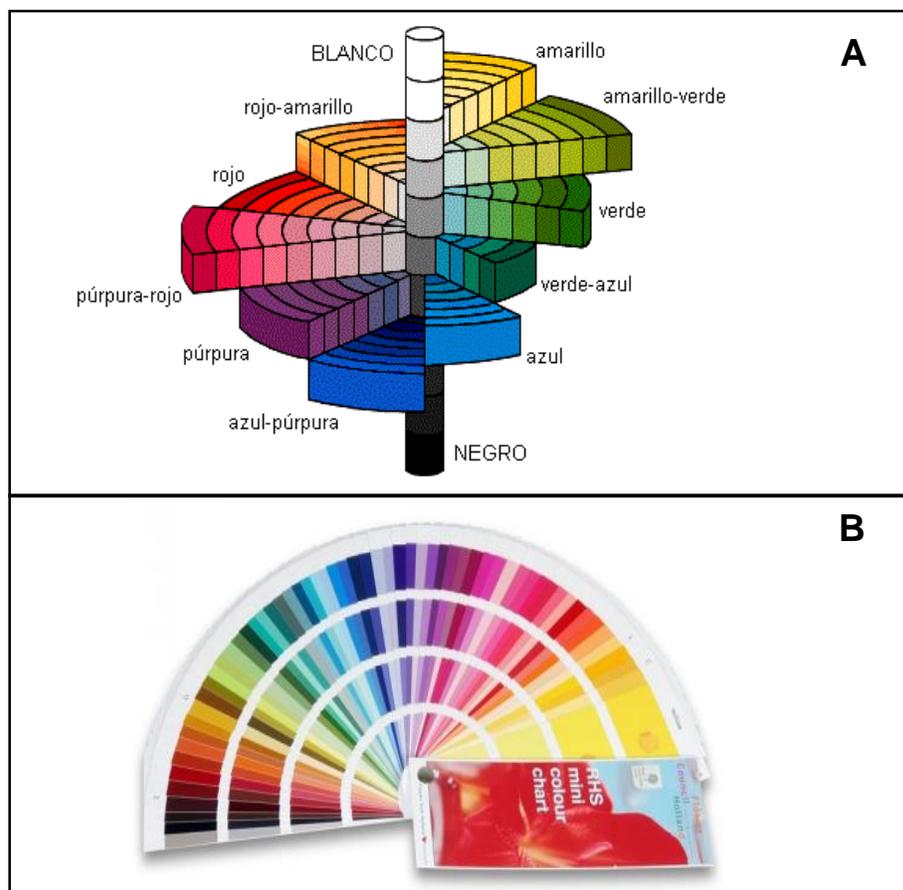


Figura 4. Cartas para la medición de color. A) Árbol del color de Munsell; B) Cartas de Color de la Real Sociedad de Horticultura (Pérez, 2008).

Cartas de Color de la Real Sociedad de Horticultura.- la carta completa de colores contiene 884 colores diferentes. En cada tarjeta de color se presentan 4 matices, existen 4 grupos de tarjetas agrupadas en abanico: amarillo al rojo, rojo-púrpura al azul, azul-verdoso al amarillo-verdoso y grisáceos de todos los grupos de color. El color queda descrito por un número y una letra (Figura 4B).

Actualmente también se utilizan otro tipo de instrumentos para medir el color. Los instrumentos 0/45 perciben el color más cercanamente como lo hace el ojo humano, ya que excluyen el “componente especular” (brillo), como lo haría cualquier individuo, para evaluar el color. Los colorímetros son dispositivos tri-estimulares que utilizan tres filtros (rojo, verde y azul) para emular la respuesta del ojo humano al color y la luz (X-Rite, 2002) (Figura 5).

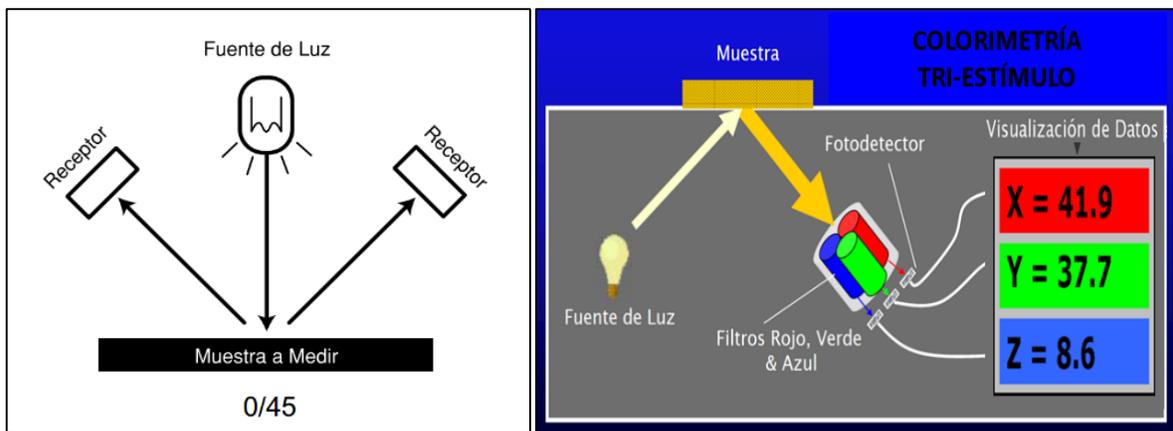


Figura 5. A la izquierda esquema de los dispositivos 0/45 donde el receptor de encuentra a 45° entre la fuente de luz y la muestra a medir, para excluir el componente especular. A la derecha esquema de un colorímetro tri-estimular que utiliza filtros rojo, verde y azul para emular la respuesta del ojo humano a la luz (X-Rite, 2002).

Estos instrumentos se basan en escalas de medición del color que utilizan fórmulas matemáticas para interpretar sus resultados. Uno de los modelos empleados por estos instrumentos es la escala CIEL a^*b^* establecida por la Commission Internationale de l'Eclairage (Comisión Internacional de la Iluminación), institución responsable de las recomendaciones internacionales para la fotometría y colorimetría, y que determina un sistema tridimensional cuyos parámetros son los siguientes: L^* describe la iluminación o brillo del color y varía de 0 (negro perfecto) a 100 (blanco perfecto), a^* es positivo para el rojo y negativo para el verde, b^* es positivo para el amarillo y negativo para el azul. A partir de estos parámetros se calcula el croma (c) y el ángulo del matiz (h). Según las siguientes ecuaciones: $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$, $h = \text{Tan}^{-1}(b^*/a^*)$. C^* representa la intensidad del color, donde los valores bajos se acercan al gris y el matiz se representa como el ángulo h que varía en sentido contrario a las agujas del reloj del 0° (rojo), 90° (amarillo) a 180° (verde), o en el sentido de las agujas del reloj desde 0° (rojo), -90° (azul) hasta -180° (verde) (Figura 6) (X-Rite, 2002).

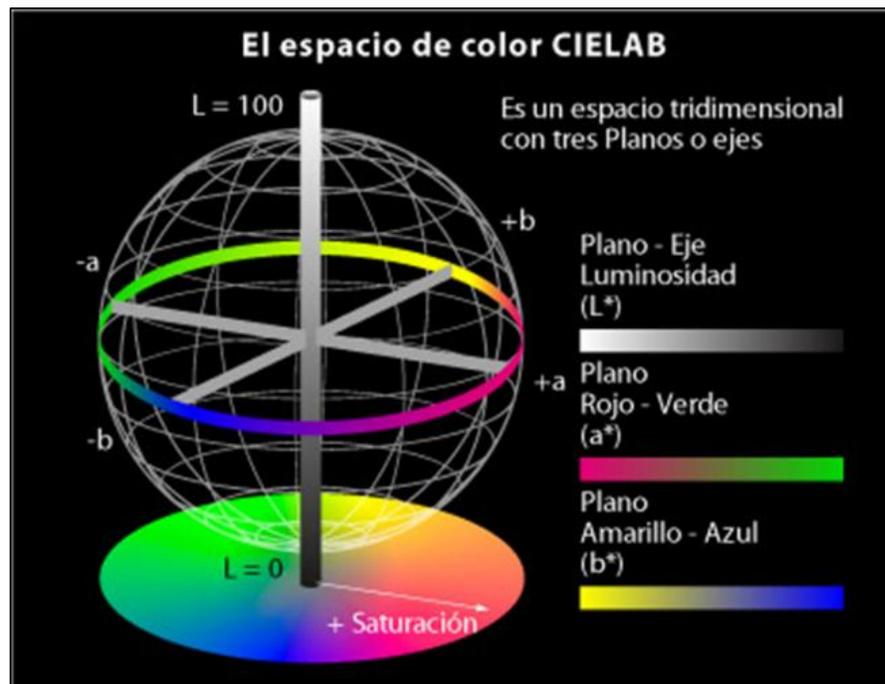


Figura 6. Escala de color CIELAB en un espacio tridimensional donde L denota la luminosidad y va de arriba abajo, de 0 a 100; en un eje horizontal a^+ para el rojo y a^- para el azul y en un eje perpendicular a este, b^+ para el amarillo y b^- para el azul (X-Rite, 2002).

Al utilizar las cartas de color RHSCC y las de MBC para medir el color de las flores de *Hemerocallis*, Griesbach y Austin (2005) concluyen que las RHSCC no permiten discriminar entre cultivares distinguibles a simple vista, mientras que las MBC permiten comparar los atributos específicos dentro de cultivares de un color similar, así como interpolar entre valores de los atributos, lo que permite una alta discriminación del color de las flores.

Por otra parte, Ayala Silva y Meerow (2007) realizaron un estudio de comparación de la evaluación de color en *Amaryllis* entre un colorímetro Portátil Minolta Chroma Meter CR-400 basado en la escala CIEL *a*b* y las cartas de color RHSCC y concluyen que las cartas difieren de la apreciación subjetiva del ojo humano, mientras que el colorímetro ofrece una mayor precisión para la identificación del color de las flores.

2.3. *Laelia speciosa* (ORCHIDACEAE)

La familia Orchidaceae es una de las que presenta mayor número de especies, con hasta 30 000, forma parte de la Clase Liliopsida (monocotiledóneas) y es una familia cosmopolita y prácticamente se distribuye en todo el mundo con excepción de los hielos permanentes y los desiertos (Storm, 2006). En México se distribuyen alrededor de 1,200 especies de orquídeas con un endemismo de 40%; los estados con mayor diversidad de orquídeas son Chiapas, Oaxaca, Veracruz, Puebla, Hidalgo, San Luis Potosí, Guerrero, Michoacán, Jalisco, Nayarit y Sinaloa (Salazar y Soto, 1996; Espejo *et al.*, 2002).

Un género representativo en México es *Laelia* ya que agrupa aproximadamente 11 especies epífitas, la mayoría endémicas de México (Halbinger y Soto, 1997). Las especies como *Laelia anceps*, *L. eyermaniana* y *L. speciosa* han sido catalogadas en riesgo de extinción, *L. gouldiana* es considerada una especie extinta en la naturaleza, aunque aún se tiene en colecciones de particulares (SEMARNAT, 2010). Otras especies como *L. albida*, *L. aurea*, *L. autumnalis*, *L. furfuracea*, *L. halbingeriana*, *L.*

rubescens y *L. superbiens*, aunque no son consideradas en riesgo, sus poblaciones son altamente explotadas (Halbinger y Soto, 1997).

El color de las flores del género *Laelia* principalmente varía de rosa muy pálido a rosas muy fuertes, en algunos casos púrpuras como *L. autumnalis* o *L. gouldiana*, amarillas como *L. aurea* y casi blancas como *L. albida*. La mayoría de estas especies presentan sus respectivas variedades, albas, albescens y rubra. La pigmentación en las flores de *L. speciosa* las ubica en diferentes variedades como *L. speciosa* var. *alba* con flores blancas, *L. speciosa* var. *albescens* con flores rosa pálido, *L. speciosa* var. *rubra* con flores rosa fuerte o púrpuras, diferentes en su pigmentación al compararse con *L. speciosa* variedad tipo, de flores rosas (Figura 7).

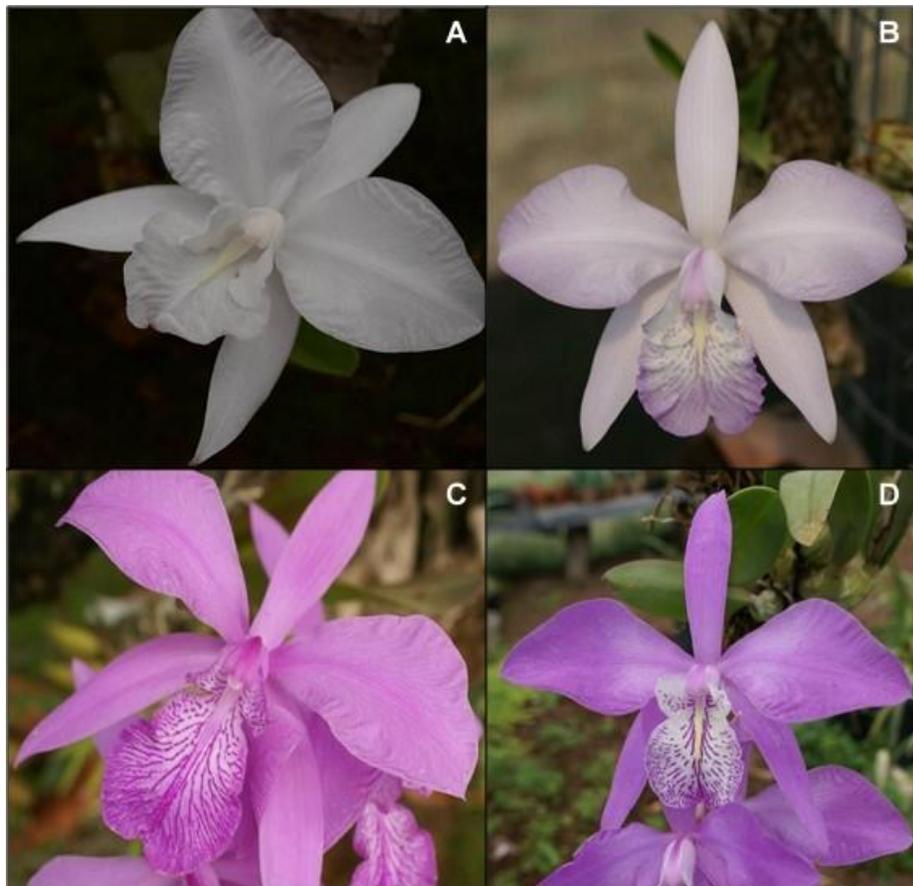


Figura 7. Flores de las diferentes variedades de *L. speciosa*: A), variedad alba; B), variedad albescens; C), variedad rubra; y D), variedad tipo (Foto y Cultivo: CAFISMO SPR de RL).

III. JUSTIFICACIÓN

Aunque hay estudios que relacionan el color de las flores con el contenido de compuestos fenólicos en general, las investigaciones se han realizado en pocas especies que muestren los morfotipos de diferencia del color en las flores. Dichos estudios son importantes para determinar qué tipo de compuestos fenólicos están directamente relacionados con el color de las flores en una misma especie de planta; pero también evaluar desde que etapa de la floración, se puede determinar esta relación.

Es por ello, que en la presente investigación se propone a la orquídea *Laelia speciosa* como un modelo de estudio para comprender la relación del contenido de ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas, con la pigmentación de las flores de sus diferentes variedades, ya que *L. speciosa* presenta flores de color blanco, rosa pálido, rosa y púrpura.

IV. HIPÓTESIS

La variación en el color de las flores de *Laelia speciosa* (Orchidaceae) se relaciona con el contenido de ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas.

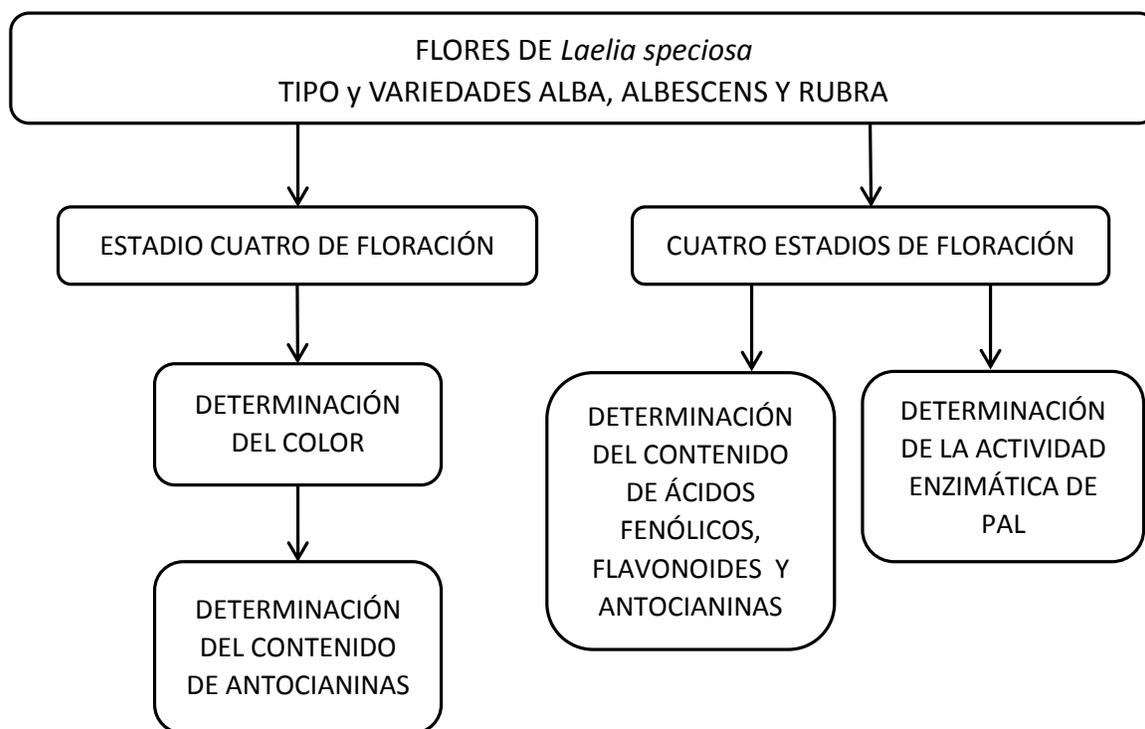
V. OBJETIVO GENERAL

Analizar el contenido de ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas en las flores de diferentes variedades de *Laelia speciosa* (Orchidaceae).

5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el color de las flores de las variedades y la especie tipo de *L. speciosa* y relacionar con el contenido de antocianinas.
2. Determinar el contenido de fenoles, de flavonoides y de antocianinas en las flores de las variedades y la especie tipo de *L. speciosa* en cuatro estadios de desarrollo.
3. Determinar la actividad enzimática de la fenilalanina amonio liasa en las flores de las variedades y la especie tipo de *L. speciosa* en cuatro estadios de desarrollo.

VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



VII. RESULTADOS

7.1. Determinación del color y su relación con el contenido de antocianinas en flores de la especie tipo de *Laelia speciosa* y las variedades alba, albescens y rubra.

RESUMEN

Se realizó la determinación del color de las flores de la especie tipo de *Laelia speciosa* y las variedades alba, albescens y rubra mediante colorimetría tri-estímulo, con el método CIELab, obteniendo el matiz ($^{\circ}h$) y la saturación o croma (C). Las flores de *L. speciosa* de la especie tipo y las variedades albescens y rubra presentan un matiz que va de $313^{\circ}h$ a $315^{\circ}h$, lo que las ubica en el rango del color que se ha observado en las flores pigmentadas por antocianinas. Los valores de C fueron de 4.18 para la variedad albescens, 30.99 para la especie tipo y 37.70 para la variedad rubra, lo que demuestra que la saturación incrementa conforme el color o la pigmentación de la variedad aumenta de intensidad. Estos parámetros fueron menores en la variedad alba, con un valor de matiz de $117.14^{\circ}h$ y un C de 2.96, esto debido a la ausencia de color y pigmentos. Para relacionar estos resultados con el contenido de antocianinas en flores de *L. speciosa*, se determinó el contenido de éstas en las diferentes variedades y en la especie tipo, con la cuantificación de antocianinas totales, equivalentes a cianidina. Las flores de la especie tipo presentaron $131.65 \mu\text{g/g}$ de antocianinas, observándose un contenido mayor ($243.68 \mu\text{g/g}$) en la variedad rubra; la variedad albescens mostró un contenido menor ($29.44 \mu\text{g/g}$) y en las flores de la variedad alba solo se cuantificaron $2.64 \mu\text{g/g}$. Estos resultados demuestran una relación directa entre el color de las flores de *L. speciosa* y el contenido de antocianinas, las flores de la variedad alba (flores blancas) contienen una baja concentración de antocianinas y los valores de matiz y croma más bajos, opuesto a lo observado en la variedad rubra (flores púrpuras) con el mayor contenido de antocianinas y los parámetros de color.

Palabras clave: Color, orquídea, PAL, pigmentos, variación floral.

ABSTRACT

In this research was determined the color of the flowers of the species type of *Laelia speciosa* and their varieties alba, albescens and rubra, by colorimetry tri-stimulus analysis with the CIELab method, obtaining the hue (°h) and the saturation or chroma (C). The flowers of *L. speciosa* of the species type and varieties albescens and rubra have a hue between 313 °h to 315 °h, which places them in the range of the color which has been observed in flowers pigmented by anthocyanin. The C values were 4.18 for variety albescens, 30.99 for the species type and 37.70 to the variety rubra, which shows a saturation increases as the color or intensity increases the pigmentation of the variety. These values were lower in the alba variety, with a hue of 117.14 °h value and a 2.96 C, this is due to the absence of color and pigments. To relate these results with the content of anthocyanins in flowers of *L. speciosa*, the content of anthocyanins was determined in the species type and varieties with the quantification of anthocyanins total, equivalent to cyaniding. The flowers of the species type presented 131.65 µg/g of anthocyanins, observing a content greater (243.68 µg/g) in the rubra variety; the albescens variety showed a lower content (29.44 µg/g) and in the flowers of the alba variety was quantified only 2.64 µg/g. These results show a direct relationship between the color of the flowers of *L. speciosa* and content of anthocyanins, the alba variety flowers (white flowers) contained a low concentration of anthocyanins and the values of hue and chroma lower, opposite to that observed in the rubra variety (purple flowers) with the highest content of anthocyanins and color parameters

Keywords: Color, orchid, PAL, pigments, flower variation.

INTRODUCCIÓN

La coloración floral es una característica muy importante en la reproducción de la planta para atraer polinizadores. Para el ser humano es una característica ornamental muy tomada en cuenta en la producción de variedades florales con colores específicos, en especial las de color blanco (Zhao *et al.*, 2015).

La forma en que se percibe el color es subjetiva, generalmente se basa en referencias personales e influencias fisiológicas y del ambiente. Por ello es necesario expresar objetivamente un color específico, para lo cual se usan instrumentos que distinguen un color de todos los demás, asignándole un valor numérico. Los colorímetros son dispositivos tri-estimulares que usan tres filtros (rojo, verde y azul) para emular la respuesta del ojo humano a la luz. Cada color tiene su propia apariencia basada en tres elementos: matiz (h°), luminosidad (L^*) y croma (C^*), utilizados para describirlo con precisión y distinguirlo de cualquier otro. El matiz es como se percibe el color de un objeto (rojo, verde, azul, amarillo, etc.) y se expresa en grados que van de 0° a 360° ; el croma describe qué tan cerca está un color ya sea al gris o al matiz puro, que tan llamativo o apagado es; y la luminosidad es el grado de claridad de un color. Estos últimos se cuantifican de 0 a 100 (X-Rite, 2002).

La CIE (Commission Internationale de l'Éclairage) estandarizó los sistemas de orden del color especificando las fuentes de luz, el observador y la metodología usada para encontrar los valores para la descripción del color y recomienda dos escalas de color, la CIE 1976 ($L^* a^* b^*$) o CIELAB y la CIELCH ($L^* C^* h^\circ$). Es en estos sistemas en los cuales se basa la Real Sociedad de Horticultura (Royal Horticultural Society) para determinar el color de las plantas (Voss, 1992).

Los valores de estos parámetros de color varían en las diferentes partes de las plantas e indican los intervalos en la gama de colores, principalmente en frutos y flores, que expresan las diferencias en tonalidad y opacidad entre dos o más frutos o flores (X-Rite, 2002).

En flores y frutos con tonalidades desde rosa hasta azul y morado, el color se debe a la presencia de antocianinas, que representan uno de los principales grupos de pigmentos solubles en agua. Las flores con color (ciánicas) presentan variaciones en el contenido de antocianinas dando como resultado las diferentes tonalidades de rosa a púrpura, la ausencia de estos pigmentos se ha demostrado en flores blancas (aciánicas) (Kobayashi *et al.*, 2002; Ogata *et al.*, 2004).

Cuando la expresión de genes involucrados en rutas biosintéticas de las antocianinas o de genes que regulan esta ruta son reprimidos por mutación, se bloquea la ruta de biosíntesis de antocianinas y se producen flores aciánicas (Yoshida *et al.*, 2004); en diferentes flores o frutos se ha demostrado que el contenido de antocianinas es dependiente de la coloración (Durbin *et al.*, 2001; Ogata *et al.*, 2004). Un contenido alto (3600 – 6000 mg/kg) de antocianinas se presenta en las flores de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) (Galicia-Flores *et al.*, 2008), sin embargo en flores rosadas de *Rosa x hybrida*, el contenido de antocianinas es menor, desde 216 a 2917 µg/g (Schmitzer *et al.*, 2010).

En diferentes especies de orquídeas, las flores muestran variaciones en el color, presentando diferentes tonalidades ciánicas, inclusive flores aciánicas, sin embargo no hay reportes que relacionen el color con el contenido de antocianinas, información que puede ser importante para la clasificación e identificación de las especies o las variedades dentro de una misma especie.

En la presente investigación, se realizó la determinación del color en flores de *Laelia speciosa*, una orquídea endémica de México, que presenta variación en el color de sus flores (especie tipo, flores de color rosa fuerte; variedad alba de flores blancas; variedad albescens de flores rosa pálido; y variedad rubra de flores púrpuras), y se relacionó con el contenido de antocianinas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Fueron utilizadas flores de la especie tipo de *L. speciosa* y de las variedades alba, albescens y rubra, de plantas de una colección particular (CAFISMO SPR de RL), donde se mantienen bajo cultivo en condiciones de invernadero.

Se utilizaron pétalos en fresco para la determinación del color y para la determinación del contenido de antocianinas, las flores fueron pulverizadas en fresco con nitrógeno líquido y almacenadas a -70° C en tubos Eppendorf.

Determinación del color

Se determinó la coloración de las flores de *L. speciosa* mediante colorimetría tri-estímulo, utilizando la escala de color CIELAB ($L^*a^*b^*$) donde L^* define la claridad; a^* denota el valor rojo/verde en un eje de izquierda a derecha donde $+a^*$ se acerca al rojo y $-a^*$ al verde; b^* denota el valor amarillo/azul en un eje perpendicular en el que $+b^*$ se acerca al amarillo y $-b^*$ al azul. De lo anterior se deriva la escala CIELCH donde L^* define la claridad, C especifica el croma (o saturación) y la h° (grados hue o matiz) denota el ángulo en una medición polar. La obtención e interpretación de C y h° se basa en funciones trigonométricas (Hunter, 1942), donde:

$$C = (a^2 + b^2)^{1/2}$$
$$Theta = \left[\frac{a \tan(b/a)}{6.2832} \right] (360)$$

Sí $a > 0$ y $b \geq 0$ entonces $h^{\circ} = Theta$

Sí $a < 0$ y $b \geq 0$ entonces $h^{\circ} = 180 + Theta$

Sí $a < 0$ y $b < 0$ entonces $h^{\circ} = 180 + Theta$

Sí $a > 0$ y $b < 0$ entonces $h^{\circ} = 360 + Theta$

En un círculo cromático dividido en 360°, el rojo-púrpura se localiza a la extrema derecha a un ángulo de 0°, el amarillo a los 90°, cian-verde a los 180° y el azul a los 270° (McGuire, 1992).

Las mediciones fueron realizadas en un colorímetro ColorFlex de HunterLab (Daylight color, D65/10°, L*a*b*), del Laboratorio de Biotecnología Alimentaria de la Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Cuantificación de antocianinas totales

El contenido de antocianinas fue determinado por el método de Fuleki y Francis (1968), que cuantifica antocianinas totales con equivalente a cianidina, mediante análisis espectrofotométrico. Las antocianinas se extrajeron con metanol/HCl 37% (99:1v/v), adicionando 1 mL por cada 0.1 g de tejido de las flores de la especie tipo y las tres variedades (n=3) en tubos Eppendorf de 2 mL, cubiertos con papel aluminio para evitar el paso de la luz. Los tubos con las muestras fueron sometidos a agitación severa en vortex por 1 min y posteriormente se centrifugaron por 10 min a 10,000 rpm, decantando el sobrenadante. A la pastilla se le adicionó otro volumen de 1 mL de metanol/HCl 37% (99:1v/v), repitiendo la extracción en vortex y centrifugación, obteniendo el sobrenadante. Ambos sobrenadantes se unieron para obtener 2 mL de extracto con antocianinas.

La absorbancia de cada muestra se determinó a 535nm (λ), absorbancia máxima de la cianidina, a partir de ésta se calculó la concentración de antocianinas totales expresado en equivalentes de cianidina (mg/mL de extracto), mediante la siguiente fórmula:

$$mg/mL = \frac{(Absorbancia\ máxima\ en\ nm)(PM\ g/L)(f)}{\epsilon}$$

Dónde: ϵ es el coeficiente de extinción molar de cianidina (32000), en una celda de cuarzo de 1cm de longitud, de un gramo de un compuesto con un peso molecular (PM) de 287.24, diluido en 2 mL de solvente (f) (Fuleki y Francis, 1968).

Por lo tanto el cálculo se realizó mediante esta ecuación:

$$mg/mL = \frac{(Absorbancia\ a\ 535nm)(287.24\ g/L)(2)}{32000}$$

Cada uno de los extractos fue analizado por espectrofotometría en un rango de ultravioleta visible (UV-Vis, 200 – 800 nm), en un espectrofotómetro modelo UV-Vis VELAB-VE51000UV, empleando celdas de cuarzo de 1cm de paso óptico, utilizando como blanco el respectivo disolvente de extracción [metanol/HCl 37% (99:1v/v)] y 10 µg/mL de cianidina como solución estándar.

Análisis estadístico

Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey-Kramer para determinar la media de los cuadrados (R^2), la probabilidad (F) y las diferencias significativas. Estos se realizaron con el programa XLSTAT 2016.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se determinó el color de las flores de *L. speciosa* en la especie tipo que presentó una luminosidad (L) 38.41, matiz de 313.35°h y una saturación (C) de 30.99, valores que indican la tonalidad rosa fuerte de la flor, que al compararse con las flores de las otras variedades, éstos fueron determinantes para diferenciar el color entre ellas.

En la variedad albescens se presentó una luminosidad mayor (L=56.79) y una menor saturación de color (C=4.18), manteniéndose el matiz (313.23°h), expresando el color rosa pálido de estas flores. En la variedad rubra, de flores púrpuras, la L es de 32.79 y no se observa gran variación en el matiz (315.39°h), sin embargo, el color más fuerte fue determinado por el valor del croma, ya que éste aumentó hasta 37.70. Las flores de la variedad alba, mostraron los parámetros de color representativos del color

blanco, presentando una mayor luminosidad (59.4), un matiz inferior (117.14°h) y un croma muy bajo (2.96), comparados con las flores de la especie tipo (Figura 8).

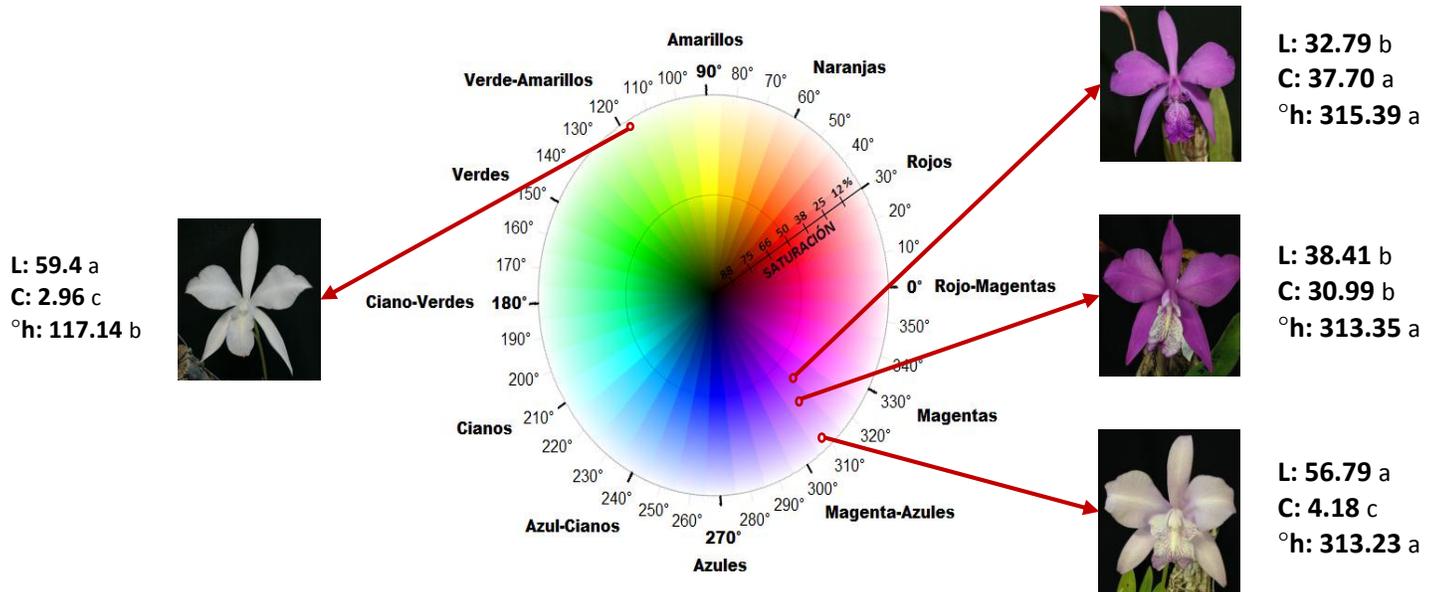


Figura 8. Colorimetría de las flores de la especie tipo de *Laelia speciosa* y de sus variedades alba, albescens y rubra (N=3). Para L; $F < 0.0031$, $R^2 = 0.807$. Para $^{\circ}h$; $F < 0.0001$, $R^2 = 0.999$. Para C; $F < 0.0001$, $R^2 = 0.984$; Tukey-Kramer, letras diferentes muestran diferencias significativas.

Estos resultados de colorimetría de las flores de *L. speciosa* demuestran las diferencias en la coloración entre la especie tipo y las variedades albescens y rubra, en las cuales la saturación incrementa conforme la pigmentación de la variedad aumenta de intensidad, que las ubica en el rango del color que se ha observado en las flores pigmentadas debido a la presencia de antocianinas. Los parámetros encontrados en la variedad alba demuestran una ausencia de pigmentos ciánicos, su ubicación en el círculo cromático es en el rango del verde, debido posiblemente a otros pigmentos como la clorofila (Lee, 2007; Vignolini *et al.*, 2012).

Con la determinación del contenido de antocianinas en las flores de la especie tipo de *L. speciosa* y sus tres variedades, se observó una relación directa entre el color de las flores y la concentración de antocianinas. En la especie tipo, las flores presentaron un contenido de 131.65 $\mu\text{g/g}$ de antocianinas, encontrando un contenido de 1.85 veces más en las flores de la variedad rubra (243.68 $\mu\text{g/g}$) y 4.47 veces menos en las flores de la variedad albescens (29.44 $\mu\text{g/g}$). Las flores de la variedad alba presentaron el contenido más bajo de antocianinas (2.64 $\mu\text{g/g}$), un valor 49.86 veces inferior al observado por la especie tipo. En la figura 9 se muestra el contenido de antocianinas de las flores de *L. speciosa*, de la especie tipo y de las variedades alba, albescens y rubra.

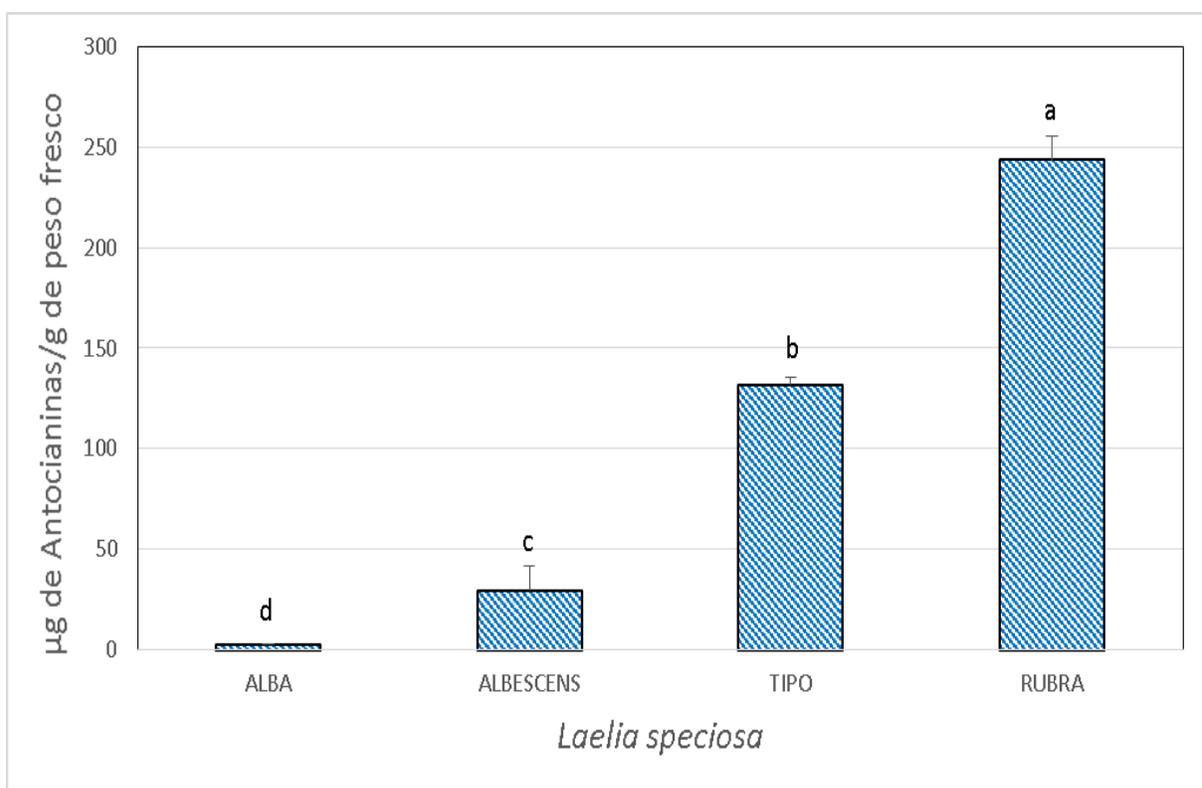


Figura 9. Contenido de antocianinas en flores de la especie tipo de *L. speciosa* y las variedades alba, albescens y rubra, expresado como equivalentes a cianidina (N=3). $F < 0.0001$, $R^2 = 0.995$, Tukey-Kramer, letras diferentes muestran diferencias significativas.

Los valores del contenido de antocianinas en las flores de *L. speciosa* están dentro del intervalo de lo reportado para flores de tonos rosados, el que puede variar desde 10 a 1000 $\mu\text{g/g}$. En flores blancas de *Rosa x hybrida* se ha detectado hasta 4 $\mu\text{g/g}$ de antocianinas (Schmitzer *et al.*, 2010).

Estos resultados corroboran que la variación del color en las flores de *L. speciosa* es debido al contenido de antocianinas, principalmente a la presencia de cianidina, lo que pudo demostrarse con un análisis espectrofotométrico, obteniendo la máxima absorbancia de cianidina a 535nm, en el rango de luz visible (400-750nm). Este valor máximo de absorbancia fue observado para la especie tipo y la variedad rubra, valor reportada para este tipo de antocianina (Ortega y Guerra, 2006). En las flores de la variedad albescens, la absorbancia mayor fue a 525nm, mostrando una menor presencia de cianidina y mayor contenido de cianidín-glucósido, no se detectó la presencia de cianidina y otros pigmentos en las flores de la variedad alba (Figura 10).

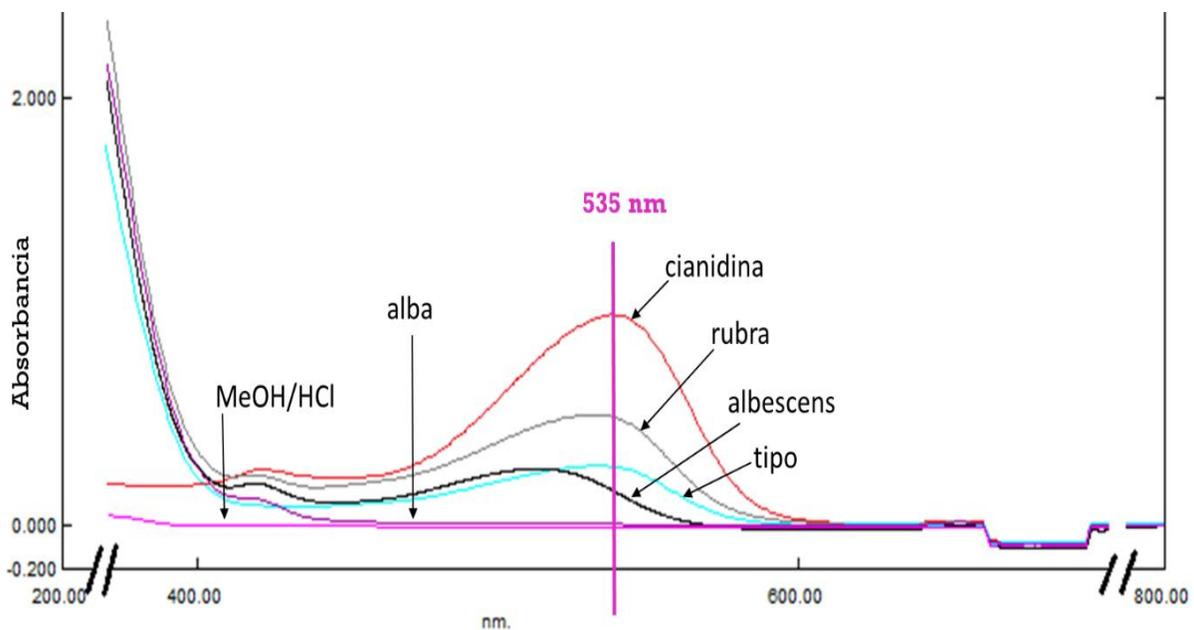


Figura 10. Espectros (400-800 nm) de los extractos de flores de la especie tipo de *L. speciosa*, las de las variedades alba, albescens, rubra y de cianidina.

Las cianidinas presentan diferentes rangos de absorción en el espectrofotómetro debido a la posición de los grupos hidroxilo en los anillos aromáticos, al número de azúcares y de cuales son a los que se encuentra unida, así como al solvente en el que se encuentren disueltas, por ejemplo en un solvente de metanol-HCl, la cianidina presenta una absorbancia de 535nm, la cianidina 3-glucósido de 525nm y la cianidina 3,5-diglucósido de 522nm (Ortega y Guerra, 2006).

CONCLUSIÓN

Los parámetros de color y el contenido de antocianinas en las flores de la especie tipo de *L. speciosa* y en sus tres variedades, demuestran las diferencias del color entre ellas y la relación directa con la presencia de antocianinas.

LITERATURA CITADA

Durbin, M., Denton A. y Clegg M. 2001. Dynamics of mobile element activity in chalcone synthase loci in the common morning glory (*Ipomoea purpurea*). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. United States of America, 98(9):5084-5089.

Fuleki, T. y Francis F.J. 1968. Quantitative methods for anthocyanins. J. Food Sci. 33: 78-83.

Galicia-Flores, L., Salinas-Moreno Y., Espinoza-García B.M. y Sánchez-Feria C. 2008. Physicochemical characterization and antioxidant activity of roselle extracts (*Hibiscus sabdariffa* L.) national and imported. Revista Chapingo Serie Horticult., 14:121-125.

Hunter, R.S. 1942. Photoelectric Tristimulus Colorimetry with Three Filters, J. Opt. Soc. Am. 32, 509-538.

Kobayashi, S., Ishimaru M., Hiraoka K. y Honda C. 2002. Myb related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis. Planta, 215:924-933.

McGuire, R.G. 1992. Reporting of objective colour measurements, HortScience 27:1254-1255.

Lee, D.W., 2007. Nature's palette. University of Chicago Press, London, UK.

Ogata, J., Itoh Y., Ishida M., Yoshida H. y Yoshihiro O. 2004. Cloning and heterologous expression of cDNAs encoding flavonoid glucosyl transferases from *Dianthus caryophyllus*. Plant Biotechnology, V 21(5):367-375.

Ortega, G.M. y Guerra M. 2006. Separación, caracterización estructural y cuantificación de antocianinas mediante métodos químico-físicos. Parte II. ICIDCA. Sobre los derivados de la caña de azúcar 3:2-11.

Schmitzer, V., Slatnar A., Mikulic-Petkovsek M., Veberic R., Krska B. y Stampar F. 2010. Comparative study of primary and secondary metabolites in apricot (*Prunus armeniaca* L.) cultivars. J. Sci. Food Agric., 91: 860-866.

Vignolini, S., Davey M.P., Bateman R.M., Rudall P.J., Moyroud E., Tratt J., Malmgren S., Steiner U. y Glover B.J. 2012. The mirror crack'd: both pigment and structure contribute to the glossy blue appearance of the mirror orchid, *Ophrys speculum*. New Phytologist, 196:1038-1047.

Voss, D.H. 1992. Relating colourimeter measurement of plant colour to the Royal Horticultural Society colour chart. HortScience, 27:1256-1260.

X-Rite, 2002. Guía para entender la comunicación del color. pp. 2-9.

Yoshida, H., Itoh Y., Ozeki Y., Iwashina T. y Yamaguchi M. 2004. Variation in chalcononaringenin-2'-O-glucoside contents of carnations (*Dianthus caryophyllus*) bearing yellow flowers. Scientia Horticulturae, 99:175-186.

Zhao, D., Tang W., Hao Z. y Tao J. 2015. Identification of flavonoids and expression of flavonoid biosynthetic genes in two coloured tree peony flowers. Biochemical and Biophysical Research Communications, 459:450-456.

7.2. Contenido de ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas en cuatro estadios de floración en la especie tipo de *Laelia speciosa* y las variedades alba, albescens y rubra.

RESUMEN

En esta investigación se determinó la actividad de fenilalanina amonio liasa (PAL) y el contenido de ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas en cuatro estadios del desarrollo de la flores de la especie tipo de *L. speciosa* y de las tres variedades naturales alba (flores blancas), albescens (flores rosa pálido) y rubra (flores púrpura). En general se observó una mayor actividad de PAL en los dos primeros estadios de desarrollo de cada variedad y la especie tipo, disminuyendo hasta casi desaparecer en el último estadio, que corresponde a flor abierta (estadio IV). La mayor actividad se detectó en el estadio I de la variedad alba y la menor actividad en el estadio IV de la variedad albescens, con 0.286 u 0.117 U PAL/mg de proteína por hora, respectivamente. La relación indica mayor actividad de PAL en flores aciánicas (alba y albescens) que ciánicas (especie tipo y variedad rubra). El contenido de ácidos fenólicos totales mostró una variación dependiente de cada estadio de floración y de cada una de las variedades y la especie tipo. En cada una las variedades y la especie tipo de *L. speciosa*, el contenido de ácidos fenólicos fue mayor en el estadio I. En la especie alba se obtuvo un contenido de 0.354 μ moles/g de peso fresco, seguidos de la variedad albescens, especie tipo y variedad rubra con 0.268, 0.192 y 0.194 μ moles/g de peso fresco, respectivamente. En el estadio IV, el contenido fue similar (de 0.268 a 0.079 μ moles/g de tejido fresco). No se observó una fuerte variación en el contenido de flavonoides en los primeros estadios de la especie tipo y en las tres variedades, sin embargo, el mayor contenido se presentó en estadio III. La producción de antocianinas fue más alta en las flores ciánicas de *L. speciosa*, observando una relación directa del desarrollo de la flor y el color. Estos resultados se relacionan con la acumulación de las antocianinas y el color, demostrando que en estadios tempranos del desarrollo de la flor, cuando el color aún no se define, el contenido de antocianinas es menor; y cuando las flores están definidas, el contenido de éstas es mayor. Los resultados demuestran que la variación de las flores en las tres variedades y la especie tipo de *L. speciosa*, se debe a la acumulación de antocianinas (estadio IV), con una previa síntesis de flavonoides (estadio III) y ácidos fenólicos (estadios I y II), así como con la actividad de la PAL en las etapas tempranas de la formación de las flores.

Palabras clave: Color, Fenoles, Flores, *L. speciosa*, actividad de PAL.

ABSTRACT

In this research was determined the activity of phenylalanine ammonia lyase (PAL) and the content of phenolic acids, flavonoids and anthocyanins in four stages of the development of the flowers of the species type of *L. speciosa* and their natural varieties alba (white flowers), albescens (pink flowers) and rubra (purple flowers). In general was observed a greater activity of PAL in the stage I and II of each variety and the species type, decreasing to almost disappear in the last stage that corresponds to flower open (stage IV). The increased activity was detected in stage I of the alba variety and lower activity in stage IV of the variety albescens, with 0.286 and 0.117 U PAL/mg protein per hour, respectively. The ratio indicates higher activity of PAL in acianicas flowers (alba and albescens) to cyan (species type and rubra). The relationship indicates higher activity of PAL in acyanic flowers (alba and albescens) to cyanic (species type and variety rubra). The contents of total phenolic acids showed a dependent variation of each stage of flowering and each of the varieties and the type species. In each the varieties and the type species of *L. speciosa*, phenolic acids content was higher in stage I. The alba variety showed a content of 0.354 $\mu\text{mol/g}$ galic acid equivalent of fresh weight, followed by the variety albescens, species type and variety rubra with 0.268, 0.192 and 0.194 $\mu\text{mol/g}$ galic acid equivalent of fresh weight, respectively. In the stage IV, the content was similar (of 0.268 to 0.079 $\mu\text{mol/g}$ galic acid equivalent of fresh weight). A strong variation in the content of flavonoids not was observed in the first stages of the species type and in their three varieties, however, the greater content is presented in stage III. The production of anthocyanins was higher in the cyanic flowers of *L. speciosa*, noting a direct relationship of the development of the flower and color. These results are related to the accumulation of anthocyanins and color, showing that in the early stages of the development of the flower, when color is not yet defined, the content of anthocyanins is lower; and when the flowers are defined, the content of these is higher. The results show that variation in flowers in the three varieties and the type species of *L. speciosa*, is due to the accumulation of anthocyanins (stage IV), with a preliminary synthesis of flavonoids (stage III) and phenolic acids (stages I and II), as well as the activity of the PAL in the early stages of the formation of flowers.

Keywords: Color, phenols, flowers, *L. speciosa*, PAL activity.

INTRODUCCIÓN

Las antocianinas pertenecen al complejo grupo de los compuestos fenólicos solubles en agua y confieren a frutos, flores y hojas los colores azul, rojo y violeta, se sintetizan a partir de los precursores fenilalanina y acetato, por medio de la ruta fenilpropanoides, misma que es regulada a nivel génico y está altamente influenciada por factores ambientales (Kong *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004). Las antocianinas se sintetizan en determinados tejidos y únicamente durante determinadas etapas de vida de la planta, las cuales han sido objeto de investigación genética y bioquímica, cuyos resultados han permitido conocer la ruta de biosíntesis de los flavonoides, misma que da información acerca de las reacciones involucradas y sobre algunos genes que son altamente expresados en los diferentes estadios de la formación de flores y frutos, cuando ocurre el desarrollo del color (Boss *et al.*, 1996).

La acumulación visible de estos compuestos usualmente refleja la actividad de las enzimas involucradas en la ruta biosintética (Jaakola *et al.*, 2002). Estudios de diferentes especies, como arábido (*Arabidopsis thaliana*), maíz (*Zea mays*), petunia (*Petunia hybrida*), tabaco (*Nicotiana tabaco*) y vid (*Vitis vinífera*), han llevado a dilucidar las rutas de la expresión de genes que codifican a las enzimas (Downey *et al.*, 2003; Achnine *et al.*, 2004).

Zhang (2004), menciona que la síntesis de estos pigmentos comienza con la conversión de los precursores fenilalanina y acetato, iniciando con la producción de ácidos fenólicos, que son convertidos a los flavonoides básicos como las chalconas, naringenina, quercetina y kaempferol, entre otros (Wesche, 1999), a partir de lo que se dirige el flujo de carbono a la síntesis de las antocianinas como la cianidina, delphinidina y peonidina (Camire, 2002). Esta etapa es de gran importancia, ya que los diferentes patrones de hidroxilación que se distinguen en las antocianinas generan los colores característicos que van desde rojo hasta púrpura (Eder, 1996). La expresión de los cinco genes que codifican para las enzimas PAL, CHS, F3H, DFR Y ANS se

producen en dos fases: en la floración (temprana) y al final de la floración (Boss *et al.*, 1996).

Durante el desarrollo de las flores se han reportado cambios en la expresión de dichos genes, con una relación directa en la síntesis de diversos ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas. En flores de Jamaica (*Hybiscus sabdariffa*), el color está asociado al contenido y tipo de fenoles. Los cálices oscuros tienen más antocianinas que los cálices claros, pero los blancos o verdes carecen de éstos y de flavonoides (Christian y Jackson, 2009) o están en cantidades mínimas (Salinas-Moreno *et al.*, 2012). Una relación similar ha sido reportada en diversas flores como las de *Campanula isophylla* (Justesen *et al.*, 1997), de *Rosa × hybrida* (Schmitzer *et al.*, 2009) y de cártamo (*Carthamus tinctorius*) (Nidhal *et al.*, 2011)

En el capítulo anterior (7.1) se describió una relación directa entre el contenido de antocianinas y el color de las flores de *Laelia speciosa* en el estadio IV (etapa final de la floración), sin embargo se desconoce esta relación en los diferentes estadios de floración (I, II y III), así como con la producción de ácidos fenólicos y flavonoides. Es por ello, que en la presente investigación se determinó el contenido de ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas en cuatro estadios del desarrollo de la flores de la especie tipo de *L. speciosa* y de las tres variedades naturales alba (flores blancas), albescens (flores rosa pálido) y rubra (flores púrpura).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizaron flores de la especie tipo de *L. speciosa* y de las variedades alba, albescens y rubra, de cuatro estadios de desarrollo: Estadio I, Botón floral de 10mm (2 semanas); Estadio II, Botón floral de 35mm (3 semanas); Estadio III, Botón floral de 75mm (4 semanas); y Estadio IV, Flor abierta (6 semanas) (Figura 11). Los botones y flores fueron obtenidos de plantas de una colección particular (CAFISMO SPR de RL),

donde se mantienen cultivo bajo condiciones de invernadero. Fueron pulverizados en fresco con nitrógeno líquido y almacenados a -70° C.



Figura 11. Estadios de desarrollo en estudio de las flores de *Laelia speciosa*: I, Botón floral de 10mm de 2 semanas de edad; II, Botón floral de 35mm de 3 semanas; III, Botón floral de 75mm de 4 semanas; IV, Flor abierta de 6 semanas.

Cuantificación de antocianinas totales

El contenido de antocianinas fue determinado por el método de Fuleki y Francis (1968), que cuantifica antocianinas totales con equivalente a cianidina, mediante análisis espectrofotométrico. Las antocianinas se extrajeron con metanol/HCl 37% (99:1v/v), adicionando 1 mL por cada 0.1 g de tejido de cuatro estadios de desarrollo de las flores de la especie tipo y las tres variedades (n=3) en tubos Eppendorf de 2 mL, cubiertos con papel aluminio para evitar el paso de la luz. Los tubos con las muestras fueron sometidos a agitación severa en vortex por 1 min y posteriormente se centrifugaron por 10 min a 10,000 rpm, decantando el sobrenadante. A la pastilla

se le adicionó otro volumen de 1 mL de metanol/HCl 37% (99:1v/v), repitiendo la extracción en vortex y centrifugación, obteniendo el sobrenadante. Ambos sobrenadantes se unieron para obtener 2 mL de extracto con antocianinas. Estos extractos también fueron utilizados para la determinación de fenoles totales y flavonoides.

La absorbancia de cada muestra se determinó a 535nm (λ), absorbancia máxima de la cianidina, a partir de ésta se calculó la concentración de antocianinas totales expresado en equivalentes de cianidina (mg/mL de extracto), mediante la siguiente fórmula:

$$mg/mL = \frac{(Absorbancia\ máxima\ en\ nm) (PM\ g/L) (f)}{\epsilon}$$

Donde: ϵ es el coeficiente de extinción molar de cianidina (32000), en una celda de cuarzo de 1cm de longitud, de un gramo de un compuesto con un peso molecular (PM) de 287.24, diluido en 2 mL de solvente (f) (Fuleki y Francis, 1968).

Por lo tanto el cálculo se realizó mediante esta ecuación:

$$mg/mL = \frac{(Absorbancia\ a\ 535nm) (287.24\ g/L) (2)}{32000}$$

Cada uno de los extractos fue analizado por espectrofotometría en un rango de ultravioleta visible (UV-Vis, 200 – 800 nm), en un espectrofotómetro modelo UV-Vis VELAB-VE51000UV, empleando celdas de cuarzo de 1cm de paso óptico, utilizando como blanco el respectivo disolvente de extracción [metanol/HCl 37% (99:1v/v)] y 10 μ g/mL de cianidina como solución estándar.

Determinación de fenoles totales mediante la técnica Folin-Ciocalteu

Los compuestos fenólicos de los extractos antes obtenidos fueron medidos colorimétricamente con el reactivo de Folin-Ciocalteu usando ácido gálico analítico como estándar a 725 nm en un espectrofotómetro UV-Vis VELAB-VE51000UV. La curva de calibración fue preparada usando concentraciones del estándar entre 0 y 2 μ moles, expresando el total de fenoles en equivalentes de μ moles de ácido gálico por gramo de peso fresco (Schwarz, 2001). La curva de calibración mostró una linealidad óptima para la cuantificación de fenoles totales, presentando un coeficiente de regresión de 0.9952 (Figura 12).

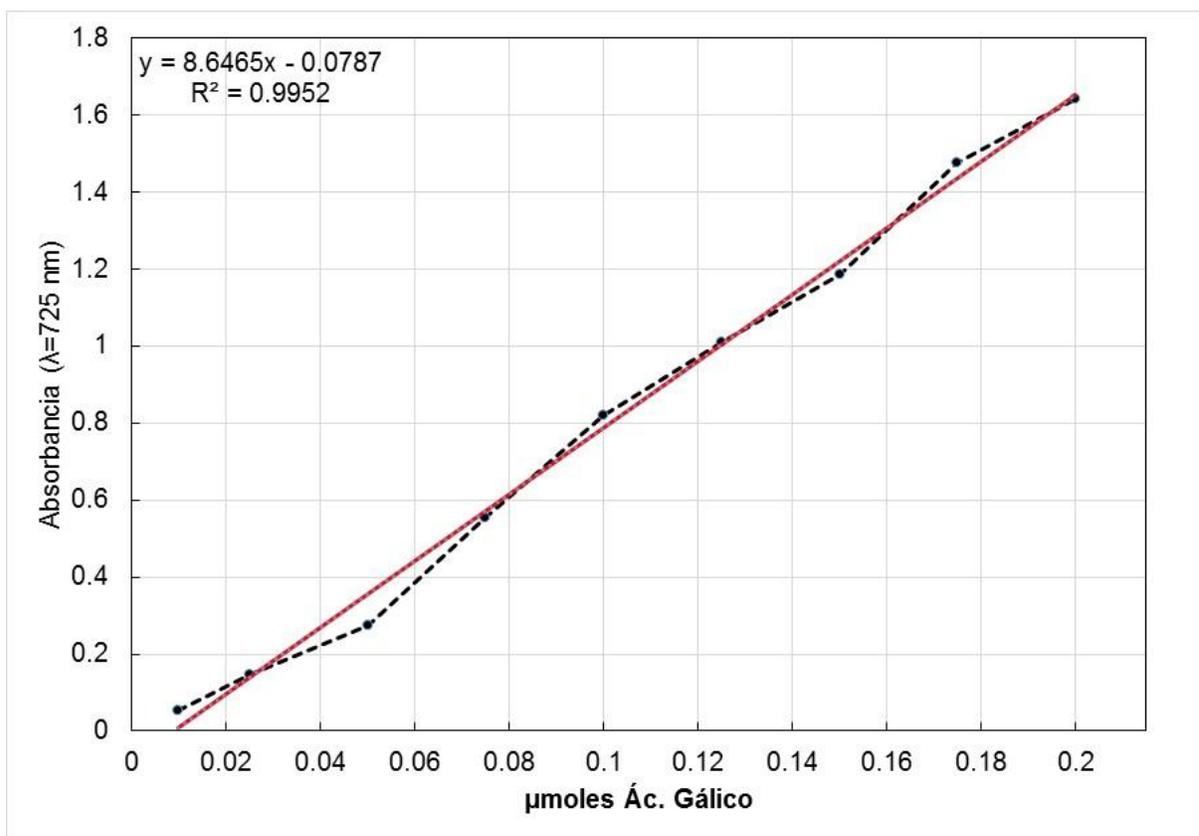


Figura 12. Curva de calibración para fenoles totales equivalentes a ácido gálico (μ moles Ác. Gálico/g peso fresco).

A 100 µL de cada uno de los extractos de 4 estadios de las flores de la especie tipo y las tres variedades se le añadieron y 750 µL de solución Folin-Ciocalteu preparada 1:10 con agua bidestilada estéril. Cada tubo de ensayo se sometió a agitación severa en vortex durante 5 minutos. Posteriormente a cada tubo se le agregaron 750 µL de una solución acuosa de Na₂CO₃ (6%), mezclando nuevamente y dejando reposar durante 60 min a temperatura ambiente y en obscuridad, para luego obtener las medidas de absorbancia a 725nm en un espectrofotómetro UV-Vis VELAB-VE51000UV. Los valores equivalentes a µmoles de ácido gálico/g peso fresco de cada muestra fueron obtenidos con la ecuación de la recta de la curva de linealidad:

$$y = (8.6465x) - 0.0787$$

$$x = \frac{y - 0.0787}{8.6465}$$

Donde:

y = absorbancia obtenida

x = µmoles de ácido gálico/g peso fresco

Determinación de la concentración de flavonoides mediante la técnica colorimétrica de cloruro de aluminio (AlCl₃)

El contenido de flavonoides se determinó a través de un ensayo colorimétrico propuesto por Kim (2003). Utilizando como estándar una solución de quercetina. Los resultados fueron expresados en µmoles quercetina/g peso fresco. La cuantificación se obtuvo mediante una curva de calibración de quercetina con un rango de 0.1 a 1 µmoles. Mediante el análisis de regresión lineal de las concentraciones de la solución estándar de quercetina, empleados para el trazado de la curva de la calibración, se observa linealidad cercana a 1 ($R^2 = 0.9995$) (Figura 13).

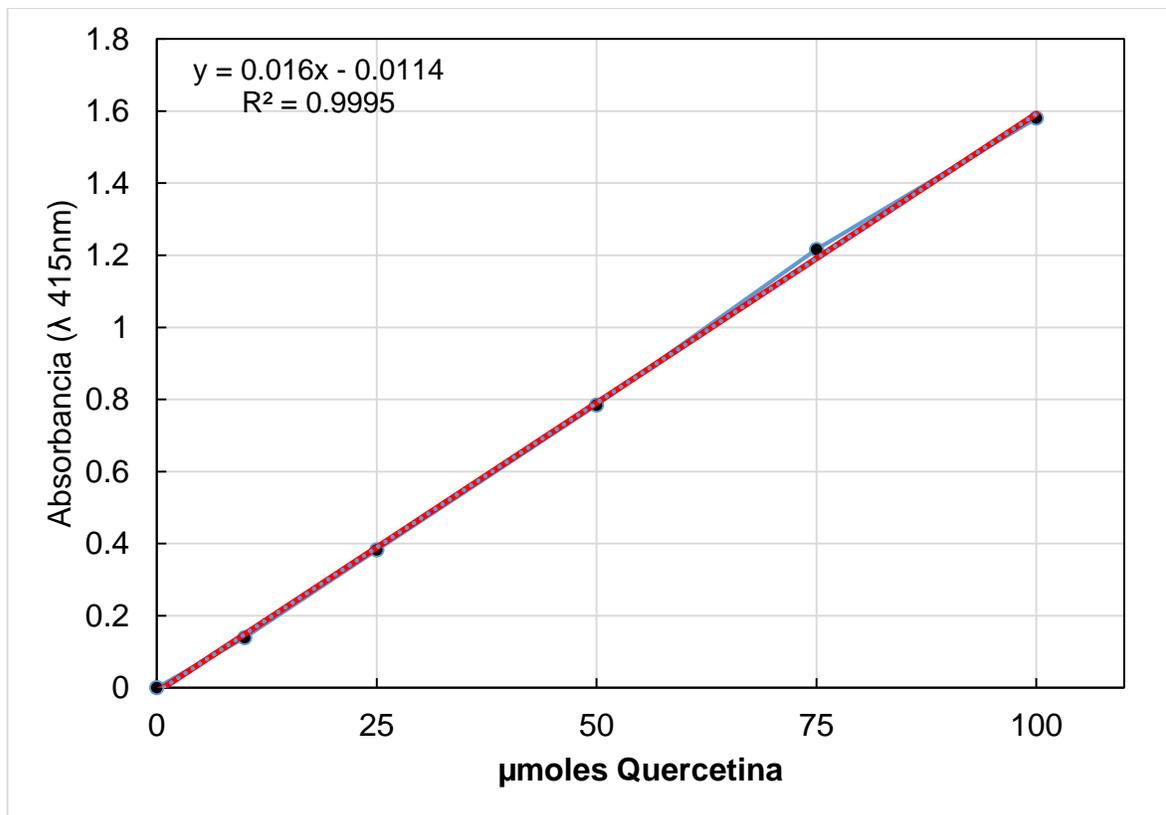


Figura 13. Curva de calibración para flavonoides equivalentes a quercetina (μmoles Quercetina/g peso fresco).

A 100 μL de cada uno de los extractos de 4 estadios de las flores de la especie tipo y las tres variedades se le añadieron 490 μL de MeOH, se sometió a agitación en vortex y posteriormente se agregaron 1 mL de MeOH, 100 μL de AlCl₃ (10%) y 100 μL de CH₃O₂K (1 M). Se sometieron a agitación severa en vortex y se dejaron reposar 30 minutos en obscuridad. Las mediciones se realizaron a 415 nm en un espectrofotómetro UV-Vis VELAB-VE51000UV.

Los valores equivalentes a μmoles de quercetina/g peso fresco de cada muestra fueron obtenidos con la ecuación de la recta de la curva de linealidad:

$$y = (0.016x) - 0.0114$$

$$x = \frac{y + 0.0114}{0.016}$$

Donde:

y = absorbancia obtenida

x = μ moles de quercetina/g peso fresco

Determinación de la actividad enzimática de Fenilalanina Amonio Liasa

La actividad de PAL (EC 4.3.1.5) fue determinada de acuerdo a la metodología descrita por Martínez-Téllez y Lafuente (1997). Para esto, se tomaron 100 mg de tejido de cuatro estadios de las flores de la especie tipo y las tres variedades y se adicionaron 100 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP) y se pulveriza en nitrógeno líquido en un mortero estéril. Inmediatamente después se adicionaron 5 mL de buffer borato de sodio (50 mM) a pH 8.5 y 10 μ L de β -mercaptoetanol (0.01 M). La solución se sometió a agitación intensa en vortex durante 5 min (la solución siempre se mantuvo fría). Posteriormente se centrifugaron a 12000 rpm por 20 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante donde se encuentra suspendida la enzima. Se filtró con membrana 0.45 μ m y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

De cada extracto se tomaron dos alícuotas de 1 mL y se colocaron en tubos diferentes. Al tubo 1 se adicionaron 100 μ L de fenilalanina (100mM), al tubo 2 se adicionaron 100 μ L de agua destilada. Se midió la absorbancia inicial a 290 nm en un espectrofotómetro UV-Vis VELAB-VE51000UV. Posteriormente los tubos se colocaron en baño de agua a 40°C durante 60 minutos después de los cual fueron enfriados rápidamente y se midió la absorbancia a 290 nm. Los resultados de las absorbancias obtenidas de ambos tubos fueron interpretados con las siguientes fórmulas:

$$1 \text{ U PAL} = (\text{Abs final}) - (\text{Abs inicial})$$

Donde:

Abs final = (Absorbancia de tubo 1 al final de la reacción) – (Absorbancia de tubo 1 al inicio de la reacción)

Abs inicial = (Absorbancia de tubo 2 al final de la reacción) – (Absorbancia de tubo 2 al inicio de la reacción)

El valor obtenido de la actividad de la enzima se expresa en la cantidad de enzima que produce 1µmol de ácido cinámico en una hora.

La actividad específica de la PAL se reporta como 1 unidad de PAL/miligramo de proteína por hora (1U de PAL/mg por h).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad de PAL

La actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) varió entre los estadios de floración de cada variedad y la especie tipo de *L. speciosa* y entre las variedades. En la variedad alba, su mayor actividad se presentó en el estadio I con 0.286 U PAL/mg de proteína por hora, mientras que en los estadios II y IV mostró una actividad seis veces menor (0.047 y 0.045 U PAL/mg de proteína por hora respectivamente) y tres veces menos en el estadio III; en los estadios I y II de la variedad albescens se presentó una actividad constante (0.101 y 0.117 U PAL/mg de proteína por hora respectivamente) para disminuir en el estadio III (0.069 U PAL/mg de proteína por hora) y en el estadio IV hasta seis veces menos (0.018 U PAL/mg de proteína por hora) que en su punto máximo en el estadio II; en la especie tipo la máxima actividad se presentó en el estadio I con 0.181 U PAL/mg de proteína por hora y disminuye en los estadios II y III (0.106 y 0.054 U PAL/mg de proteína por hora respectivamente)

hasta llegar a cero en el estadio IV; en la variedad rubra la máxima actividad de PAL se observó en el estadio II con 0.164 U PAL/mg de proteína por hora, casi dos veces más que en el estadio I (0.088 U PAL/mg de proteína por hora), disminuyendo después a 0.004 en el estadio III y a 0.002 en el estadio IV (Figura 14).

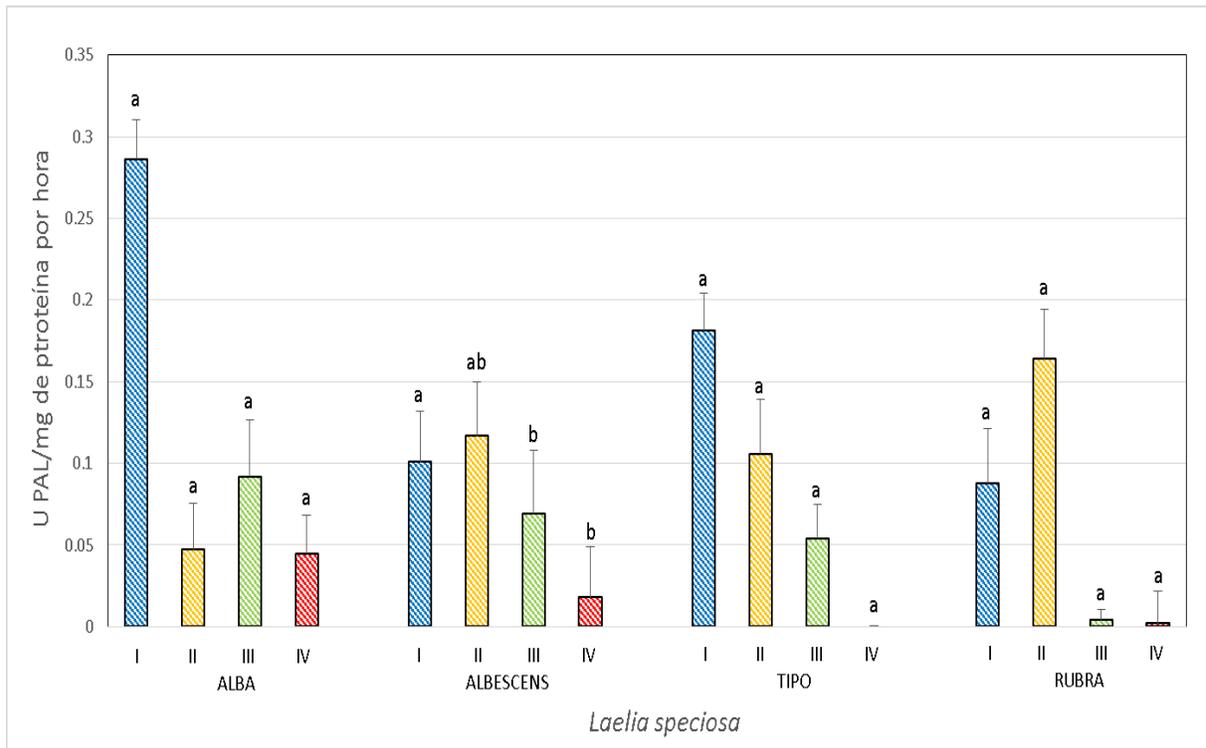


Figura 14. Actividad de Fenilalanina amonio liasa en cuatro estadios de las flores de la especie tipo de *L. speciosa* y las variedades alba, albescens y rubra, expresado en U de PAL por mg de proteína por hora de peso (N=3). Para la variedad alba $F=0.279$, $R^2=0.365$; para la albescens $F=0.004$, $R^2=0.795$; para la tipo $F=0.673$, $R^2=0.167$; para la rubra $F=0.186$, $R^2=0.434$; Tukey-Kramer, letras diferentes muestran diferencias significativas.

En general se observa que la mayor actividad de PAL se presenta en los dos primeros estadios de desarrollo y disminuye hasta casi desaparecer en el último estadio. Su mayor actividad se detectó en el estadio I de la variedad alba y la menor actividad en el estadio IV de la variedad albescens. Se ha reportado que la actividad de PAL durante el desarrollo de flores, generalmente se presenta en los primeros estadios, disminuyendo en relación al desarrollo de la flor. En *Hibiscus mutabilis*, la actividad de PAL disminuye en relación a la maduración o senescencia de sus flores (Amrhein y Gert, 1989); Dong *et al.* (1998) reportaron en manzana (*Malus domestica* Borkh.) una relación directa entre el desarrollo de sus flores con la actividad de PAL, la que permaneció constante hasta un estadio III, que corresponde a botón floral previo la apertura de éste para la floración completa, posteriormente disminuyó.

En general, una alta actividad de PAL se produce en estadios tempranos para producir primeramente ácidos fenólicos, los que no necesariamente son precursores de flavonoides y antocianinas, es por ello que esta actividad puede darse aun en flores acianicas. En flores cianicas, primeramente se acumulan ácidos fenólicos y flavonoides para después en estadios tardíos de la floración, llevar a la síntesis de antocianidinas y antocianinas (Narbona *et al.*, 2014).

Ácidos fenólicos totales

El contenido de ácidos fenólicos totales mostró una variación dependiente de cada estadio de floración y de cada una de las variedades y la especie tipo. Un mayor contenido de éstos se observó en el estadio I de la variedad alba con 0.354 $\mu\text{moles/g}$ de peso fresco, seguidos de los estadios I de la variedad albescens, especie tipo y variedad rubra con 0.268, 0.192 y 0.194 $\mu\text{moles/g}$ de peso fresco (Figura 15).

En cada una de las variedades y la especie tipo de *L. speciosa*, el contenido de ácidos fenólicos disminuyó en el estadio IV, con valores muy similares que van de 0.268 a 0.079 $\mu\text{moles/g}$ de tejido fresco en el estadio IV. En los estadios I y II de la especie tipo la concentración de fenoles totales es de 0.192 y 0.179 $\mu\text{moles/g}$ de tejido fresco

respectivamente, dos veces más que en los estadios III y IV (0.094 y 0.085 $\mu\text{moles/g}$ de tejido fresco). En la variedad rubra se observan 0.194 $\mu\text{moles/g}$ de tejido fresco en el estadio I para disminuir en los estadios II (0.170 $\mu\text{moles/g}$) y III (0.110 $\mu\text{moles/g}$) hasta llegar a 2.5 veces menos que en el estadio I (Figura 15).

El contenido de ácidos fenólicos se relaciona directamente con la actividad de PAL observada durante el desarrollo de las flores de *L. speciosa*, ya que en los estadios con una alta actividad de PAL, hay un mayor contenido de ácidos fenólicos. Este resultado concuerda con lo reportado por Narbona *et al.* (2014), que describen primero la síntesis y acumulación de ácidos fenólicos en estadios tempranos de la floración, con una alta actividad de PAL.

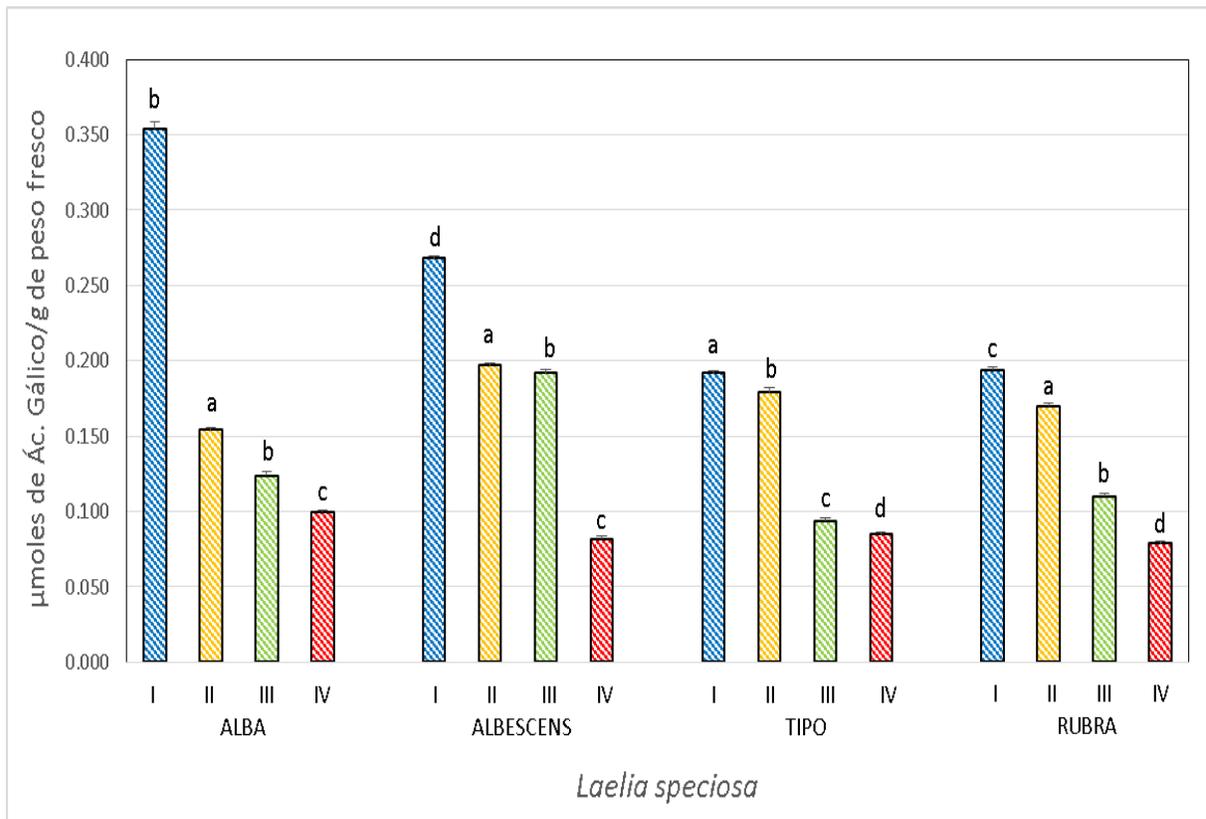


Figura 15. Contenido de fenoles totales en cuatro estadios de las flores de la especie tipo de *L. speciosa* y las variedades alba, albescens y rubra, equivalentes a μmoles de ácido gálico/g de peso (N=3). $F < 0.0001$, $R^2 = 0.985$, Tukey-Kramer, letras diferentes muestran diferencias significativas.

Contenido de flavonoides

En cuanto al contenido de flavonoides en los diferentes estadios de desarrollo de las flores de *Laelia speciosa*, no se observó una fuerte variación en los primeros estadios de las variedades alba y albescens, pero si una alta disminución en el estadio IV. En la variedad alba se obtuvo 11.8 $\mu\text{moles/g}$ de peso fresco equivalentes a quercetina en el estadio I y solamente 4.5 $\mu\text{moles/g}$ de peso fresco en el estadio IV. El contenido en la especie tipo fue similar entre los diferentes estadios con 8.7 $\mu\text{moles/g}$ de peso fresco en el estadio I y 7.1 $\mu\text{moles/g}$ de peso fresco en el estadio IV. En la variedad rubra, esta variación fue similar con un contenido de 10.3 $\mu\text{moles/g}$ de peso fresco en el estadio II y 5.9 $\mu\text{moles/g}$ de peso fresco en el estadio IV (Figura 16).

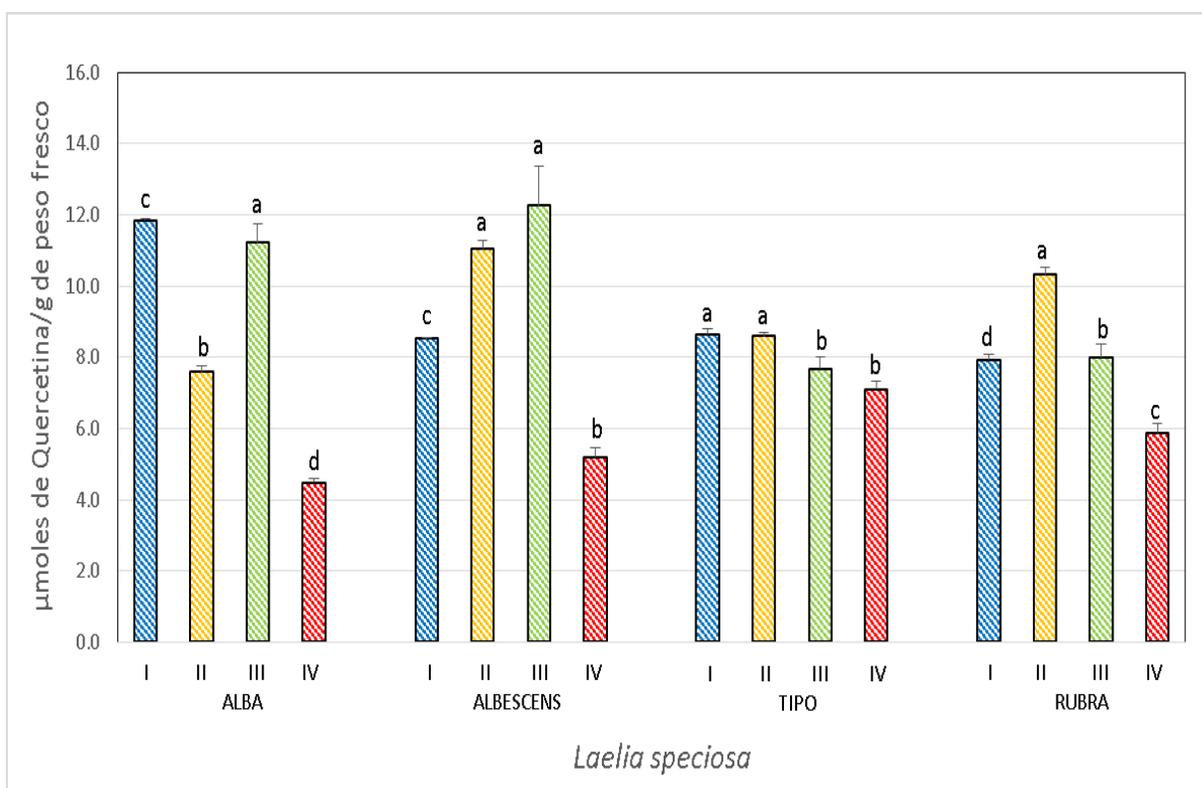


Figura 16. Contenido de flavonoides en cuatro estadios de las flores de la especie tipo de *L. speciosa* y las variedades alba, albescens y rubra, equivalentes a μmoles de quercetina/g de peso fresco (N=3). $F < 0.0001$, $R^2 = 0.972$, Tukey-Kramer, letras diferentes muestran diferencias significativas.

En general se observa una mayor concentración de flavonoides en la primera mitad del desarrollo de la flor para disminuir a casi la mitad en el último estadio.

Contenido de antocianinas

Con la cuantificación de antocianinas totales durante el desarrollo de la flor de *Laelia speciosa*, se observó de que el contenido de éstas en las variedades alba y albescens fue bajo en comparación al de la especie tipo y la variedad rubra; en las primeras, los valores estuvieron en un intervalo de 0.6 $\mu\text{g/g}$ a 29.44 $\mu\text{g/g}$ de tejido fresco equivalentes a cianidina. Sin embargo, el contenido de antocianinas fue mayor en los estadios IV tanto de la especie tipo como la variedad rubra, con 131.65 $\mu\text{g/g}$ y 243.68 $\mu\text{g/g}$ de tejido fresco, respectivamente (Figura 17).

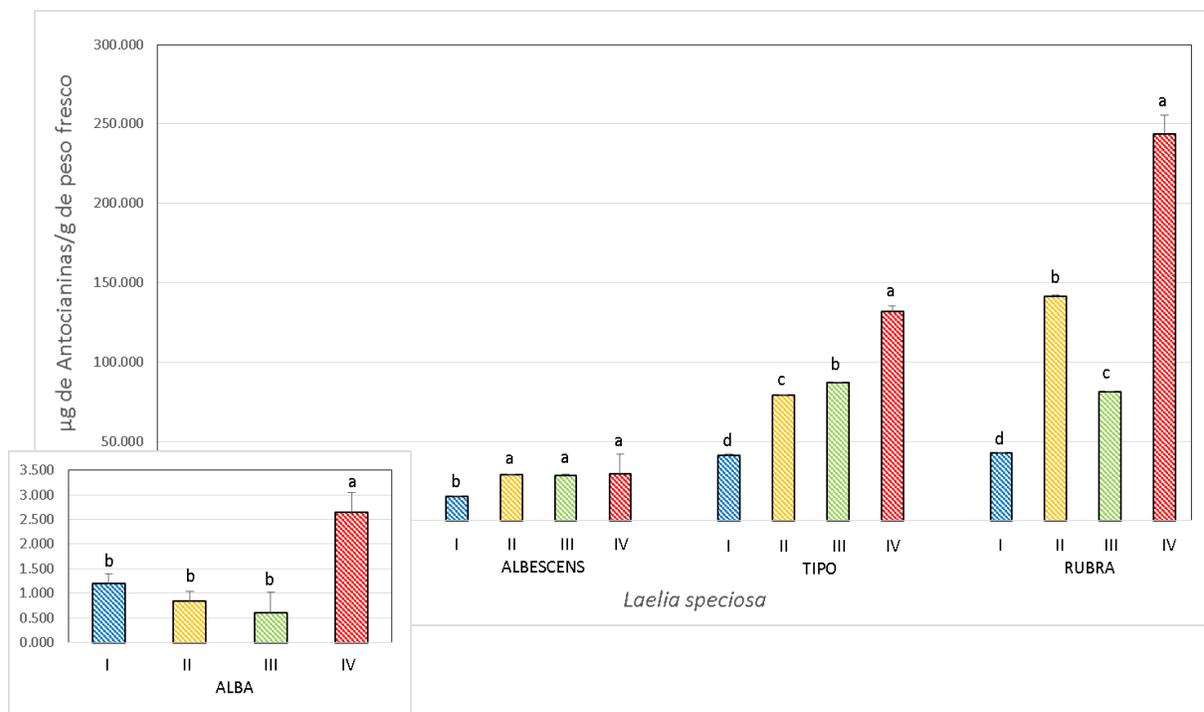


Figura 17. Contenido de antocianinas en cuatro estadios de las flores de la especie tipo de *L. speciosa* y las variedades alba, albescens y rubra, equivalentes a μg de cianidina/ g de peso fresco (N=3). Para la variedad alba $F=0.000$, $R^2=0.910$; para la albescens $F=0.002$, $R^2=0.826$; para la tipo $F=<0.001$, $R^2=0.998$; para la rubra $F=<0.0001$, $R^2=0.995$; Tukey-Kramer, letras diferentes muestran diferencias significativas.

La producción de antocianinas fue más alta en las flores ciánicas de *L. speciosa*, observando que la concentración aumenta paulatinamente con el desarrollo de la flor y con la variedad del color. Estos resultados se relacionan con la acumulación de las antocianinas y el color, demostrando que en estadios tempranos del desarrollo de la flor, cuando el color aún no se define, el contenido de antocianinas es menor; y cuando las flores están definidas, el contenido de éstas es mayor. Esto concuerda con los reportado para flores de Jamaica (*Hybiscus sabdariffa* (Christian y Jackson, 2009; Salinas-Moreno *et al.*, 2012), de *Campanula isophylla* (Justesen *et al.*, 1997), de *Rosa x hybrida* (Schmitzer *et al.*, 2009) y de cártamo (*Carthamus tinctorius*) (Nidhal *et al.*, 2011).

Con estos resultados se evidencia que la variación de las flores en las tres variedades y la especie tipo de *L. speciosa*, se debe a la acumulación de antocianinas (estadio IV), con una previa síntesis de flavonoides (estadio III) y ácidos fenólicos (estadios I y II), así como con la actividad de la PAL en las etapas tempranas de la formación de las flores.

CONCLUSIÓN

La actividad de PAL, el contenido de ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas, se relaciona directamente con el color durante el desarrollo de las flores de *L. speciosa* y entre la especie tipo de *L. speciosa* y las tres variedades naturales alba, albescens y rubra.

LITERATURA CITADA

Achnine, L., Blancaflor E.B., Rasmussen S. y Dixon R.A. 2004. Localisation of L-phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell*, 16:3098-3109.

Amrhein, N. y Gert F. 1989. Anthocyanin formation in the petals of *Hibiscus mutabilis* L. *Z. Naturforsch.*, 44c:357-360.

Boss, P.K., Davies C. y Robinson S.P. 1996. Analysis of expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* cv. Shiraz grape berries and implication for pathway regulation. *Plant Physiol.*, 111:1059-1066.

Camire, M.E. 2002. Blueberry and grape anthocyanins as breakfast cereal colorant. *J. Fd. Sci.*, 67:438.

Christian, K.R. y Jackson J.C. 2009. Changes in total phenolic and monomeric anthocyanin composition and antioxidant activity of three varieties of sorrel (*Hibiscus sabdariffa*) during maturity. *J. Food Compos. Anal.*, 22:663-667.

Dong, Y.H., Beuning L., Davies K., Mitra D., Morris B. y Kootstra A. 1998. Expression of pigmentation genes and photo-regulation of anthocyanin biosynthesis in developing Royal Gala apple flowers. *Aust. J. Plant Physiol.*, 25:245-252.

Downey, M., Harvey J.S. y Robinson S.P. 2003. Synthesis of flavonols and expression of flavonol synthase genes in the developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). *Grape Wine Res.*, 9:110-121.

Eder, R. 1996. Pigments. In: Handbook of food analysis (Ndelet, M., Ed.).

Fuleki, T. y F.J. Francis. 1968. Quantitative methods for anthocyanins. *J. Food Sci.* 33: 78-83.

Jaakola, L., Maatta K., Pirtila A.M., Torronen R., Karenlampi S. y Hohtola A. 2002. Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation and anthocyanin, proanthocyanidin and flavonol levels during bilberry fruit development. *Plant Physiol.*, 130:729-739.

Justesen, H., Andersen A.S. y Brandt K. 1997. Accumulation of anthocyanins and flavones during bud and flower development in *Campanula isophylla* Moretti. *Annals of Botany*, 79:355-360.

Kim, D., Jeung S. y Lee Ch. 2003. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*, 81:321-326.

Kong, J.M., Chiam L.S., Goh N.K., Chia T.F y Brouillard C. 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64:923-933.

Martínez-Téllez M.A. y M.T. Lafuente. 1997. Effect of high temperature condition in phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase and polyphenol oxidase in flavedo of 'Fortune' mandarin fruit. *J. Plant Physiol.*, 150:674-678.

Nidhal, S., Kamel M., Ghait H., Ferid L. y Brahim M. 2011. Variation in phenolic composition and antioxidant activity during flower development of safflower

(*Carthamus tinctorius* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59(9):4455-4463.

Salinas-Moreno, Y., Zúñiga-Hernández A.R.E., Jiménez-De la Torre L.B., Serrano-Altamirano V. y Sánchez-Feria C. 2012. Color en cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) y su relación con características físico-químicas de sus extractos acuosos. Rev. Chapingo Serie Hortic., 18:395-407.

Schmitzer, V., Veberic R., Osterc G. y Stampar F. 2009. Changes in the Phenolic Concentration during Flower Development of Rose 'KORcrisett'. Journal of the American Society for Horticultural Science, 134(5):491-496.

Schwarz, K., Bertelsen G., Nissen L., Gardner P., Heinonem M., Hopia A., Huynh-Ba T., Lambelet P., McPhail D., Skibsted L. y Tijburg L. 2001. Investigation of plants extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. Eur. Food Res. Technol., 212:319-328.

Wesche, 1999. *Hibiscus* anthocyanins effects of interactions with poliphenoloxidase, acetaldehyde and catching on colour stability.

Zhang, W., Franco C., Curtin C. y Conn S. 2004. To stretch the boundary of secondary metabolite production in plant cell-based bioprocessing: Anthocyanin as a case study. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 5:264-271.

VIII. CONCLUSIONES GENERALES

Los parámetros de color y el contenido de antocianinas en las flores de la especie tipo de *L. speciosa* y en sus tres variedades, demuestran las diferencias del color entre ellas y la relación directa con la presencia de antocianinas.

La actividad de PAL, el contenido de ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas, se relaciona directamente con el color durante el desarrollo de la flores de *L. speciosa* y entre la especie tipo de *L. speciosa* y las tres variedades naturales alba, albescens y rubra.

IX. LITERATURA CITADA GENERAL

Andersen, Ø.M., Jordheim, M. 2006. The anthocyanins. En: Andersen, Ø.M., Markham, K.R. (eds.), *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*, pp. 471–551. CRC Press, Boca Raton, EEUU

Ayala Silva, T. and Meerow, A.W. 2007. Evaluation of flower color using a colorimeter and the Royal Horticultural Society charts. 52nd Annual Meeting of the Interamerican Society of Tropical Horticulture. Puerto Rico, 23-29 sept.

Bravo, L. 1998. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr. Rev.*, 56(11):317-333.

Brockington, S.F., Walker, R.H., Glover, B.J., Soltis, P.S., Soltis, D.E. 2011. Complex pigment evolution in the Caryophyllales. *New Phytologist* 190:854-864.

Campbell, D.R., Bischoff, M., Lord, J.M., Robertson, A.W. 2012. Where have all the blue flowers gone: pollinator responses and selection on flower colour in New Zealand *Wahlenbergia albomarginata*. *Journal of Evolutionary Biology* 25:352-364.

Chen, S.M., Li, C.H., Zhu, X.R., Deng, R.Y., Sun, W., Wang, I.S., Chen, F.D., Zhang, Z. 2012. The identification of flavonoids and the expression of genes of anthocyanin biosynthesis in the chrysanthemum flowers. *Biologia Plantarum*. Volume 56(3):458-464.

Chen, S., Xiang, Y., Deng, J., Liu, Y., Li, S. 2013. Simultaneous analysis of anthocyanin and non-anthocyanin flavonoid in various tissues of different *Lotus* (*Nelumbo*) cultivars by HPLC-DAD-ESI-MSn. *PLoS ONE* 8:e62291.

Clegg, M.T. y Durbin M.L. 2000. Flower color variation: study of evolution. *PNAS*, 97(13):7016-7023.

Davies, K. 2009. Modifying anthocyanin production in flowers anthocyanins biosynthesis, functions and applications. En: *Anthocyanins* (Gould, Davies y Winefield, Eds.). Springer Science Business Media. New Zealand. pp. 49-83.

Davies, K.M. y Schwinn K.E. 2003. Transcriptional regulation of secondary metabolism. *Functional Plant Biology*, 30:913–925.

Dick, C.A., Buenrostro, J., Butler, T., Carlson, M.L., Kliebenstein, D.J., Whittall, J.B. 2011. Arctic mustard flower color polymorphism controlled by petal-specific downregulation at the threshold of the anthocyanin biosynthetic pathway. *PLoS ONE* 6:e18230.

Dixon, R.A. 2005. Engineering of plant natural product pathways. *Curr. Op. Plant Biol.*, 8:329–336.

Durbin, M., Denton A. y Clegg M. 2001. Dynamics of mobile element activity in chalcone synthase loci in the common morning glory (*Ipomoea purpurea*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. United States of America, 98(9):5084-5089.

Espejo, A., García J., López A., Jiménez R. y Sánchez L. 2002. Orquídeas del Estado de Morelos. Orquídea (Méx.) Volumen 16. México, D. F. 332 p.

Franken, P., U. Niesbach-Klosgen, U. Weydemann, L. Marechal-Drouard, H. Saedler y Wienand U. 1991. The duplicated chalcone synthase genes C2 and Whp (white pollen) of *Zea mays* are independently regulated; evidence for translational control of Whp expression by the anthocyanin intensifying gene in. *EMBO Journal*, 10:2605-2612.

Frey, F.M. 2004. Opposing natural selection from herbivores and pathogens may maintain floral color variation in *Claytonia virginica* (Portulacaceae). *Evolution* 58:2426-2437.

Gómez, J.M. 2000. Phenotypic selection and response to selection in *Lobularia maritima*: importance of direct and correlational components of natural selection. *Journal of Evolutionary Biology* 13:689-699.

Glover, B.J. 2007. Understanding flowers and flowering: an integrated approach. Oxford University Press, New York, EEUU.

Griesbach, R.J. and Austin, S. 2005. Comparison of the Munsell and Royal Horticultural Society's color charts in describing flower color. *Taxon* 54 (3): 771-773.

Grotewold, E., 2006. The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annual Review of Plant Biology*. Vol. 57:761-780.

Halbinger, F. y Soto-Arenas M. A. 1997. Laelias of México. Herbario AMO, Cd. De México. 160 p.

He, Q., Shen, Y., Wang, M., Huang, M., Yang, R., Zhu, S., Wang, L., Xu, Y., Wu, R. 2011. Natural variation in petal color in *Lycoris longituba* revealed by anthocyanin components. *PLoS ONE* 6:e22098.

Hopkins, R., Rausher, M.D. 2012. Pollinator-mediated selection on flower color allele drives reinforcement. *Science* 335:1090-1092.

Hughes, N.M. 2011. Winter leaf reddening in 'evergreen' species. *New Phytologist* 190:573-581.

Itoh, Y., Higeta D., Suzuki A., Yoshida H. y Ozeki Y. 2002. Excision of transposable elements from the chalcone Isomerase and dihydroflavonol4-reductase genes may contribute to the variegation of the yellow to the variegation of the yellow flowered carnation (*Dianthus caryophyllus*). *Plant Cell Physiol.*, 43:578-585.

Jaakola, L., Määttä K., Pirttilä A. M., Törröne, R., Kärenlampi S. y Hohtola A. 2002. Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin, and flavonol levels during bilberry fruit development. *Plant Physiology*, 130(2):729-739.

Jez, J.M., Bowman M.E. y Noel J.P. 2002. Role of hydrogen bonds in the reaction mechanism of chalcone isomerase. *Biochemistry*, 41:5168–5176.

Johnson, E.T., Yi H., Shin B., Oh B.J., Cheong H. y Choi G. 1999. *Cymbidium* hybrid dihydroflavonol 4-reductase does not efficiently reduce dihydrokaempferol to produce orange pelargonidin-type anthocyanins *Plant J.*, 19:81-85.

Kelber, A., Vorobyev, M., Osorio, D. 2003. Animal colour vision—behavioural tests and physiological concepts. *Biological Reviews* 78:81-118.

Kevan, P., Giurfa, M., Chittka, L. 1996. Why are there so many and so few white flowers? *Trends in Plant Science* 1:280-284.

Kobayashi, S., Ishimaru M., Hiraoka K. y Honda C. 2002. Myb related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis. *Planta*, 215:924-933.

Kong, J.M., Chiam L.S., Goh N.K., Chia T.F. y Brouillard C. 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64:923-933.

Lazze, M.C., Pizzala R., Perucca P., Cazzalini O., Savio M., Forti L., Vannini V. y Bianchi L. 2006. Anthocyanidins decrease endothelin-1 production and increase endothelial nitric oxide synthase in human endothelial cells. *Molecular Nutrition and Food Research*, 50:44.-51.

Lee, D.W., 2007. Nature's palette. University of Chicago Press, London, UK.

Levin, D.A., Brack, E.T. 1995. Natural selection against white petals in Phlox. *Evolution* 49:1017-1022.

Liew, C.F., Loh C.S., Goh C.J. y Lim S.H. 1998. The isolation, molecular characterization and expression of dihydroflavonol 4-reductase cDNA in the orchid, *Bromheadia finlaysoniana*. *Plant Sci.*, 135:161-169.

López-Luengo, M.T. 2002. Flavonoides. *Fitoterapia*, 21(4):108-114.

Majetic, C.J., Raguso, R.A., Tonsor, S.J., Ashman, T-L. 2007. Flower color/flower scent associations in polymorphic *Hesperis matronalis* (Brassicaceae). *Phytochemistry* 68:865-874.

Markham, K.R. 1996. Novel anthocyanins produced in petals of genetically transformed *lisianthus*. *Phytochemistry*, 42(4):1035-1038.

Masanori, H., Tsukasa, I., Sadamu M. 2008. Flower color and flavonoid variation in *Clematis patens* (Ranunculaceae). *Bull. Nat. Mus. Nat. Sci., Ser. B.* 34(1):43-51.

Miller, R., Owens, S. J., Rørslett, B. 2011. Plants and colour: Flowers and pollination. *Optics and Laser Technology* 43:282-294.

Mori, K., Sugaya, S., Gemma, H., 2005. Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition. *Scientia Horticulturae* 105:319–330.

Napoli, C.A., Fahy D., Wang H.Y. y Taylor L.P. 1999. White anther: A petunia mutant that abolishes pollen flavonol accumulation, induces male sterility, and is complemented by a chalcone synthase transgene. *Plant Physiology*, 120:615-622.

Narbona, E., Buide M.L., Casimiro-Soriguer I. y del Valle J.C. 2014. Polimorfismos de color floral: causas e implicaciones evolutivas. *Ecosistemas* 23(3):36-47.

Nishihara, M., Nakatsuka T., Hosokawa K., Yokoi T., Abe Y., Mishiba K. y Yamamura S. 2006. Dominant inheritance of white-flowered and herbicide-resistant traits in transgenic gentian plants. *Plant Biotechnology*, 23:25-31.

O'Neill, S. y Gould K.S. 2003. Anthocyanins in leaves: light attenuators or antioxidants? *Functional Plant Biology*, 30:865-873.

Paiva, N. 2000. An introduction to the biosynthesis of chemicals used in plant-microbe communication. *Journal of Plant Growth Regulation*, 19:131-143.

Pascual-Teresa, S. y Sanches-Ballesta M.T. 2008. Anthocyanins: from plant to health. *Phytochemistry Reviews*, 7:281-299.

Pérez, M., Jiménez, S., Ebrahimzadeh, A., Verdejo, M.M., Chaves, L.A. y Lao, M.T. 2008. Propuesta de una metodología para la determinación del color del tejido vegetal. *Actas de Horticultura nº 52. Innovación y futuro en la jardinería. I Simposio Iberoamericano- IV Jornadas Ibéricas de Horticultura Ornamental. Pontevedra (España):237-242.*

Quintana, A., Albrechtová, J., Griesbach, R.J., Freyre, R. 2007. Anatomical and biochemical studies of anthocyanidins in flowers of *Anagallis monelli* L. (Primulaceae) hybrids. *Scientia Horticulturae* 112:413-421.

- Rausher, M.D. 2008.** Evolutionary transitions in floral color. *Int. J. Plant Sci.*, 169(1):7–21.
- Rovner, S.L. 2006.** Vintage chemistry. *Chemical and Engineering News*, 84:30-34.
- Salazar G. y Soto M.A. 1996.** El género *Lepanthes* Sw. en México. *Orquídea (Méx.)*, 14:1-231.
- Schmitzer, V., Slatnar, A., Mikulic-Petkovsek, M., Veberic, R., Krska, B. and Stampar, F. 2010.** Comparative study of primary and secondary metabolites in apricot (*Prunus armeniaca* L.) cultivars. *J. Sci. Food Agric.*, 91: 860–866. doi: 10.1002/jsfa.4257
- SEMARNAT. 2010.** Norma Oficial Mexicana. NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección Ambiental- Especies Nativas de México de Flora y Fauna Silvestres- Categorías de Riesgo y Especificaciones para su Inclusión, Exclusión o Cambio- Lista de especies en riesgo. México.
- Shimada, S., Otsuki, H., Sakuta, M. 2007.** Transcriptional control of anthocyanin biosynthetic genes in the Caryophyllales. *Journal of Experimental Botany* 58:957-967.
- Steyn, W.J., Holcroft D M., Wand S.J.E., Cooks N.C. y Jacobs G. 2000.** Dating Rosemarie: How to make her blush. In *Proceedings of the cape Pomological association Symposium*. South Africa. pp. 55-62.
- Sobel, J.M., Streisfeld, M.A. 2013.** Flower color as a model system for studies of plant evo-devo. *Frontiers in Plant Science* 4:e321.
- Storm, R. 2006.** Orchids Plants: Orchids are the favorites of horticulturists. [http://www.content-articles.com/articles/47635/1/Article-By-Robin-Storms-Orchid-](http://www.content-articles.com/articles/47635/1/Article-By-Robin-Storms-Orchid)
- Streisfeld, M.A., Kohn, J.R. 2005.** Contrasting patterns of floral and molecular variation across a cline in *Mimulus aurantiacus*. *Evolution* 59:2548- 2559.
- Shahidi, F. y Naczki M. 2004.** Phenolics in food and nutraceuticals. CRC Press, Londres. pp. 1-16.
- Skerget, M., Kotnik P., Hadolin M., Rizner H.A., Simonic M. y Knez Z. 2005.** Phenols, proanthocyanidins, flavons and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 89:191-198.
- Tanaka, Y., Sasaki, N., Ohmiya, A. 2008.** Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and Carotenoids. *The Plant Journal* 54, 733–749.

Vermerris, W. y Nicholson R. 2008. Phenolic compound biochemistry, Springer Science+Business Media B.V., Berlin.

Vignolini, S., Davey, M.P., Bateman, R.M., Rudall, P.J., Moyroud, E., Tratt, J., Malmgren, S., Steiner, U., Glover, B.J. 2012. The mirror crack'd: both pigment and structure contribute to the glossy blue appearance of the mirror orchid, *Ophrys speculum*. *New Phytologist* 196:1038-1047.

Wang, L., Albert, N. W., Zhang, H., Arathoon, S., Boase, M. R., Ngo, H., Schiwin, K. E., Davies, K. M., Lewis, D.H. 2014. Temporal and spatial regulation of anthocyanin biosynthesis provide diverse flower colour intensities and patterning in *Cymbidium* orchid. *Planta* 240:983-1002.

Wang, H.Z., Feng S.G., Lu J.J., Shi N.N. y Liu J.J. 2009. Phylogenetic study and molecular identification of 31 *Dendrobium* species using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Scientia Horticulturae*, 122:440-447.

Warren, J., Mackenzie, S. 2001. Why are all colour combinations not equally represented as flower-colour polymorphisms? *New Phytologist* 151: 237-241.

Willians, C.A. y Graver R.J. 2004. Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Products Reports*, 21(4):539-73.

Wink, M. 2007. Bioprospecting: The search for bioactive lead structures from nature. In: *Medicinal plant biotechnology. From basic research to industrial application* (Kayser O. y Quax W., Eds), WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. pp. 97-116.

Winkel-Shirley, B. 2001. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant physiology*, 126(2):485-493.

Winkler, A.J., James A.C., Kliewer W.M. y Lider L.A. 1974. *General Viticulture*, Univ. of Calif. Press, Los Angeles, CA.

Wu, C.A., Streisfeld, M.A., Nutter, L.I., Cross, K.A. 2013. The genetic basis of a rare flower color polymorphism in *Mimulus lewisii* provides insight into the repeatability of evolution. *PLoS ONE* 8:e81173.

X-Rite, 2002. *Guía para entender la comunicación del color*. pp. 2-9.

Zhang, W., Franco C., Curtin C. y Conn S. 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.

Zhu, M., Zheng, X., Shu, Q., Li, H., Zhong, P., Zhang, H., Xu, Y., Wang, L., Wang, L. 2012. Relationship between the composition of flavonoids and flower colors variation in tropical water lily (*Nymphaea*) cultivars. *PloS ONE* 7:e34335.

Zufall, R. A. y Rausher M.D. 2003. The genetic basis of a flower-color polymorphism in the common morning glory, *Ipomoea purpurea*. *Journal of Heredity*, 94:442-448.