

**CARACTERIZACION DE LOS PIGMENTOS ANTOCIANOS EN LOS
PRIMORDIOS FOLIARES DE *Miconia biappendiculata* Y *Clusia
multiflora* DE UN BOSQUE ANDINO.**

ANDRES FELIPE BONILLA OSMA

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BIOLOGÍA
Bogotá, D.C.
Octubre 2002**

**CARACTERIZACION DE LOS PIGMENTOS ANTOCIANOS EN LOS
PRIMORDIOS FOLIARES DE *Miconia biappendiculata* Y *Clusia multiflora*
DE UN BOSQUE ANDINO.**

ANDRÉS FELIPE BONILLA OSMA

TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial para optar al título de

BIÓLOGO

JESÚS NORATO RODRÍGUEZ
Director

MAURICIO DIAZGRANADOS CADELO
Co-Director

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BIOLOGÍA
Bogotá, D.C.
Octubre, 2002

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N. 13 de Julio de 1948: “ La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus tesis de grado”.

**CARACTERIZACION DE LOS PIGMENTOS ANTOCIANOS EN LOS
PRIMORDIOS FOLIARES DE *Miconia biappendiculata* Y *Clusia multiflora*
DE UN BOSQUE ANDINO.**

ANDRES FELIPE BONILLA OSMA

DIRECTOR

Prof. JESÚS NORATO RODRIGUEZ

CO-DIRECTOR

Prof. MAURICIO DIAZGRANADOS

JURADO

Prof. CLAUDIA RAMIREZ

JURADO

Prof. GIOVANNY FAGUA

DECANO ACADEMICO

Dra. ANGELA UMAÑA

DIRECTOR DE CARRERA

Dra. LUZ MERCEDES SANTAMARIA

DEDICATORIA

A mis papas Jairo y Hela por el amor y el cariño que me han brindado y a mis hermanos Jairo, Natalia y Mauricio por el apoyo que me han dado.

AGRADECIMIENTOS

A la Pontificia Universidad Javeriana por impulsar la investigación y formación integral de sus estudiantes en la búsqueda del saber.

A la Universidad Nacional de Colombia por darme la oportunidad de ser parte de su grupo de investigación.

Al profesor Jesús Norato, por la dirección en la realización de este trabajo de grado.

Al profesor Mauricio Diazgranados por la codirección y el asesoramiento en la realización de este trabajo.

Y a todos los profesores del Departamento de Biología de la Pontificia Universidad Javeriana y de la Universidad Nacional de Colombia.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES	4
2.1.1 <i>Clusia multiflora</i>	4
2.1.1.1 Ubicación Taxonómica	4
2.1.1.2. Descripción Morfológica	5
2.1.1.3. Distribución Geográfica	6
2.1.1.4. Ecología	6
2.1.1.5. Usos e importancia Económica	8
2.1.1.6. Fitoquímica	9
2.1.2 <i>Miconia biappendiculata</i>	11
2.1.2.1. Ubicación Taxonómica	11
2.1.2.2. Descripción Morfológica	12
2.1.2.3. Variación interespecífica	13
2.1.2.4. Distribución Geográfica	13
2.1.2.5. Ecología	14
2.1.2.6. Usos e importancia Económica	14

2.2 PIGMENTOS ANTOCIANOS	15
2.2.1 Clasificación y Características Bioquímicas	15
2.2.2 Ubicación de las antocianinas en tejidos vegetales	17
2.2.3 Características Físicas y Función	19
2.2.4 Génesis de las Antocianinas	22
2.2.5 Aspectos genéticos	25
2.2.6 Daños ocasionados por la radiación UV-B en las plantas	25
2.3 Radiación Solar	27
3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	29
4. OBJETIVOS	33
5. HIPÓTESIS	34
6. MATERIALES Y MÉTODOS	36
6.1 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	36
6.1.1 Población de estudio y muestra	36
6.1.2 Variables del estudio	36
6.1.3 Descripción del área de estudio	37
6.1.3.1 Generalidades	37
6.1.3.2 Climatología	38
6.1.3.2.1 Precipitación	39
6.1.3.2.2 Temperatura del aire	40
6.1.3.2.3 Radiación Solar	41

6.1.3.3	Geología y Tipo de suelo	43
6.1.3.4	Flora	44
6.2	METODOS	46
6.2.1	Fase I: Toma de muestras en campo	46
6.2.2	Fase II: Preparación de las muestras en el laboratorio	47
6.2.3	Fase III: Determinación del tipo de pigmento	48
6.2.3.1	Cromatografía en capa delgada	49
6.2.3.2	Cromatografía Líquida de alta Presión (HPLC)	51
6.2.4	Fase IV: Determinación del espectro de absorción de los pigmentos	52
6.2.4.1	Fase V: Ubicación Histológica de los pigmentos	53
7.	RESULTADOS	55
7.1	IDENTIFICACIÓN DE LOS PIGMENTOS ANTOCIANOS	55
7.2	ABSORBANCIA UV-B DE LOS PIGMENTOS ANTOCIANOS	59
7.3	UBICACIÓN HISTOLÓGICA DE LOS PIGMENTOS ANTOCIANOS EN PRIMORDIOS FOLIARES	60
7.3.1	Ubicación histológica en <i>Miconia biappendiculata</i>	60
7.3.2	Ubicación histológica en <i>Clusia multiflora</i>	64
8.	DISCUSIÓN	68
8.1	HIPÓTESIS 1 Uno o varios tipos de pigmentos antocianos	68
8.2	HIPÓTESIS 2 Diferencia en el espectro de absorción	70
8.3	HIPÓTESIS 3 Función de protección de acuerdo a la ubicación	72

9. CONCLUSIONES	75
10. RECOMENDACIONES	77
11. REFERENCIAS	78

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización Climática de la Estación Exclusa Tolón	40
Tabla 2. Radiación Solar Media Mensual Multianual para la Región	42
Tabla 3. Índice de corrido (Rf's) de los individuos de <i>C. multiflora</i> y <i>M. biappendiculata</i>	57
Tabla 4. Resultados en Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC)	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura química de los principales flavonoides	15
Figura 2.	<i>Estructura química de las principales antocianinas</i>	16
Figura 3.	<i>Pigmentación morado rojizo en los primordios de Miconia biappendiculata.</i>	29
Figura 4.	<i>Pigmentación rojiza en el envés de Primordios los foliares de Clusia multiflora.</i>	30
Figura 5.	<i>Predio “El Jardín” sitio de estudio.</i>	38
Figura 6.	<i>Cromatografía en capa delgada de los 20 individuos de C. multiflora.</i>	55
Figura 7.	<i>Cromatografía en Capa Delgada de los 20 individuos de M. biappendiculata.</i>	56
Figura 8.	<i>Espectro de absorción de M. biappendiculata.</i>	59
Figura 9.	<i>Espectro de absorción de C. multiflora</i>	60
Figura 10.	<i>Corte transversal de primordio foliar de M. biappendiculata</i>	61
Figura 11.	<i>Corte a nivel de epidermis de M. biappendiculata</i>	62
Figura 12.	<i>Corte transversal de primordio foliar de tejido meristemático de M. biappendiculata.</i>	63
Figura 13.	<i>Cortes transversales de primordio foliar de M. biappendiculata.</i>	63
Figura 14.	<i>M. biappendiculata corte transversal a nivel de la parte apical.</i>	64

Figura 15.	<i>C. multiflora</i> corte transversal de primordio foliar.	65
Figura 16.	<i>C. multiflora</i> corte transversal a nivel de epidermis.	66
Figura 17.	<i>C. multiflora</i> corte transversal de primordio foliar en desarrollo de hojas jóvenes en meristemo.	67

ANEXOS

ANEXO 1 Mapa de la Localización del Área de Estudio

RESUMEN

Algunas especies durante el periodo de reactivación del crecimiento muestran en las yemas de la lámina foliar una pigmentación morada rojiza que corresponde a la presencia de pigmentos antocianos, los cuales pueden estar implicados en la protección de los tejidos contra los rayos UV-B. El objetivo de este estudio fue la caracterización de los pigmentos antocianos acumulados en las yemas de las láminas foliares de individuos de *Miconia biappendiculata* y *Clusia multiflora* colectados en el Bosque Andino de la Peña Vereda de Puente Tierra, Municipio de Saboya, Departamento de Boyacá. Mediante técnicas de cromatografía en capa delgada (TLC), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y espectrofotometría, se logró la extracción de los pigmentos y su espectro de absorción. Se realizaron cortes histológicos para conocer su ubicación dentro de la lámina foliar. En el análisis espectrofotométrico, *Clusia multiflora* tuvo un pico de absorción de 281.3 nm, y *Miconia biappendiculata* de 295 nm. En la cromatografía de capa delgada (TLC) se obtuvo un índice de corrido (Rf) de 0.54 en *Miconia biappendiculata* y de 0.49 en *Clusia multiflora*, valores que corresponden a dos tipos diferentes de pigmentos antocianos: la Pelargonidina y la Cianidina, respectivamente. En la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se registraron las concentraciones entre los 2.48 tiempo de retención (TR) y los 2.50 tiempo de retención (TR). En los cortes histológicos de *Clusia multiflora*, los pigmentos antocianos se acumulan en la epidermis inferior y en *Miconia biappendiculata* éstos se acumulan en la epidermis superior e inferior. Por último, los resultados sugieren que la Pelargonidina y la Cianidina se acumulan en los primordios foliares de estas dos especies como una respuesta a la radiación ultravioleta UV-B, ya que esta causa daño a estructuras internas (cloroplastos).

Palabras clave: pigmentos antocianos, pelargonidina, cianidina, *Miconia biappendiculata*, *Clusia multiflora*, radiación UV-B.

ABSTRACT

Some species during the growth renewal period show in the buds of foliaceous sheet a reddish-violet pigmentation that correspond to the presence of anthocyanins pigments, wich can be implied in the protection of the tissues against the UV-B radiation. The objective of this study was the characterization of the anthocyanins pigments accumulated in *Miconia biappendiculata* and *Clusia multiflora* buds filaceous sheet, wich in the place La peña of Andean forest, Puente de Tierra sediwalk , Saboyá municipality, Boyacá department were colected. By means of Thin Layer chromatografy (TLC), high performance liquid chromatography (HPLC) and spectrophotometry techniques, was achieved the pigments extraction and its absorption spectrum. They were carried out histological cuts to know their locationin side the foliaceous sheet. In the spectrophotometry analysis *Clusia multiflora* had and absortion peak at 281.3 nm wavelength, and *Miconia biappendiculata* at 295 nm wavelength. In the chromatography analysis a 0.54Rf value for *Miconia biappendiculata* and 0.49 Rf value for *Clusia multiflora* was obtained, that correspond to types different from anthocyanins pigments : Pelargonidin and and the Cyanidin, respectively. In high performance liquid chromatography (HPLC) were registered concentrations at 2.48 and 2.50 retention times(RT). In *Clusia multiflora* histological cuts anthocyanins pigments accumulate in the lower epidermis and in *Miconia biappendiculata* these they acumulate in the upper and lower epidermis. Lastly, the results suggest that Pelargonidin and Cyanidin accumulate in the foliaceous buds

of these two species, like an answer to the harmful exhibition of the UV-B radiation.

Key words: Anthocyanins pigments, Pelargonidin, Cyanidin, *Miconia biappendiculata*, *Clusia multiflora*, UV-B radiation.

1. INTRODUCCIÓN

Dentro del reino vegetal se encuentra un gran número de pigmentos cuya función es la de absorber la energía proveniente del sol a diferentes longitudes de onda (Sharma 2001). Entre los pigmentos más importantes se encuentran las clorofilas; éstas brindan el color verde a las hojas y se encargan del soporte de la biósfera, tomando la energía lumínica y convirtiéndola en energía química (Davies 1987). Pigmentos como el fitocromo y el criptocromo son importantes para la regulación de la actividad biológica, en donde participan en los procesos de fotoperiodismo y fotomorfogénesis (Kendrick & Kronenberg 1986). Flavonas glucósidos y antocianinas absorben los rangos ultravioleta protegiendo los tejidos de esta perjudicial radiación (Levy & Skiles 1996).

La síntesis de pigmentos protectores UV en la epidermis de las hojas resulta ser un mecanismo natural contra los rayos UV-B (Mazza *et al.* 2000).

Esta radiación genera daños en cuanto a la inhibición de la fotosíntesis y al crecimiento de las hojas (Lindoo & Caldwell 1978). La radiación puede ser absorbida por bases del DNA y producir en ellas cambios de tipo químico y daños en el material genético (Stapleton & Walbot 1994).

La información sobre el efecto de la luz UV-B en especies vegetales de algunos bosques es muy limitada, sin embargo se sabe que ésta, incide sobre la fisiología y el crecimiento de algunos árboles (Mazza *et al.* 2000).

En el trópico, dado el ángulo de penetración solar y la delgada capa de ozono, las plantas terrestres se encuentran expuestas a altos niveles de radiación UV-B, más que en otras altas latitudes (Heinrich *et al.* 1999). Es de esperarse que las plantas que habitan altas montañas estén expuestas a la radiación UV-B, por lo tanto deben estar más adaptadas para protegerse de los nocivos efectos que posee esta radiación. Por ejemplo, algunas plantas de montañas tropicales presentan una resistencia a la radiación UV-B debido a que tienen una mayor cantidad de flavonoides en la epidermis (Sharma 2001).

En varias salidas realizadas a un bosque andino colombiano se ha encontrado que en individuos pertenecientes a las especies vegetales *Miconia biappendiculata* y *Clusia multiflora*, durante la época de reactivación del crecimiento, se observan pigmentos no clorofílicos “violeta rojizos”, que se acumulan especialmente en los cogollos.

En estas especies, las yemas apical y laterales se colorean de un morado intenso, pero al interior del cogollo, a medida que las láminas foliares se extienden, la pigmentación se zonifica de manera que la base foliar conserva el pigmento mientras que la zona media y apical se enverdecen. En la especie *Miconia biappendiculata*, a medida que la hoja va creciendo, puede apreciarse una pigmentación morada en sus láminas foliares en crecimiento, la cual se ubica hacia la base. En *Clusia multiflora*, en el envés de las láminas foliares de las hojas apicales recientemente extendidas, se observa una pigmentación morada.

En este estudio se pretende describir la ubicación de estos pigmentos en estas especies, y verificar su función como una protección de las células meristemáticas, responsables del crecimiento de la hoja y de la actividad organogénica de los meristemas, dando a conocer una posible estrategia de adaptación en alta montaña contra los rayos ultravioleta desarrollada por una pigmentación temporal zonificada.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES

2.1.1. *Clusia multiflora* H.B.K

2.1.1.1 Ubicación Taxonómica

Reino Plantae, Phylum Magnoliopsida, Orden Theales, Familia CLUSIACEAE (GUTTIFERAE), Género *Clusia*, Especie *Clusia multiflora*.

Autores: Humboldt, Bonplandt & Kunth, Nov, Gen.et Sp.V.200. (Correa & Bernal 1993)

Sinónimos: *Clusia sessilis* (Uribe 1960)

Nombre vulgares: Sombrero copey, Gaque, Cucharo, Incienso (Bolivia); Cape, Capé Chugualo, Chagualón, Gaque, Moque, Rapancho, Tampaco (Colombia); Cape (Panamá); Incienso (Perú); Copey, Cucharo (Venezuela); (Correa & Bernal 1993).

2.1.1.2. Descripción Morfológica

Árbol terrestre de hasta 10 m de altura, con tronco anillado con tendencia monopódica, corteza parda, ramas quebradizas, con látex color crema o amarillo que brota por las puntas. Hojas pecioladas, recortadas, ovales, opuestas, decusadas, pecíolos 0.5-1.0 cm, haz caniculado, envés convexo, lámina foliar de 12 a 15 cm de largo, 10-12 cm de ancho, de textura coriácea, superficie lisa, haz de color verde oscuro, ligeramente dorsiventrales (envés marcadamente más claro que el haz, de color verde oscuro), ápice obtuso, base obtusa ligeramente atenuada, margen ligeramente revoluto, nerviación secundaria inconspicua; raíces adventicias (cuelgan de las ramas bajas) y algunas fúrcreas (zancos), pudiendo convertirse en nuevos pies, formando parches (como un árbol con varios troncos unidos por las ramas). Es una especie dioica (árbol macho y árbol hembra aparte); inflorescencia terminal cimosa, flores masculinas 1-3 (4-5) sépalos, verde blanquecinos, pétalos 6 (8) imbricados anchamente ovados, 1.3 cm de ancho, 1.1 cm de largo, color de pétalos blanco rosado, andróforo globoso de 0.8 cm de largo; estambres numerosos con 15-20 filamentos carnosos; flores femeninas con ovario con 8-10 lóculos, óvulos numerosos, fruto cápsula verde opaco, semilla con arilo rojizo vermiforme (Maguire 1978, Hernández 1992, DAMA 2000).

En nuestra flora subandina se encuentran cien especies frecuentes del Género *Clusia* que se reconocen por sus hojas de corto pecíolo, opuestas, glabras, con el raquis robusto y por la resina amarilla que mana de las incisiones hechas en el corte (Pérez 1996).

2.1.1.3. Distribución geográfica

Se encuentra entre los 1300 y los 3400 m.s.n.m.. Dentro de las CLUSIACEAE es la especie con mayor distribución en América (Torres 1983), y en Colombia se ha reportado en varias cordilleras, aunque mayormente en los Andes centrales antioqueños de Colombia (Uribe 1940, Torres 1983). Se distribuye en los departamentos de Antioquia, Boyacá, Cundinamarca, Santander y Putumayo entre los 200 y 3470 m de altitud (García 1975, Maguire 1978, Torres 1983).

2.1.1.4. Ecología

En la selva andina tiene una posición ambiental típica entre los 2800 y los 3300 m de altitud. Requiere de suelos muy drenados, humedad alta y permanente. Frecuente rupestre, crece sobre puntos de exurgencia freática o abrigos monoclímicos húmedos. Soporta alta radiación si cuenta con

humedad atmosférica. Es favorecida por la facilitación del matorral y rastrojo bajo. Subdominante del encenillal (*Weinmania* spp.) y sus transiciones a otros tipos de bosque. Es frecuente ecotonal. Su posición en la sucesión es la de un inductor preclimácico tardiseral. Alcanza su óptimo en el preclimax del encenillal, manteniéndose como subordinada frecuente en el encenillal maduro (DAMA 2000).

Conforma entonces parte del encenillal en bosques altos de ladera o bosques altos perhúmedos en donde abunda *Chusquea scandens*. Gracias a su agresiva propagación vegetativa, *C. multiflora* forma característicos manchones casi puros y muy densos, los cuales comienzan a formarse sobre los matorrales y se conservan hasta que el rodal alcanza el estadio de bosque mediano (DAMA 2000).

Puesto que se encuentran bosques medianos de *C. multiflora*, pero no bosques altos, puede pensarse que su abundancia se ve gradualmente reducido después de aquel estadio. En los bosques altos más jóvenes predomina *W. tomentosa* y dispersos se hallan individuos seniles de *Clusia multiflora*, los cuales pueden considerarse árboles del pasado sucesional. Hacia el ecotono de estos bosques altos es muy frecuente, lo cual puede señalar el desplazamiento centrífugo de sus poblaciones con el avance de la sucesión a la etapa fisonómica de bosque alto. Los individuos adultos

clonan mediante raíces adventicias que descienden de las ramas hasta el suelo convirtiéndose en nuevos troncos. Esta reproducción vegetativa es más activa en atmósferas húmedas donde se forman grandes parches clonales a manera de densas arcadas (DAMA 2000).

Produce un denso sombreado, lo que la hace una importante dinamizadora de los rastrojos bajos y altos, así como una valiosa piroclástica en matorrales pirófilos. Es también importante como ornitócora, ejerciendo gran atracción sobre los dispersores (DAMA 2000).

2.1.1.5. Usos e Importancia Económica

Tienen una función en la prevención de incendios forestales, en franjas y núcleos de piroclásticas. Es Inductor del encenillal sobre subclímax de subpáramo secundario (DAMA 2000). Sirve para la estabilización de taludes y escarpes, así como para la protección de nacaderos en laderas (DAMA 2000).

El látex se utiliza para tintura de lanas, como purgante y como incienso. Su madera se utiliza en ebanistería. Tiene valor ornamental. Su propagación por estacas y por semilla, permite su reproducción en viveros (DAMA 2000). El nombre de “sombrero” se debe al empleo de las hojas de cape para tejer

con espinas de otras plantas, grandes sombreros empleados en el Chocó por los mazamorreros o lavadores de oro y platino. La corteza de cape es astringente y su resina, extraída tanto del tronco como de los frutos, se usa para curar las heridas y como purgante. En Villavicencio se emplean las raíces para barbasco (Pérez 1996). La resina extraída de este árbol fue muy empleada por las tribus indígenas americanas a la manera de incienso para perfumar sus templos (Hernández 1992). Las flores de “gaque” se emplean en infusión a la dosis de 20 g en 300 ml de agua para combatir los resfriados (Hernández 1992).

2.1.1.6. Fitoquímica

A partir del extracto de petróleo de los frutos secos de *Clusia multiflora* H.B.K., Arias (1985) aisló varios compuestos por cromatografía de columna.

El primero de ellos lo estudio por espectroscopías de Resonancia Magnética Nuclear (RMNH), Infrarrojo (IR), Espectrofotometría de Masas (EM) y lo comparó cromatográficamente con patrones; los datos sugieren la presencia de Friedelina. Un segundo compuesto separado por este autor, correspondió a una benzofenona poliprenilada a través de espectroscopias de RMNH, IR, UV y EM. Arias realizó pruebas químicas para determinar su estructura, no resuelta en su totalidad. La comparación de los datos del compuesto con las

benzofenonas registradas en la literatura, indicó una benzofenona no descrita.

Además, Arias (1985) aisló un triterpeno tetracíclico cuya identificación corresponde a uno de los epímeros en C₂₀: eufol o tirocalol, y comprobó la existencia de un compuesto cetónico alifático.

Arias (1985), señaló que también existen en los frutos otras benzofenonas no identificadas que deberían ser objeto de posteriores estudios. Las muestras recolectadas en diferentes épocas del año con intervalos de cuatro meses no mostraron diferencias significativas en cuanto al contenido de sustancias aromáticas; la cantidad extraída en éter de petróleo fue diferente para las distintas muestras, lo que puede dar margen para suponer que según la época del año la composición química puede variar en cantidad.

Hernández (1992), indicó que la resina de *Clusia multiflora* contiene goma, una sustancia colorante amarillenta y una esencia cuyo olor es muy parecido al incienso.

***Miconia biappendiculata* (Naud.) L. Uribe**

2.1.2.1 Ubicación Taxonómica

Reino Plantae, Phylum Magnoliophyta, Clase Magnoliopsida, Orden Myrtales, Familia MELASTOMATACEAE, Género *Miconia*, Especie *Miconia biappendiculata*

Autores: (Naud) L. Uribe 1960.

Sinónimos: *Miconia granulosa* (Bonpl.) Naud.var.*biappendiculata* Naud., Ann. Sci. Nat.III. 16:218.1851.

Melastoma granulosa Bonpl.Melast.25.1807.

Miconia granulosa (Bonpl.) Naud., Melast. 25 .1807.

Melastoma revoluta Dietr. ex Steud., Nomecl.ed.2, 2:117.1841.

Nombres vulgares: Las 700 especies de este género se ven muy representadas en nuestros pisos térmicos más elevados. En Colombia y en países vecinos se conoce como árnica, azucarero, camasey, camasey amarillo, camasey esquinado, camasey morado, canilla de venado, jayo macho, mortño, miguito, punta de sarvia, tintillo y Tuno; en Panamá, oreja de mula, palo negro, canillo de cerro, canillo, gorgojo, gorgojillo; en Venezuela, canillita, canilla de venado, oreja de tigre, morita; y en Ecuador colca (Pérez 1996).

2.1.2.2 Descripción Morfológica

Árbol de 4 a 5 m de altura; tallos de 25-35 cm de DAP, con pubescencia anaranjada púbercula (gránulos sésiles semiestrellados de color ocre a mostaza), presente principalmente en las partes más jóvenes de la planta (ramas delgadas de sección angular y ramillas de la inflorescencia), nudos densamente pubescentes con distancia internodal máxima de 42 mm; hojas opuestas (2 en cada nudo), péndulas, elípticas abovadas, 142-21 x 63-9 mm, subcoriáceas a cartáceas, base redondeada, agudas a ligeramente acuminadas en el ápice, pecíolo extremadamente flexible de 45 mm de longitud máxima, margen foliar con dientes orientados hacia el ápice, cortos y casi adpresos al borde, haz relativamente glabro, 3 nervaduras principales prominentes en el envés que es totalmente pubescente con granos estrellados de radios cortos, semiagudos y anchos en la base, otro par de nervaduras muy cercanas al margen foliar y relativamente completas, areolas de las venulas foliares de 10,2 mm; inflorescencias terminales, cortas totalmente pubescentes y apretadas cuando inmaduras, con brácteas pubescentes en el envés y bracteolas (pubescentes), angostas y erectas que escasamente cubren un lado del botón, ramillas secundarias teretes; flores sésiles, 5-meras, pétalos 0,35 x 0,42 mm, con limbo calicinal cerrado en el botón, hipantio tubular urceolado, lóbulos de cáliz triangulares de 0,3 mm (botón), reunidas en glomérulos terminales, androceo y gineceo glabros,

anteras basifijas, oblongas de 0,51 mm con dos lóculos y dos apéndices, uno a cada lado de la parte anterior del conectivo, ovario ínfero, estigma truncado de 0,5 mm de diámetro, semillas obovoides (Uribe 1960, Hernández 1993).

2.1.2.3. Variación Inter-específica

Las principales diferencias se presentan en el tamaño de las hojas, en la densidad de la pubescencia en el envés, en el ancho de la lámina foliar, en el color del haz, y en la cantidad de flores de cada inflorescencia (Hernández 1993).

2.1.2.4. Distribución Geográfica

En Colombia en Zonas de los municipios de Bogotá D.C. (Cundinamarca), Ibagué (Tolima) y Santa Marta (Magdalena). Uribe en 1960 la registró para los pisos fríos y de páramo en Cundinamarca, en Bogotá D.C., Guasca, Sibaté, Carupa, Subachoque, Zipaquirá, Suba, Usaquén, Fúquene y el Salto de Tequendama; en Boyacá en los municipios de Paipa, Tuta, Arcabuco, Santa Rosa, Duitama y en la laguna de Tota; en Norte de Santander en

alrededores de Pamplona y en Santander en el páramo del Almorzadero (Uribe 1960).

2.1.2.5. Ecología

Esta especie es típica en áreas de vegetación cerrada de bosques andinos en donde suele encontrarse rodeada de matorral alto semiseco y tupido con suelos de poca pendiente y bastante drenados. Es común encontrarla en matorrales bajos y abiertos en sitios continuamente nublados (Hernández 1993).

2.1.2.6. Usos e importancia económica

Sus frutos son comestibles y algunos indígenas colombianos suelen obtener un colorante amarillo de sus hojas (Uribe 1940). Su madera es utilizable para leña y para construcciones pasajeras (Pérez 1996).

2.2. PIGMENTOS ANTOCIANOS

2.2.1. Clasificación y Características Bioquímicas

Los pigmentos antocianos, junto con los flavonoides, flavonas, catequinas, flavanes, dehidroflavonoles, leucoantocianidinas o proantocianidinas, isoflavones, neoflavones, calconas, dihidrocalconas y auronas, conforman los FLAVONOIDES (Goodwin & Mercer 1988) (Figura 1).

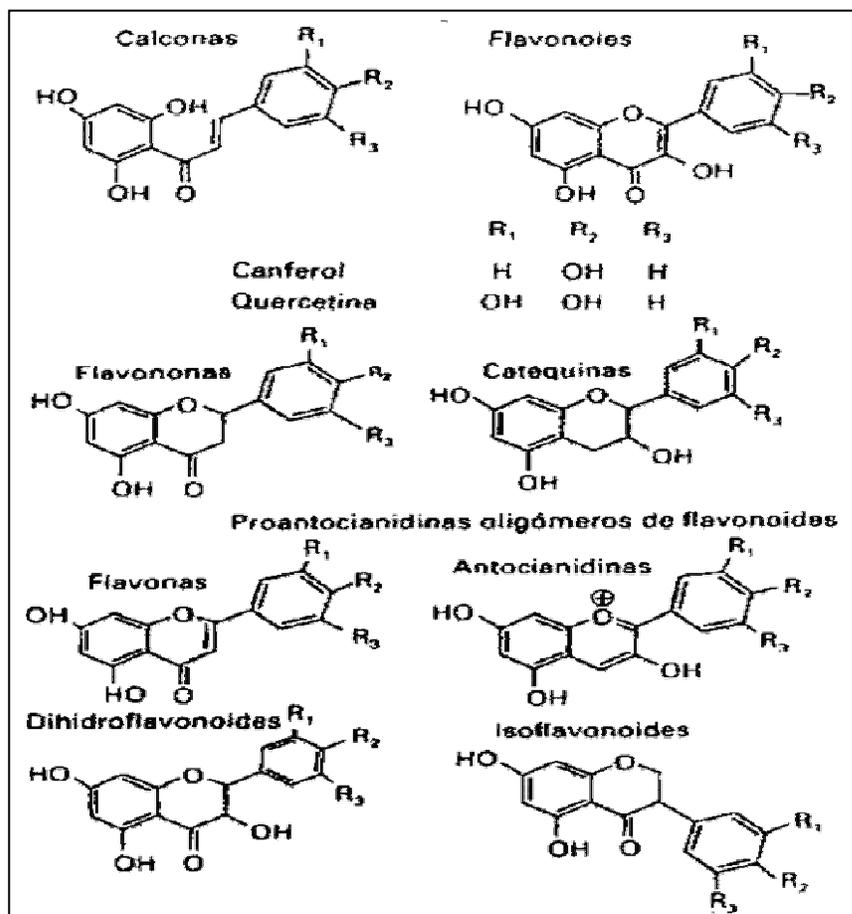


Figura 1. Estructura química de los principales flavonoides.

Las antocianinas comúnmente se conocen como Antocianidinas, y aunque se conocen más de 22 moléculas diferentes, las más comunes son la pelargonidina, delphinidina y cianidina (Salisbury & Ross 1994) (Figura 2).

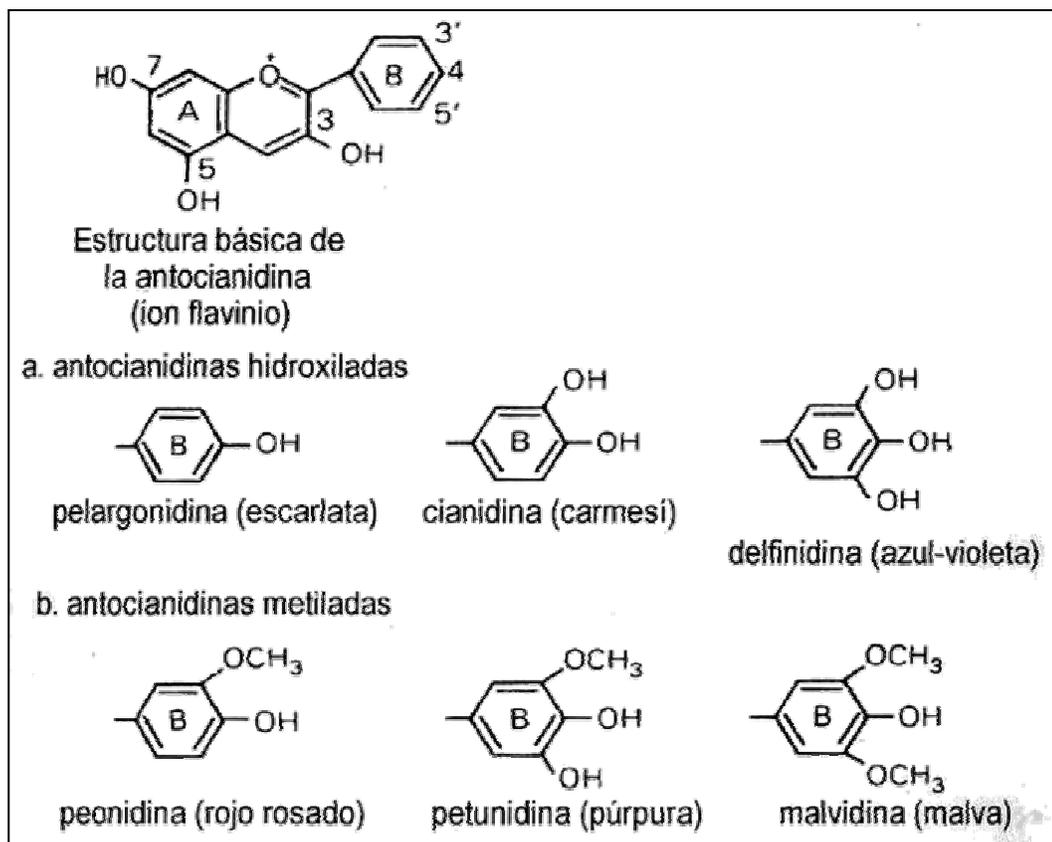


Figura 2. Estructura química de las principales antocianinas

Los pigmentos antocianos se encuentran dentro del grupo de los flavonoides y, al igual que éstos, son moléculas orgánicas conformadas por 15 carbonos distribuidos en dos anillos bencénicos laterales (A y B) y un anillo central oxigenado. Son sintetizados bajo regulación lumínica (Kendrick & Kronenberg 1986) en la vía del ácido shiquímico y por

condensación de acetil CoA (Gross 1987, Goodwin & Mercer 1988).

Generalmente, los flavonoides presentan sustituciones hidróxilo o metilo, y a través de éstos se ligan azúcares, especialmente a glucosa o galactosa, formando glicósidos, hecho que les confiere mayor solubilidad en agua. Sus agliconas respectivas tienen como estructura el anillo flavano (Goodwin & Mercer 1988).

2.2.2. Ubicación de las Antocianinas en Tejidos Vegetales

Las antocianinas son pigmentos confinados en las vacuolas de células epidérmicas de hojas, flores, frutos y tallos, que desarrollan coloración azul, morado y/o rojizo de diferentes tonalidades (Salisbury & Ross 1994, Markham *et al.* 2000).

La acumulación de antocianinas en la epidermis superior o el mesófilo de las hojas, interfiere con las reacciones lumínicas de la fotosíntesis. Debido a su habilidad de absorber luz azul y reflejar luz roja, las antocianinas pueden, teóricamente, competir contra clorofilas y carotenoides. Existen evidencias en donde los pigmentos antocianos protegen a las células de los daños ocasionados por la luz UV-B, en donde el material genético se ve

protegido por la acumulación de estos pigmentos (Levy & Skiles 1996, Lo & Nicholson 1998, Scott 1999).

En 1996 Levy and Skiles encontraron que dos especies de plantas que habían sido expuestas a radiación UV-B desarrollaron en la epidermis de sus hojas una protección dada por pigmentos flavonoides como una respuesta al estrés ocasionado por la radiación UV-B.

Las hojas de varias especies frecuentemente desarrollan una coloración rojiza durante su estado de crecimiento. La mayoría de las plantas producen antocianinas, usualmente glucósidos-cianidinas. Algunas especies producen antocianinas durante sus estados de desarrollo temprano, durante la senescencia o en ambos. En la epidermis inferior de hojas maduras y en el mesófilo de empalizada, se acumulan antocianinas como protección de la UV-B (Lee 1997, Hagen1966).

En las plantas las antocianinas aparecen transitoriamente dentro de estados específicos del desarrollo, inducidos por un gran número de factores ambientales como la luz UV-B, bajas temperaturas y estrés por agua. La producción y localización de antocianinas en raíces, tallos y especialmente hojas ofrece una resistencia al estrés ambiental (Lee 1997).

En cuanto a resultados histológicos se ha encontrado que en los pétalos de las plantas existe una gran intensidad de color debido a que las antocianinas tienden a acumularse alrededor de la epidermis (Markham *et al.* 2000).

También es conocido que las manzanas tienden a acumular pigmentos antocianos en su epidermis como una protección a la radiación UV-B (Kootstra 1994).

En muchos de los casos los pigmentos antocianos se encuentran dentro de vacuolas de células epidérmicas. Sin embargo, en ciertas especies de plantas las antocianinas se localizan discretamente en ciertas regiones de las vacuolas (Markham *et al.* 2000).

2.2.3. Características Físicas y Función

Desde su descubrimiento, la presencia de antocianinas se ha asociado con las etapas de reproducción y propagación de las plantas, ya que gracias a la gama de colores que ellas generan sirven para atraer insectos, aves y mamíferos polinizadores, al igual que algunos comedores de frutos y dispersores de semillas (Salisbury & Ross 1994, Taiz & Zeiger 1991, Middleton & Teramura 1993).

En la naturaleza existen flavonoides que poseen la característica de proteger a las plantas de radiación UV-A y UV-B. Estos brindan una mayor protección al funcionar como filtros de absorción (Stapleton & Walbot 1994, Ballare *et al.* 1996, Cockell & Knowland 1999).

Las antocianidinas son los únicos flavonoides que junto con las clorofilas y los carotenoides colaboran en la coloración de las hojas. Así, en el reino vegetal y con relación al follaje, se observan varios tipos de coloración, que en las diferentes especies se expresan diferencialmente a través del tiempo: coloración momentánea, coloración permanente y coloración otoñal (Goodwin 1965). En la coloración momentánea las antocianinas se acumulan en hojas en estado de desarrollo temprano (hojas jóvenes) y conforme las hojas van madurando la pigmentación va desapareciendo (Goodwin 1965).

La coloración permanente se presenta en aquellas plantas que poseen un gran valor ornamental como es el caso de las begonias y las rosas (Goodwin 1965). En cuanto a la coloración otoñal, es bien conocido que participan tanto los pigmentos antocianos como los carotenoides; dicha coloración depende tanto del desarrollo de las plantas como de los factores climáticos. En todos los casos el pigmento involucrado es la cianidina-3-glicósido, aunque en pocas especies se ha registrado la acumulación de delphinidina (Goodwin 1965).

Las antocianidinas también constituyen los pigmentos más importantes en la coloración de los frutos. Las variaciones en el color corresponden a la presencia de uno o más pigmentos antocianos más que a la presencia de diferentes tipos de moléculas (Siegelman & Hendricks 1957).

Las antocianinas están entre el rango del rojo y púrpura, y brindan los colores rojos y azules de algunas plantas. Existe un fenómeno dado por las antocianinas conocido como “copigmentación” responsable de los colores azules de algunas flores (Brouillard 1983).

En cuanto a la absorción de UV, las antocianinas son menos eficientes en el rango de los 520 nm, pero su zona de absorción se extiende dentro de la zona UV-A (390-320) igual que en las hojas. Estas antocianinas pueden servir de protección, además de brindar diferentes colores a las corolas de las flores con el fin de atraer agentes polinizadores. También contribuyen a la protección del polen, evitando que la radiación UV-B penetre dentro de las anteras, reduciendo su incidencia en un 98% (Cockell & Knowland 1999).

A nivel de las comunidades vegetales, las antocianinas tienen una participación singular en la coloración no definitiva del follaje, desarrollada en la vegetación de los bosques de las Zonas Templadas y en los bosques de altura en la Zona Ecuatorial (Salisbury & Ross 1994).

2.2.4. Génesis de las Antocianinas.

Los pigmentos antocianos acumulados en las plantas aparecen transitoriamente dentro de un estado de desarrollo específico y pueden ser inducidos por una gran variedad de factores ambientales como las bajas temperaturas, el estrés por agua y la radiación UV-B. La producción y localización de antocianinas en los tejidos de las hojas es una respuesta de resistencia al estrés ambiental (Taiz & Zeiger 1991, Salisbury & Ross 1994, Scott 1999, Heinrich *et al.* 1999).

Numerosos factores ambientales tales como las condiciones de agua, temperatura, viento, infecciones y el más importantes de todos: la luz, se expresan en la activación de diferentes enzimas involucradas en la biosíntesis de antocianinas (Gross 1987). Otros factores, como la polución atmosférica, el etileno (Davies 1987) y la aplicación de herbicidas (Ahston & Crafts 1981) también ocasionan la acumulación de antocianinas en el follaje de las plantas.

En investigaciones de parámetros morfológicos de las plantas se ha observado que éstas se ven afectadas por la radiación UV-B, pero un estudio realizado con cinco especies de plantas permitió comprobar que al

exponerlas a la luz ultravioleta, éstas incrementan en sus hojas compuestos de absorción de luz UV-B (Searles *et al.* 1995).

Estudios realizados con la pigmentación de pétalos de la especie *Impatiens balsamina* han dado evidencia de la existencia de diferentes patrones moleculares presentes en los tejidos donde los pigmentos tienen una función específica. El desarrollo de esta pigmentación resulta ser paralela al desarrollo morfológico de la estructura. Previos reportes han mostrado que la modificación secuencial de flavonoides está implicada con la maduración de los órganos (Mirecki & Teramura 1984). El cambio de color en las flores es un fenómeno común en el cual se brinda atención en el desarrollo de las flores, pero estas modificaciones de color se ofrecen como una consecuencia de la aparición de diferentes pigmentos (Hagen 1966).

Las antocianinas son sensibles al cambio de pH y al cambio de concentraciones de nutrientes en el suelo (Julien 2000).

Algunos reportes han mostrado que algunas hormonas como las auxinas y las citoquininas inducen la formación de antocianinas en algunas células. El ABA por ejemplo no permite la producción de antocianinas (Scott 1999).

Las antocianinas como la pelargonidina, delphinidina y cianidina difieren en el número de hidroxilos que poseen en el anillo B y presentan carácter

iónico, por lo que su coloración puede variar con el pH. Así, en solución ácida el color varía del naranja al rojo (Pelargonidina), al morado (Cianidina) o al púrpura (Delfinidina); si se eleva el pH sobre 7 la solución se decolora y se forman bases anhidras de color azul. En condiciones de pH básico, se presenta una ionización irreversible de los grupos fenólicos e hidroxilos (Harborne 1967, Salisbury & Ross 1994).

Con respecto a efectos nutricionales es obvio que la síntesis de antocianinas requiere de la presencia de azúcares libres. Se ha encontrado que el azúcar tiene un efecto en cuanto a la acumulación de antocianinas (Gross 1987).

En algunas investigaciones, se ha encontrado que el Nitrógeno está asociado con la disminución en el contenido de antocianinas en algunas frutas. El nitrógeno que es sintetizado en sustancias como aminoácidos y proteínas, interfiere con la biosíntesis de azúcares y antocianinas (Gross 1987). De la misma forma, los pigmentos antocianos suelen acumularse en plantas que presentan deficiencias nutricionales de nitrógeno, fósforo o azufre (Taiz & Zeiger 1991).

2.2.5. Aspectos Genéticos

Generalmente las antocianinas no sólo juegan un papel muy importante en cuanto al color sino que también participan en los efectos de tolerancia por factores bióticos o abióticos y en la regulación de genes en el metabolismo de las plantas. Con respecto a la regulación de genes en el cromosoma 4 del arroz, existen genes que regulan la síntesis de antocianinas, como son el *Pi*, *pl-2*, *P_{rp}*, *P*, *Ps-1*, *Ps-2* y *Pin-1*. La irradiación UV-B activa el gen *Pi^w* resultando la inducción de antocianinas (Maekawa 2002).

2.2.6. Daños ocasionados por la radiación UV-B en las plantas

Es conocido que la radiación ultravioleta altera el metabolismo de los organismos vivos, causando la destrucción del DNA, inactiva las enzimas, ocasiona disrupción en las membranas y genera radicales libres. Los daños ocasionados por los radicales libres son irreversibles y causan enormes daños a los organismos. La luz UV-B causa reducción en la fotosíntesis, provoca daños tanto a los organismos como al material genético presente en el núcleo (Sharma 2001, Krause *et al* 1999). También causa alteración en procesos de división celular, y en patrones de crecimiento y desarrollo, como puede ser la dormancia y la floración (Sharma 2001).

Estudios realizados en tomate han mostrado que la luz UV-B inhibe la expansión de la hoja y la elongación del tallo, generando consecuencias adaptativas como la disminución del grado sensitivo de las células (Sharma 2001).

Algunas investigaciones han mostrado que la radiación UV-B inhibe la fotosíntesis y el crecimiento de las hojas. Un mecanismo que opera en el crecimiento de las hojas es el sistema fitocromo. El contenido de antocianinas puede ser controlado por el sistema fitocromo y la radiación UV. El fitocromo puede estimular la formación de antocianinas (Mazza *et al* 2000); pero se ha demostrado que este sistema, al tener una baja radiación actúa independientemente sobre la expansión de las hojas y la formación de antocianinas (Lindoo & Caldwell 1978). La radiación de luz ultravioleta causa cambios en la morfología de las plantas (Searles *et al.* 1995), induce inhibición de la expansión de la hoja y por consiguiente promueve la producción de pigmentos antocianos. Las hojas que son expuestas a la luz ultravioleta UV -B (280–320 nm) reducen su crecimiento (Lindoo & Caldwell 1978).

2.3. Radiación Solar.

El estudio de la radiación solar en el área de interés constituye un elemento de la mayor importancia, dada la naturaleza de los objetivos del trabajo; por esta razón, se presenta a continuación una revisión teórica de los principales conceptos involucrados en el tema de la iluminación natural.

La luz solar se define generalmente, en términos de la radiación electromagnética en el rango espectral del ojo humano. Dado que los términos: flujo radiante, radiancia e irradiancia comprenden radiación fuera de este rango, normalmente no se emplean en la descripción de la luz solar; en su lugar, se utilizan los términos análogos: Flujo luminoso, luminancia e iluminancia. Estos términos están definidos sobre la base de la respuesta espectral del ojo humano, con respecto a la función de eficiencia luminosa fotópica (INEA 1993)

La Radiación Solar Ultravioleta, es la fracción más energética del espectro solar que alcanza la superficie de la tierra, específicamente el UV-B. el UV-C, rayos X y otros componentes del espectro solar con más energía se ven absorbidos en su mayor parte por la capa de ozono, el oxígeno y otros gases en las capas altas de la atmósfera y por la magnetosfera. La radiación solar UV se divide en:

UV-A: 400 - 320 nm, UV-B: 320-280 nm y UV-C: 280 - 150 nm.

El INDICE UV o “UV INDEX”, se desarrolló en Canadá en 1992, la Agencia de Protección Ambiental de E.U.A. (E.P.A) inició los reportes UV en 1994. Lo adoptó la Organización de las Naciones Unidas como convención internacional para reportar la radiación solar ultravioleta a la población del mundo. El índice indica la intensidad del UV-B en una escala del 0 al 15W/m², con la siguiente clasificación:

Indice-UV (W/m²): Bajo 0-4, Medio 4-7, Alto 7-9, Extremo 9-15

Se reporta en unidades standard de energía como W/m², o MED/hr por unidad de área, donde MED es la Dosis Mínima de Eritema, dosis que se requiere para provocar un Eritema (enrojecimiento de la piel) en individuos con piel blanca - sensible (piel tipo II). La piel morena ofrece mayor protección ante los daños por el UV, por tener mayor contenido de melanina.

La radiación solar UV es invisible, no la perciben los ojos al estar más allá de los 400 nm (color violeta). Alcanza los niveles más altos antes y después del medio día. Las nubes, la lluvia y la contaminación atmosférica, como partículas y ozono, absorben el UV y disminuyen su intensidad. El UV también participa en la formación de reacciones fotoquímicas que llevan a la formación del ozono. Por la falta de UV, el ozono troposférico permanece bajo en días nublados (INEA 1993).

3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Se ha observado que varios individuos de las especies *Miconia biappendiculata* y *Clusia multiflora*, del bosque Andino de la Peña Punte de Tierra (Boyacá) presentan en sus brotes o renuevos una notoria pigmentación de color morado en los órganos jóvenes próximos a los tejidos meristemáticos o yemas caulinares (Figuras 3 y 4).



Figura 3. Pigmentación morado rojizo en los primordios de *Miconia biappendiculata*



Figura 4. Pigmentación rojiza en el envés de Primordios los foliares de *Clusia multiflora*.

Dicha pigmentación se presenta durante los períodos de crecimiento de las láminas foliares y conforme las hojas van creciendo la pigmentación se va zonificando y desapareciendo en las hojas adultas. Teniendo en cuenta las características ambientales del lugar, es posible que estos pigmentos brinden una función de protección al absorber y filtrar la luz ultravioleta y no permitir que ésta incida sobre el tejido meristemático, que es en donde se realiza la división celular.

La presente investigación busca determinar cuales son los pigmentos de los primordios foliares de *Miconia biappendiculata* y *Clusia multiflora*, y verificar

si corresponden a pigmentos capaces de absorber UV-B, que puedan estar implicados en la protección contra esta radiación.

El incremento en la radiación UV-B, causado por la disminución de la capa de ozono, altera la estabilidad de los ecosistemas, ocasionando daños al metabolismo de los organismos mediante la destrucción del DNA, la inactivación de las enzimas y la disrupción de membranas (Sharma 2001).

Sin embargo, en la naturaleza existen plantas que desarrollan un mecanismo de protección contra la luz UV-B; este mecanismo les permite adaptarse a los ambientes que poseen alta incidencia de luz UV-B (Sharma 2001). Una de las vías por las cuales las plantas pueden resistir a los daños ocasionados por la luz UV-B es a través de la acumulación de pigmentos como las antocianinas que absorben la luz UV-B.

Empleando técnicas de cromatografía y espectrofotometría se puede establecer qué pigmentos están comprometidos en las dos especies estudiadas y si éstos absorben los rangos de luz ultravioleta UV-B. De esta forma, el estudio aporta al conocimiento no sólo de las especies como tal, sino de las posibles adaptaciones que pueden tener para soportar la radiación UV-B.

En un futuro es probable que el hombre logre sintetizar estos pigmentos, o aislar sus genes, siendo prometedor a su implementación en el mejoramiento genético de plantas útiles que no soportan altas radiaciones UV-B. Pero para llegar a este punto tendremos que conocer previamente muchos aspectos bioquímicos, ecológicos y genéticos, de los pigmentos antocianos, en los ecosistemas de alta montaña.

4. OBJETIVOS

Objetivo General

- Caracterizar los pigmentos antocianos presentes en los primordios foliares de *Miconia biappendiculata* y *Clusia multiflora*.

Objetivos Específicos

- Establecer cuáles son los tipos de pigmentos antocianos que se encuentran dentro de los primordios foliares de *Miconia biappendiculata* y *Clusia multiflora*.
- Determinar la absorbancia UV-B de los pigmentos antocianos presentes en primordios foliares de estas dos especies, para verificar si cumplen una función de protección contra la radiación UV-B.
- Determinar la ubicación histológica de los pigmentos antocianos en las dos especies, característica que se relaciona con la posible función de éstos en los tejidos.

5. HIPÓTESIS

Hipótesis 1

- Cada una de las especies tiene en sus primordios foliares diversos tipos de pigmentos antocianos, debido a que con frecuencia se presenta copigmentación en la naturaleza.

Predicción

- Se espera encontrar varios tipos de pigmentos antocianos en cada una de las especies, principalmente cianidina y pelargonidina, porque son los tipos más abundantes en la naturaleza, participando en la coloración de flores y frutos.

Hipótesis 2

- El espectro de absorción de los pigmentos antocianos de los primordios foliares de *Clusia multiflora* y *Miconia biappendiculata*, es diferente debido a la coloración, rojiza y morada, respectivamente.

Predicción

- Se espera que los picos de absorción registrados por medio de la espectrofotometría sean diferentes entre las dos especies, debido a los diferentes tipos de pigmentos antocianos de cada especie.

Hipótesis 3

- La ubicación de los pigmentos antocianos en los primordios foliares de *Miconia biappendiculata* y *Clusia multiflora* puede tener una función de protección ante la radiación UV-B, debido a que se encuentran en tejidos indiferenciados, que por lo general son protegidos contra este tipo de radiación.

Predicción

- Se espera que los pigmentos antocianos estudiados estén ubicados en la epidermis superior de las dos especies, y su rango de absorción corresponda a la radiación UV-B, de tal forma que puedan ser potencialmente considerados como pigmentos de protección.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

6.1.1 Población de estudio y muestra

La población de estudio estuvo conformada por 30 individuos pertenecientes a la especie *Miconia biappendiculata* y 30 individuos de la especie *Clusia multiflora*. Teniendo en cuenta la pigmentación rojiza de los primordios foliares, se tomó una muestra al azar de los primordios foliares por cada individuo, para un total de 30 muestras por especie.

6.1.2 Variables del estudio

En este estudio se tuvieron en cuenta las siguientes variables:

- La absorbancia (en nm) que pueden tener los pigmentos antocianos dentro de los primordios foliares, medida con la espectrofotometría.
- La distancia (en cm) desde el punto de aplicación en la Cromatografía en Capa Delgada (TLC) hasta el centro de la mancha (DM). Esta variable sirve para calcular el Índice de Corrido (Rf), que permitirá comparar las muestras.

- La distancia (en mm) desde el punto de aplicación en la Cromatografía en Capa Delgada (TLC) hasta el frente del solvente (Df). Esta variable sirve para calcular el Índice de Corrido (Rf), que permitirá comparar las muestras.
- El tiempo (en minutos) que una muestra corre dentro de la columna cromatográfica, medido desde que la muestra se introduce hasta el momento en que se obtiene el punto máximo o pico en la Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC). Se abrevia como RT.
- La ubicación que pueden tener los pigmentos antocianos dentro de los tejidos vegetales de las dos especies.

6.1.3. Descripción del Área de estudio

6.1.3.1. Generalidades

Las dos especies se colectaron en el bosque andino de la Peña de la vereda del Puente de Tierra del Municipio de Saboya, Departamento de Boyacá.

El sitio de estudio correspondió a una franja boscosa alargada que se extiende en sentido EW dentro del predio “El Jardín” con un terreno con

centroide en la Latitud 5°40'49.1" N, Longitud 73°48'47.7" W, (Coordenadas Planas 1.119.577 N, 1.029.652 E) (Figura 5) que constituyó el lugar del cuál se tomaron las muestras (Anexo 1 Localización del área de estudio).



Figura 5. Predio “El Jardín” sitio de estudio.

6.1.3.2. Climatología

La importancia del clima en el desarrollo de este tipo de estudios está relacionada con los elementos: temperatura, humedad relativa, precipitación y radiación solar.

Se consideraron los registros climáticos de la estación Exclusiva Tolón Chiquinquirá(CAR) por ser la más cercana (Latitud 05° 47' 00" N, longitud 72° 59'00" W y por encontrarse a 2548 m.s.n.m (IGAC 2001).

6.1.3.2.1. Precipitación

La región se identifica como una zona de alta pluviosidad, debido a la influencia de las corrientes locales del Valle del Magdalena y de las corrientes provenientes de los llanos Orientales (IGAC 2001).

En la región, la distribución temporal de las lluvias es de tipo bimodal, con dos períodos más secos que separan dos períodos de lluvia, que van de Marzo a Mayo y de Septiembre a Noviembre (IGAC 2001).

La precipitación en el sector es de 1590 mm/año (ver Tabla 1). Con una precipitación máxima de 1590 mm/año y mínima de 33 mm/año.

Tabla 1. Datos Climáticos de la Estación Exclusa Tolón Chiquinquirá (CAR)
Altitud 2548 m.s.n.m.

MESES	TEMPERATURA(°C)	PRECIPITACIÓN(mm)	ETP(mm)
Enero	13.3	70.0	55.7
Febrero	13.5	86.0	51.7
Marzo	13.5	151.0	57.3
Abril	13.4	256.0	56.2
Mayo	13.6	152.0	59.6
Junio	13.1	83.0	55.6
Julio	12.9	41.0	55.6
Agosto	13.2	33.0	56.7
Septiembre	13.5	73.0	56.2
Octubre	12.9	266.0	54.0
Noviembre	12.8	255.0	51.4
Diciembre	12.9	124.0	53.5
Total	13.2	1590.0	663.4
Clasificación climática	Súper húmedo		

Fuente : IGAC 2001

6.1.3.2.2. Temperatura del aire

Los pisos térmicos son el resultado de la distribución territorial de la temperatura, expresada por las variaciones en el sentido vertical, es decir, que a cada nivel altimétrico corresponde una temperatura específica que además depende del grado de la pendiente y del contenido de humedad del lugar (IGAC 2001).

La ubicación altitudinal de la región, a 2.840 m.s.n.m, corresponde al piso térmico frío, que comprende el espacio entre las cotas de 2.000 a 3.000 m.s.n.m (IGAC 2001) (Tabla 1).

La estación exclusiva Tolón Chiquinquirá, que se da a una altitud de 2548 m.s.n.m., registra una temperatura promedio anual de 13.2 °C (Tabla 1).

El proceso de enfriamiento nocturno de la superficie terrestre, favorecido por el cielo despejado y el aire en calma, influyen en el desarrollo de una capa de aire cuya temperatura puede descender por debajo de los 0°C, ocasionando el fenómeno que se conoce como heladas. Las heladas ocurren en los períodos de baja precipitación, particularmente durante los meses de enero y febrero, en la franja altitudinal de 2.500 a 2.700 m.s.n.m (IGAC 2001). El fenómeno de heladas afecta las estructuras foliares de la vegetación herbácea.

6.1.3.2.3. Radiación Solar

Para la obtención de la radiación solar media correspondiente a la región, se utilizó la información de las estaciones radiométricas que se reportan en la Tabla 2, cuyos valores presentan desviaciones muy bajas (menos de 0.05 W/m²) (INEA 1993).

Los valores de radiación solar, expresados como KWh/m² se obtuvieron del Atlas de Radiación Solar en Colombia, publicado por el Instituto de Ciencias Nucleares y Energías alternativas (INEA) Julio 1993, elaborado con base en la información de la red radiométrica nacional, que comprende un total de

203 estaciones. Estos valores fueron calculados por interpolación geométrica entre los espacios inter-isolineales de 3.5 a 4.0, 4.0 a 4.5 y 4.5 a 7.0 W/m². (Tabla 2).

Tabla 2. Radiación Solar Media Mensual Multianual para la región

MESES	RADIACION SOLAR (kWh/m ²)
Enero	4.0
Febrero	4.5
Marzo	5.0
Abril	4.2
Mayo	3.7
Junio	3.5
Julio	4.2
Agosto	4.0
Septiembre	4.2
Octubre	4.2
Noviembre	3.7
Diciembre	3.7

Fuente: Atlas de radiación solar en Colombia INEA 1998

Si bien es cierto que el índice UV, fue establecido con criterios de salubridad, su aplicación en este estudio sirve solamente como guía para conocer el grado de intensidad de la radiación solar en la región, dado que no existe actualmente un criterio respaldado, para calificar la intensidad de la radiación solar con fines ecológicos (INEA1993).

6.1.3.3. Geología y Tipo de Suelo

En cuanto a las características geológicas en toda el área del municipio de Saboya afloran rocas sedimentarias de Edad Cretácea que conforman capas homogéneas, con rumbo N-NE, buzadas pocos grados ($<30^\circ$) al NW y SE, conformando así el Sinclinal de Saboyá, limitado al occidente por el gran anticlinorio de Villeta, al oriente por los escarpes correspondientes a la formación de areniscas de Chiquinquirá (Cuchilla Peña Blanca), con núcleo disectado por el río Suárez, donde se han generado depósitos cuaternarios de Lacho y Terraza.

La unidad geomorfológica a la que pertenece la vereda Puente de Tierra corresponde al Piedemonte coluvial e incluye la franja altitudinal entre los 2800 y 3200 m. Este paisaje es de topografía regular, con suaves pendientes que van desde ligera a fuertemente onduladas. Su origen se debe al movimiento gravitacional de detritos rocosos y materiales procedentes de la región montañosa, que se detuvieron en el piedemonte gracias a la reducción de la pendiente y de la velocidad. Por esta razón, el material es de naturaleza heterogénea que incluye tanto lutitas como arcillolitas y areniscas recubiertas con ceniza volcánica.

También se observan fragmentos discontinuos de roca, en la superficie y abundante pedregosidad en los perfiles de suelo.

Los suelos, en general son moderadamente profundos a profundos, limitados en algunos sectores por pedregosidad. Las texturas o proporción de los agregados son Francas, Areno - limosas y Franco-arenosas y la estructura se presenta blocosa, sub angular moderada. En el predio "El Jardín" la textura es Franca.

6.1.3.4. Flora

El estudio de la vegetación, asumido como la disposición espacial de los diferentes tipos vegetales presentes en determinado espacio geográfico, es importante, no sólo como elemento asimilador de energía solar y por tanto, productor primario de todo ecosistema, sino además, por presentar una relación directa con otros componentes bióticos y abióticos.

En la región se distinguen tres comunidades florísticas que estructuralmente corresponden a:

- Arbóreo denso alto, cuyas especies más importantes son: *Weinmannia tomentosa* (encenillo) y *Drimys granadensis* (canelo de páramo).
- Arbustal abierto alto. Las especies más importantes son: *Miconia biappendiculata* (tuno), *Miconia squamulosa* (tuno esperaldo) *Clusia multiflora* (gaque) y *Viburnum anabatista* (sauco de monte).

- Herbazal denso bajo, con sinusía arbórea. Las especies representativas son: *Rubus furibundus* (mora), *Orthrosantus chimboracensis* (espadilla) y *Pennisetum clandestinum* (kikuyo).

Desde el punto de vista del interés que compete a este estudio, se puede reconocer que las especies estudiadas poseen un amplio grado de adaptación a las condiciones ecológicas de la región.

6.2. MÉTODOS

El estudio se dividió en cinco fases:

- **Fase I.** Toma de muestras en campo.
- **Fase II.** Preparación de las muestras en el laboratorio.
- **Fase III.** Determinación del tipo de pigmento.
- **Fase IV.** Determinación del espectro de absorción de los pigmentos.
- **Fase V.** Ubicación histológica de los pigmentos.

A continuación se describe cada una de las fases.

6.2.1. Fase I. Toma de muestras en campo

En el bosque andino de la Peña de la Vereda de Puente de Tierra del Municipio de Saboyá, se realizaron observaciones de individuos pertenecientes a las especies vegetales *Clusia multiflora* y *Miconia biappendiculata*. Estos individuos, poseen la característica de presentar una pigmentación morado - rojiza en sus primordios foliares.

Se tomaron las muestras en el mes de Julio durante dos días consecutivos entre las 9 de la mañana y las 12. Para la especie *Miconia biappendiculata* se tomaron 30 muestras de hojas jóvenes (primordios foliares) del ápice de

30 individuos (1 muestra por individuo), y para la especie *Clusia multiflora* se tomaron 30 muestras de hojas jóvenes de la zona media de 30 individuos (1 muestra por individuo de hojas jóvenes).

Las muestras se colocaron en bolsas plásticas individuales con cierres herméticos y luego fueron introducidas en una nevera de icopor que contenía cuatro pilas de enfriamiento, con el fin de mantenerlas refrigeradas hasta la llegada al laboratorio, donde fueron colocadas dentro de una nevera a una temperatura de 10 °C.

6.2.2. Fase II. Preparación de las muestras en el laboratorio

Del número total de muestras, se seleccionaron al azar 20 muestras de cada especie, para luego, ser sometidas a respectivos análisis de laboratorio.

Las muestras fueron divididas en dos grupos; uno para hacer los análisis cromatográficos y el otro para hacer los análisis histológicos.

Para los análisis cromatográficos las 40 muestras (80 gr de hojas de *C. multiflora* y 100 g de *M. biappendiculata*) fueron colocadas en cajas de petri

y estas fueron llevadas al horno durante 24 horas a una temperatura de 70° C. Al día siguiente las muestras se pesaron (peso seco 40 g de *C. multiflora* y 50 g de *M. biappendiculata*) y se molieron individualmente con un mortero hasta convertirlas en polvo fino.

De cada una de las muestras se tomó una cantidad de 1g para efectuar la extracción utilizando el método de percolación y como eluyente se emplearon 20 ml de metanol y HCl al 1N (1:1).

Una vez se obtuvieron los extractos se procedió al análisis cromatográfico.

6.2.3. Fase III Determinación del tipo de pigmento

Para la determinación del tipo de pigmento presente en los primordios foliares de *Miconia biappendiculata* y *Clusia multiflora* se emplearon técnicas de extracción de pigmentos mediante cromatografía en capa delgada y cromatografía líquida de alta presión, ya que estas técnicas permiten separar, aislar e identificar los componentes de una mezcla de compuestos químicos (Domínguez 1975, Nair & Esquivel 1980).

6.2.3.1. Cromatografía en capa delgada (TLC)

Con base en los trabajos sobre flavonoides y técnicas de cromatografía realizados por Harborne (1967), Domínguez (1975) y Asen (1958), se desarrolló la cromatografía para los pigmentos antocianos utilizando como adsorbente la gel de sílice G, debido a que ésta posee la característica de separar con éxito compuestos como fenoles, flavonoides y derivados de aminoácidos, entre otros.

Este tipo de adsorbente, como otros, contiene indicadores fluorescentes inertes, tales como el silicato de zinc, el cual emite luz cuando se ilumina la placa con luz ultravioleta de 254nm, esto facilita la identificación de las sustancias separadas.

Una vez se obtuvieron los extractos (Fase II) se procedió a aplicar las muestras sobre las placas de Sílica Gel F-254 (10x10) con la ayuda de capilares. Para las muestras obtenidas de cada especie se utilizaron dos placas en donde se colocaron las 20 muestras a lo largo del punto de partida dejando una distancia de 2 cm entre estas

Para la fase móvil se preparó un eluyente que contenía: acetato de etilo, metanol y amoníaco (85:10:5).

El eluyente fue agregado a una cámara cromatográfica de vidrio con fondo plano y cierre hermético. La cámara fue saturada con el eluyente dejándola 30 minutos en reposo.

Una vez que la cámara estuvo saturada, se procedió a colocar las placas individualmente dentro de la cámara teniendo en cuenta que el borde inferior de la placa estuviera sumergido 5 mm en el eluyente sin que éste tocara las muestras colocadas en las placas.

La cromatografía se desarrolló dejando correr el eluyente 8 centímetros sobre las placas.

Una vez corridas las placas, éstas se sacaron de la cámara y se colocaron en una estufa a una temperatura de 45 °C por 20 minutos para que estuvieran secas.

Luego, se procedió a realizar el revelado utilizando una lámpara CAMAG con luz ultravioleta (254 nm-366 nm).

Con el fin de visualizar las manchas sobre las placas, se les aplicó en forma directa HCl como revelador esperando 5 a 10 minutos, tiempo en el cual se visualizaron los compuestos en las placas.

Se realizó la identificación y la caracterización de las placas, teniendo en cuenta el valor Rf, ya que es diferente para cada sustancia y es expresado como:

$R_f = DM/DF$ donde DM es la distancia (en cm) desde el punto de aplicación hasta el centro de la mancha, y DF es la distancia (en cm) desde el punto de aplicación hasta el frente del solvente.

6.2.3.2. Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC)

Como no se encuentran patrones puros disponibles de antocianinas, se procedió a hacer una cromatografía preparatoria de capa delgada, en la cual se colocó a lo ancho de la placa una muestra continua del extracto obtenido y ésta se corrió en la misma forma que en las placas anteriores, utilizando como eluyente acetonitrilo, metanol y amoníaco (85:10:5).

Para lograr la obtención del patrón semi-purificado se empleó la siguiente estrategia: Se cubrió la placa de forma parcial dejando únicamente un centímetro expuesto (sin cubrir). Luego, se procedió a hacer el revelado para identificar los diferentes compuestos. En la franja correspondiente a las antocianinas se hizo un raspado de la sílica gel y posteriormente se realizó una extracción utilizando el mismo eluyente.

Este patrón fue utilizado en la cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

Utilizando una inyección de 20 μ l, las 40 muestras fueron introducidas individualmente dentro de la válvula inyectora con un flujo de arrastre de 1.0 ml/min.

En el flujo de arrastre se tuvo en cuenta el tiempo (en minutos) que la muestra corre dentro de la columna cromatográfica (RT). Este permite conocer la concentración de pigmentos en la muestra y se mide desde el momento en que la muestra se introduce en el sistema, hasta el momento en que se obtiene el punto máximo de la señal o pico; el tiempo de retención es característico de la muestra. Para ese análisis se utilizó una columna Lichrospher RP-18 5 μ m longitud 250 x 4 mm, un integrador D-2500A y una bomba L. 6000A.

6.2.4. Fase IV. Determinación del espectro de absorción de los pigmentos

Tomando 5ml del extracto inicial se realizó el espectro de absorción para las dos especies en el rango de la luz ultravioleta utilizando un espectrofotómetro VARIAN-340 con lectura en el ultravioleta y en el visible.

6.2.5. Fase V. Ubicación Histológica de los pigmentos

En cuanto a la ubicación de pigmentos en los tejidos vegetales, se tomaron 10 hojas jóvenes pertenecientes a las especies *Miconia biappendiculata* y 10 hojas jóvenes de la especie *Clusia multiflora*. Utilizando un micrótopo se procedió a realizar los respectivos cortes de 5 a 6 micras de grosor. Para la especie *Miconia biappendiculata* se realizaron 5 cortes transversales finos de la base de la lámina foliar al igual que de la zona media, y para la especie *Clusia multiflora* se realizaron 5 cortes a nivel del haz de la lámina foliar, los cuales se fijaron en etanol al 70 % durante 6 horas.

Luego, las muestras se fijaron y fueron sometidas a deshidratación, al pasarlas sucesivamente por soluciones de etanol del 80%, 90% y 96%, durante períodos de 60 minutos. Luego se pasaron por xilol parafina, a diferentes concentraciones.

Se utilizó parafina con un punto de fusión de 42 °C. Finalmente, las muestras vegetales se dejaron en parafina para que se embebieran totalmente y con cada uno de los cortes vegetales se elaboraron bloques de parafina.

Los cortes de cada uno de los materiales vegetales se colocaron en un porta-objetos y se les retiró la parafina con xilol. Este mismo procedimiento se

efectuó para cada uno de los materiales vegetales hasta la eliminación total de la parafina.

Seguidamente, los cortes se rehidrataron pasándolos por soluciones de alcohol de concentraciones inversas a los empleados en la primera parte, durante periodos de 5 min. Los cortes hidratados se colorearon pasándolos por solución de eosina durante 10 min.

Finalmente, los cortes coloreados se observaron al microscopio para analizar su configuración histológica, especialmente la ubicación de los pigmentos en el tejido meristemático.

7. RESULTADOS

7.1. IDENTIFICACIÓN DE LOS PIGMENTOS ANTOCIANOS.

Se determinó el Rf en las 20 muestras de *C. multiflora*, obteniendo como resultado un promedio de 0.49 y una desviación estándar de 0.01099 en las 20 muestras (Tabla 3, Figura 6). Dicho valor corresponde al pigmento antociano PELARGONIDINA (Harborne 1967).

Las 20 muestras de *M. biappendiculata* obtuvieron como resultado un Rf = 0.54 en promedio y una desviación estándar de 0.01128 (Tabla 3, Figura 7). El valor Rf corresponde al pigmento antociano CIANIDINA (Harborne 1967).

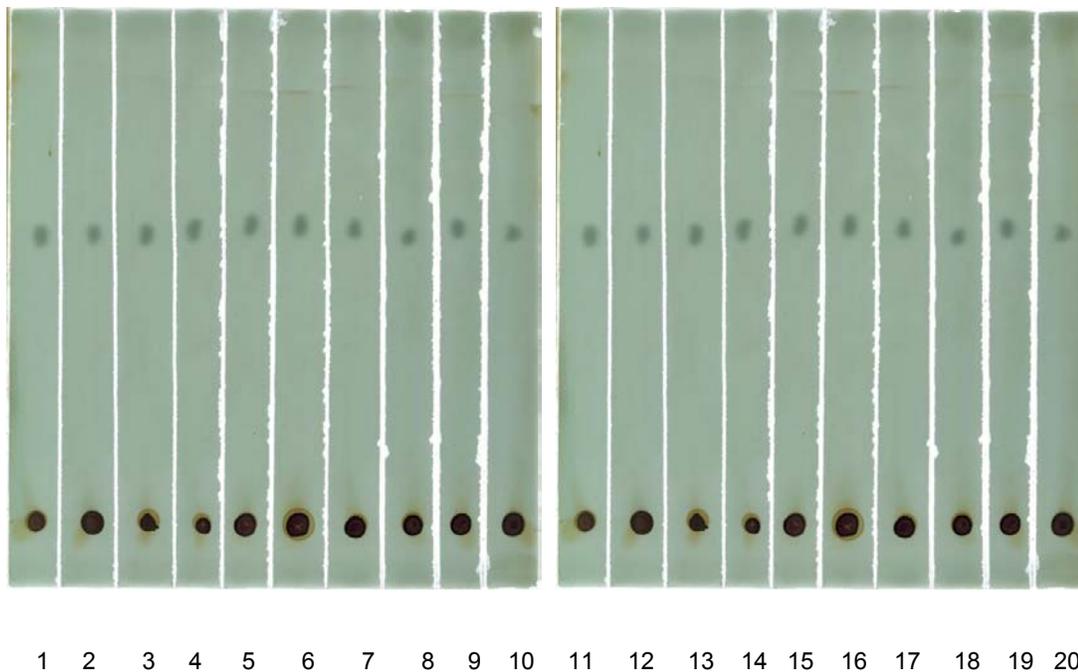
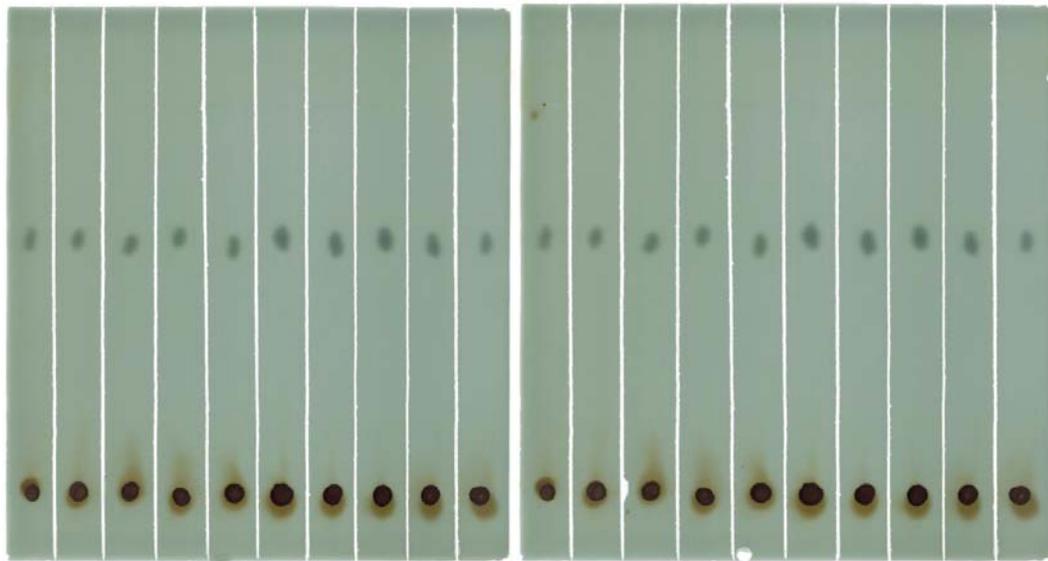


Figura 6. Cromatografía en Capa Delgada (TLC) de 20 muestras *Clusia multiflora*.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

Figura 7. Cromatografía en Capa Delgada (TLC) de 20 muestras de *Miconia biappendiculata*

El revelado de las placas en la cromatografía de capa delgada de ambas especies mostró que las manchas tomaron un color anaranjado, lo que corroboró la presencia de estos pigmentos antocianos. Este resultado fue semejante al de trabajos realizados por Harborne (1973) y Goodwin (1965), en donde utilizaron técnicas de cromatografía y establecieron una clasificación preliminar, en la cual se incluye las propiedades de color que poseen los Flavonoides al ser expuestos a luz visible y a la luz ultravioleta, estos pigmentos presentan un color naranja, rojo y malva.

Tabla 3. Índice de corridos Rf's de los individuos de *C. multiflora* y *M. biappendiculata* en cromatografía en capa delgada TLC

Muestras	<i>M. biappendiculata</i> Rf's	<i>C. multiflora</i> Rf's
1	0.53	0.49
2	0.54	0.50
3	0.53	0.51
4	0.53	0.49
5	0.56	0.51
6	0.54	0.50
7	0.55	0.51
8	0.55	0.49
9	0.56	0.48
10	0.54	0.50
11	0.53	0.51
12	0.54	0.49
13	0.53	0.48
14	0.53	0.50
15	0.56	0.48
16	0.54	0.51
17	0.55	0.49
18	0.55	0.48
19	0.56	0.49
20	0.54	0.50
Prom. Rfs	0.54	0.49
Desv. Est.	0.01128	0.01099

Rf= Índice de Corrido = DM/DF , donde DM es la distancia desde el punto de aplicación de la muestra hasta el centro de la mancha, y DF es la distancia desde el punto de aplicación hasta el frente del solvente.

Para conocer la concentración de pigmentos antocianos de las muestras, se midió el tiempo que éstas tardan en correr en la columna cromatográfica, desde el momento en que la muestra se introduce en el sistema hasta que se obtiene el punto máximo de la señal o pico de cada una. Este se mide en minutos. Los resultados muestran un RT promedio de 2.497 min (Desviación

estándar = 0.0120) para *C. multiflora* y de 2.501 min (Desviación estándar = 0.0138) para *M. biappendiculata* (Tabla 4). Esto indica una concentración promedio del 71% en ambas muestras.

Tabla 4. Tiempos de Retención RT (HPLC) en *C. multiflora* y *M. biappendiculata*

No. de Muestra	RT de <i>C. multiflora</i>	RT de <i>M. biappendiculata</i>
1	2.50	2.50
2	2.50	2.48
3	2.49	2.49
4	2.52	2.52
5	2.48	2.51
6	2.50	2.50
7	2.49	2.48
8	2.49	2.50
9	2.51	2.53
10	2.52	2.50
11	2.51	2.48
12	2.49	2.52
13	2.48	2.51
14	2.49	2.51
15	2.50	2.50
16	2.50	2.50
17	2.50	2.49
18	2.49	2.51
19	2.51	2.50
20	2.48	2.50
Prom. RT	2.497	2.501
Desv. Est.	0.0120	0.0138

7.2. ABSORBANCIA UV-B DE LOS PIGMENTOS ANTOCIANOS

M. biappendiculata presentó un pico máximo de absorción en los 295 nm (Figura 8) y *C. multiflora* obtuvo un pico de absorción de 281.5 nm (Figura 9). No se obtuvieron más picos de absorción en ninguna de las dos especies.

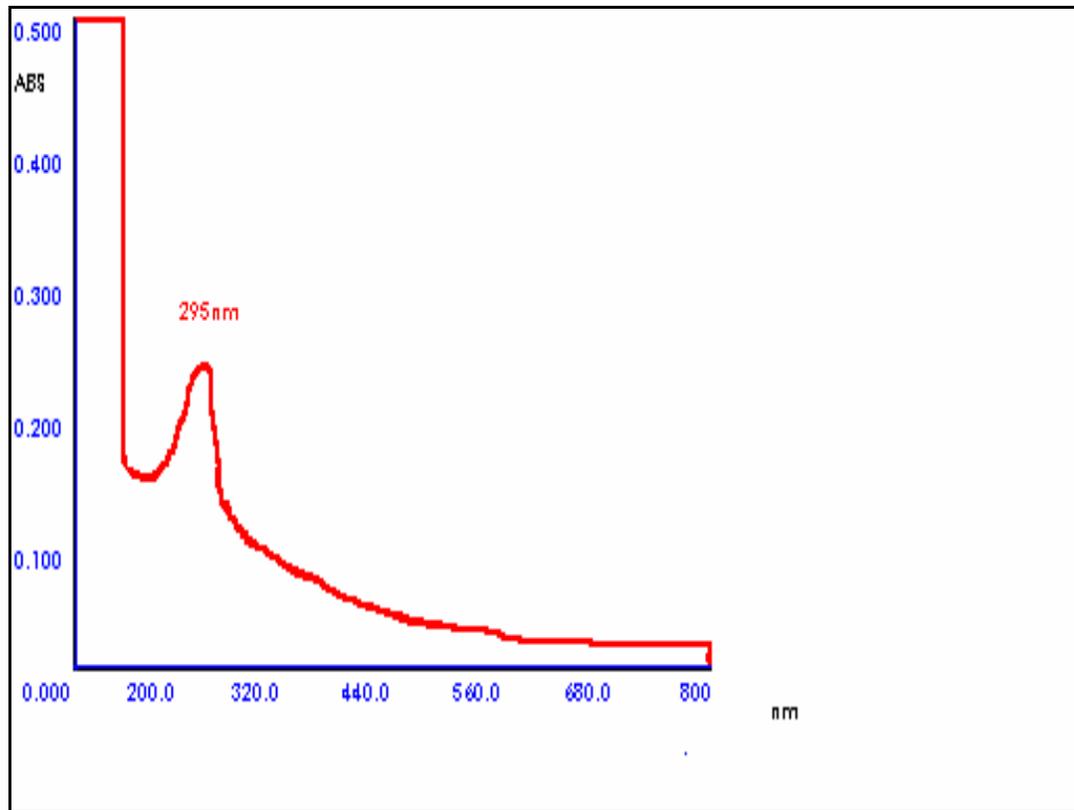


Figura 8. Espectrofotometría de luz ultravioleta UV-B en *M. biappendiculata*. Se observa un pico de absorción de 295 nm.

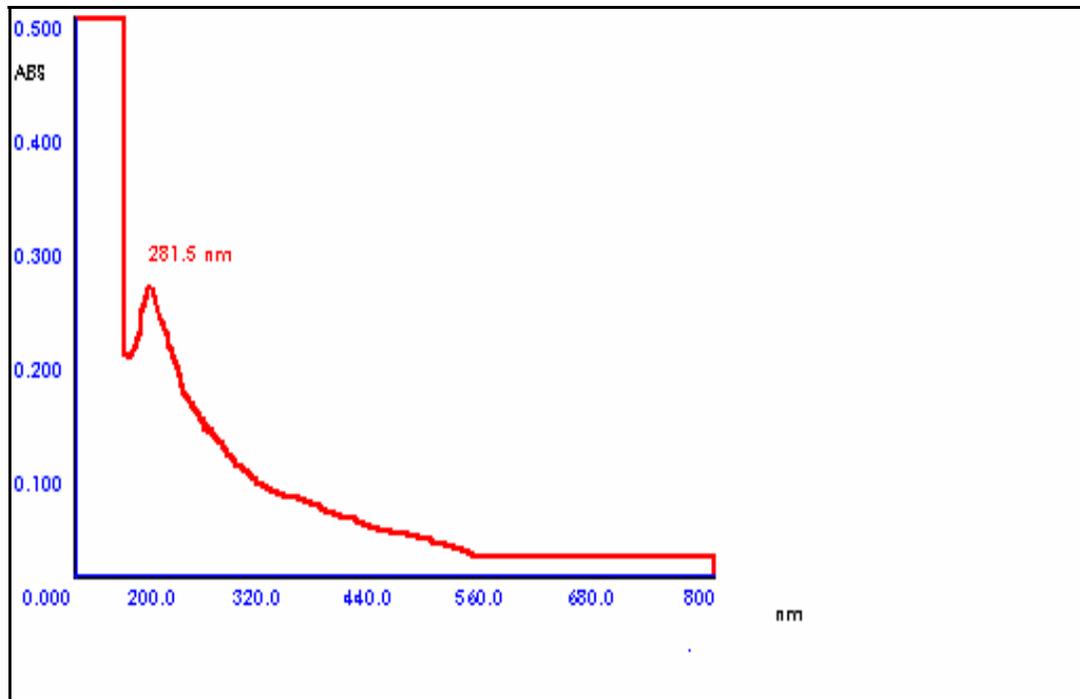


Figura 9. Espectrofotometría de luz ultravioleta UV-B en *C. multiflora*. Se observa un pico de absorción de 281.5 nm.

7.3 UBICACIÓN HISTOLOGICA DE LOS PIGMENTOS ANTOCIANOS EN PRIMORDIOS FOLIARES.

7.3.1 Ubicación histológica en *Miconia biappendiculata*

Al observar los cortes histológicos se encontró que los pigmentos antocianos acumulados en los primordios foliares están ubicados en la epidermis superior e inferior de la lámina foliar (Figura 10).

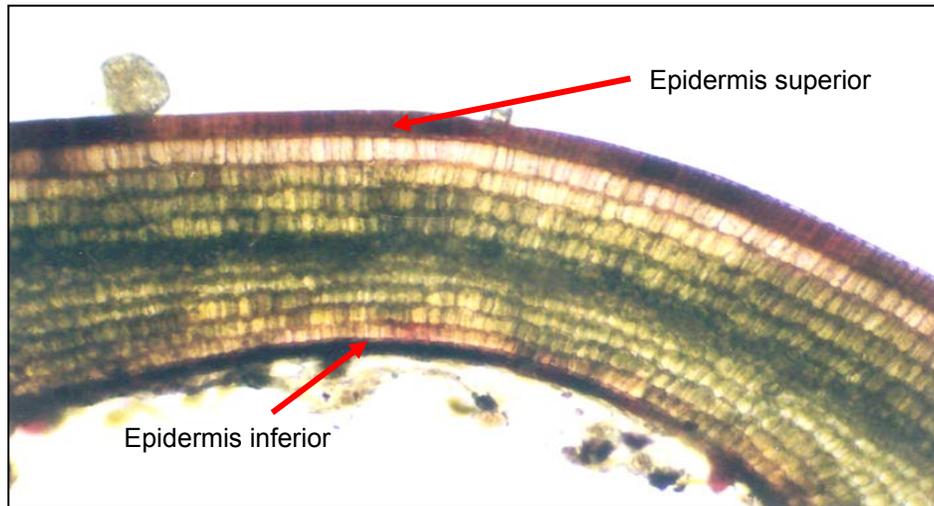


Figura 10. Corte transversal (10x) de primordio foliar en *Miconia biappendiculata*. Se observa la presencia de pigmentos antocianos en la Epidermis superior e inferior.

La epidermis superior de estos primordios foliares mostró un total cubrimiento por parte de los pigmentos antocianos (Figura 11) . Se observa que las células epidermales aparecen totalmente ocupadas por este tipo de pigmento.

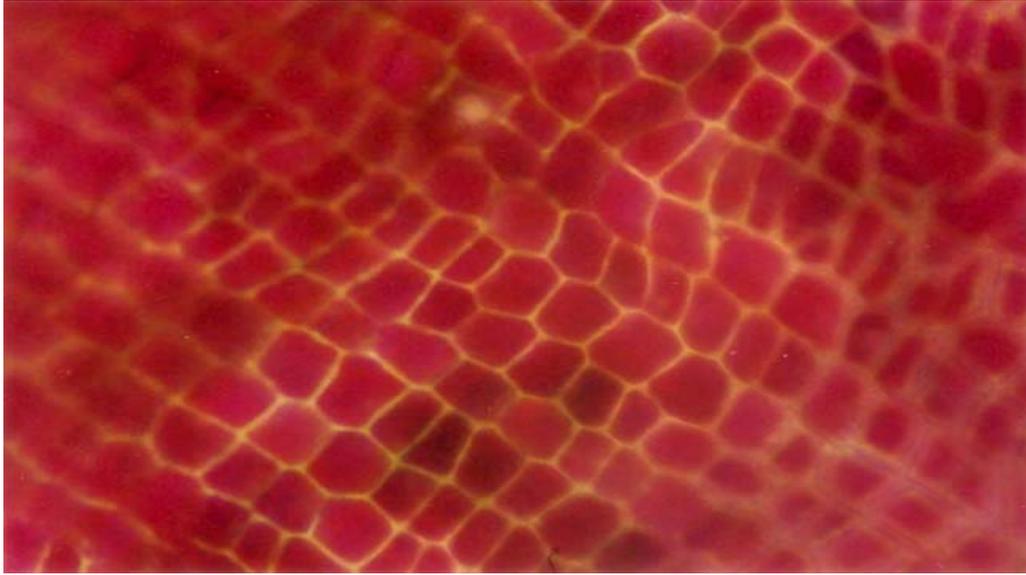


Figura 11. Corte a nivel de epidermis superior (40x) de *Miconia biappendiculata*. Las células aparecen totalmente ocupadas por pigmentos antocianos.

El estudio histológico en *Miconia biappendiculata* mostró que en las zonas pigmentadas con antocianinas los primordios foliares presentan células en división en donde se observan células en diferentes estados de la mitosis como: células en interfase en donde aparecen con núcleos, células en profase donde se observa la cromatina, células en telofase (células binucleadas y la aparición de la pared celular) (Figura 12 y 13).

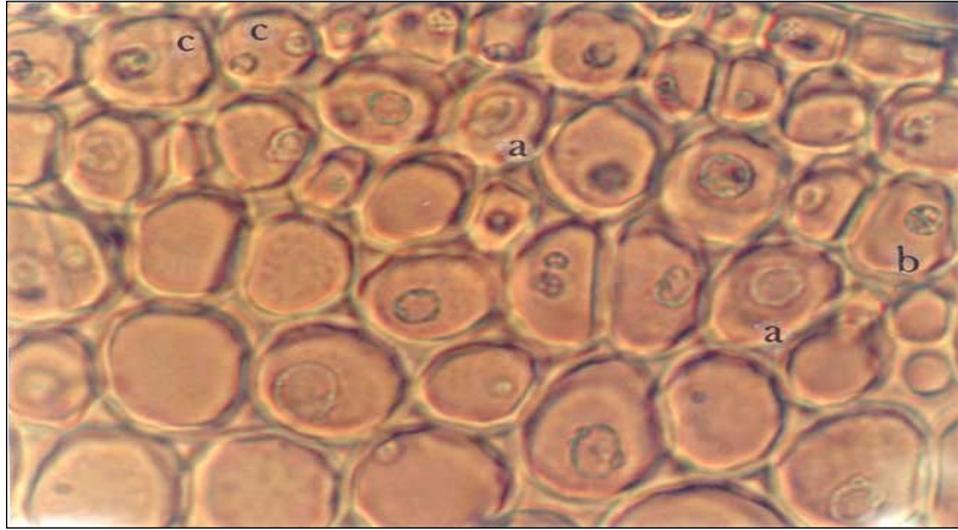


Figura 12. Corte transversal (40x) del tejido meristemático de *Miconia biappendiculata*. **a.** Células en Interfase; **b.** Células en Profase; **c.** Células en Telifase.

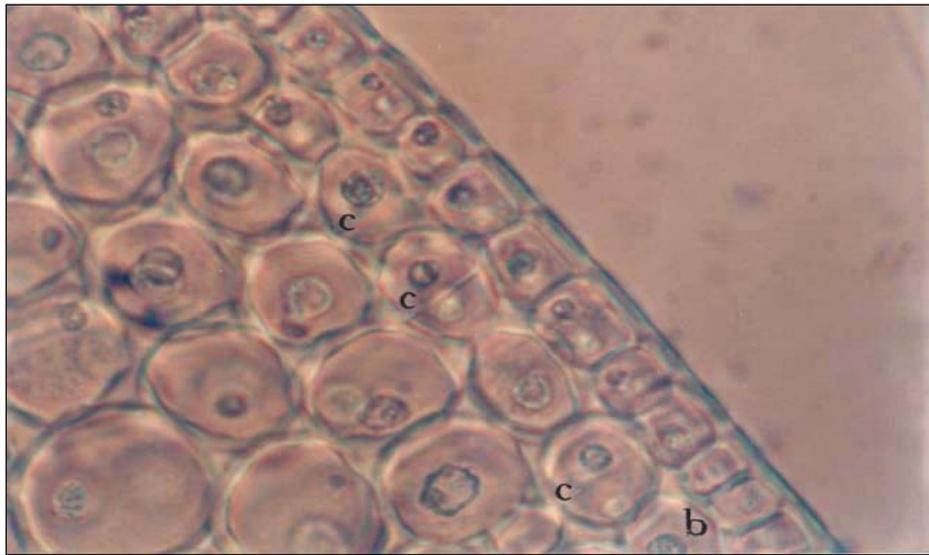


Figura 13. Corte transversal (40x) de primordio foliar de *Miconia biappendiculata*. **b.** Célula en profase (cromatina); **c.** Células en telifase (binucleadas, nueva pared celular).

En láminas foliares un poco más desarrolladas se observó que éstas ya han perdido el pigmento, las células de los diferentes tejidos se encuentran completamente diferenciadas y no se observa actividad mitótica (Figura 14).

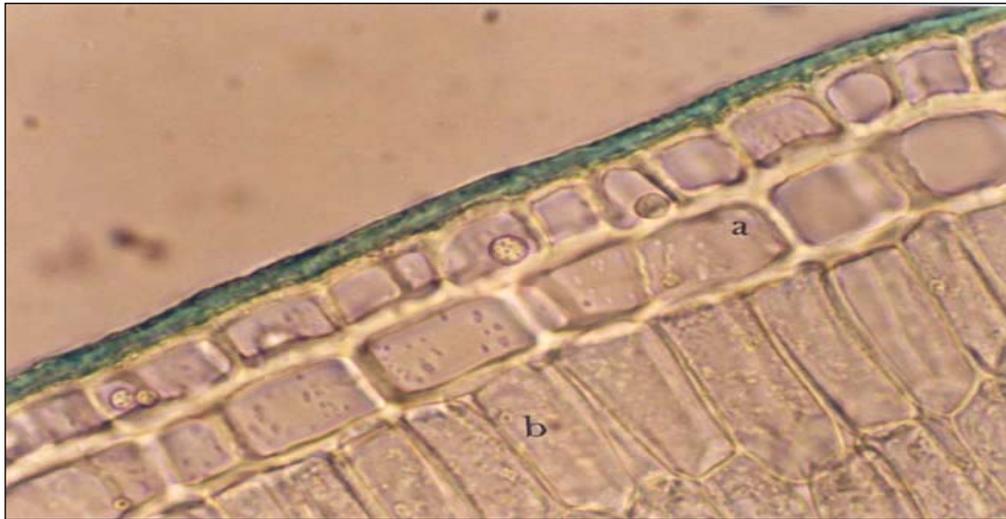


Figura 14. Corte transversal (40x) a nivel de la parte apical de *Miconia biappendiculata*. No se observan pigmentos antocianos en epidermis superior. **a.** Células epidermales. **b.** células de empalizada.

7.3.2 Ubicación histológica en *Clusia multiflora*

En la especie *Clusia multiflora* el corte transversal de la lámina foliar de hoja joven mostró ausencia de pigmento rojo en el haz de la hoja. En cambio, sí se hace presente en el envés, aunque en él se observan zonas de coloración tenue (Figura 15). En esta especie los pigmentos antocianos están ubicados en la epidermis inferior de los primordios foliares y está ausente en la epidermis superior (Figura 15). Algunos cortes mostraron pigmentos antocianos alrededor de los estomas y en células epidérmicas (Figura 16).

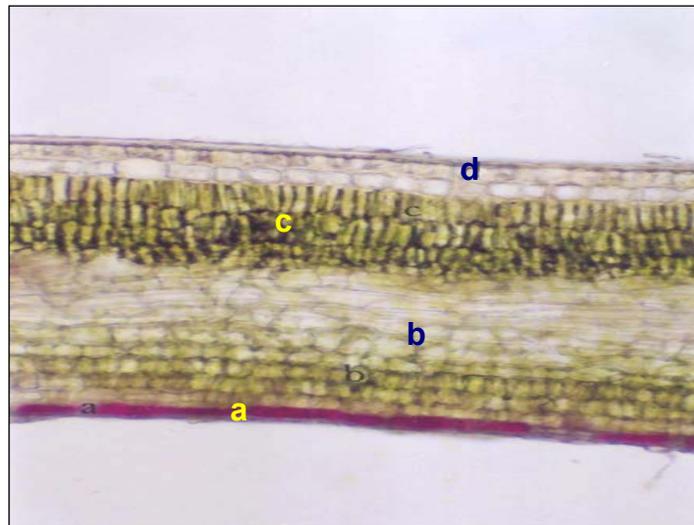


Figura 15. Corte transversal (10x) de primordio foliar de *Clusia multiflora*. Los pigmentos antocianos están ubicados en: **a.** Epidermis inferior. Obsérvese los tejidos **b.** Parénquima esponjoso; **c.** Parénquima en empalizada; **d.** Epidermis superior

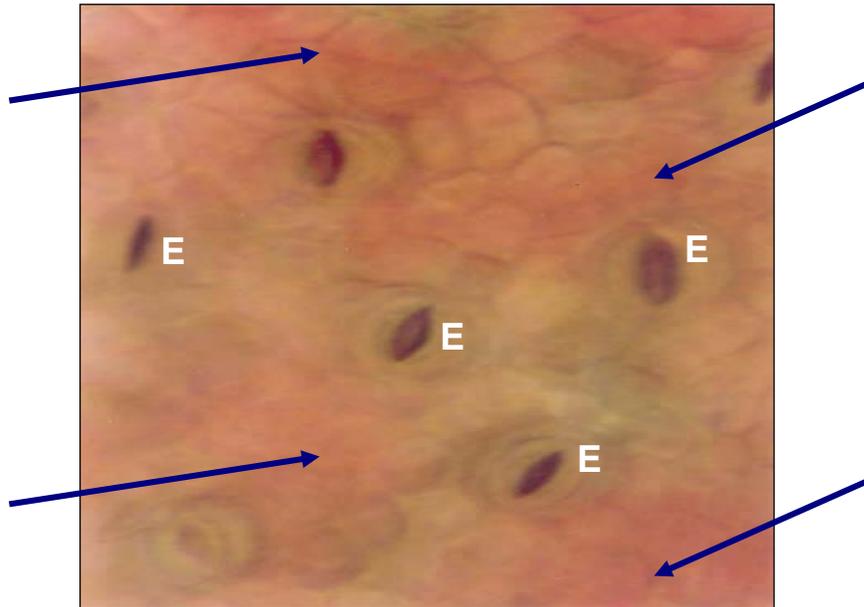


Figura 16. Corte transversal (40x) a nivel de epidermis de primordio foliar de *Clusia multiflora*. Obsérvese la ubicación de los pigmentos antocianos (Flechas) en algunas células epidermales alrededor de los estomas (E).

En *Clusia multiflora* los pigmentos antocianos se presentan cuando las hojas empiezan su crecimiento y estos se ubican en el tejido esponjoso para absorber la radiación UV-B con el fin de que esta no dañe el meristemo (Figura 17).

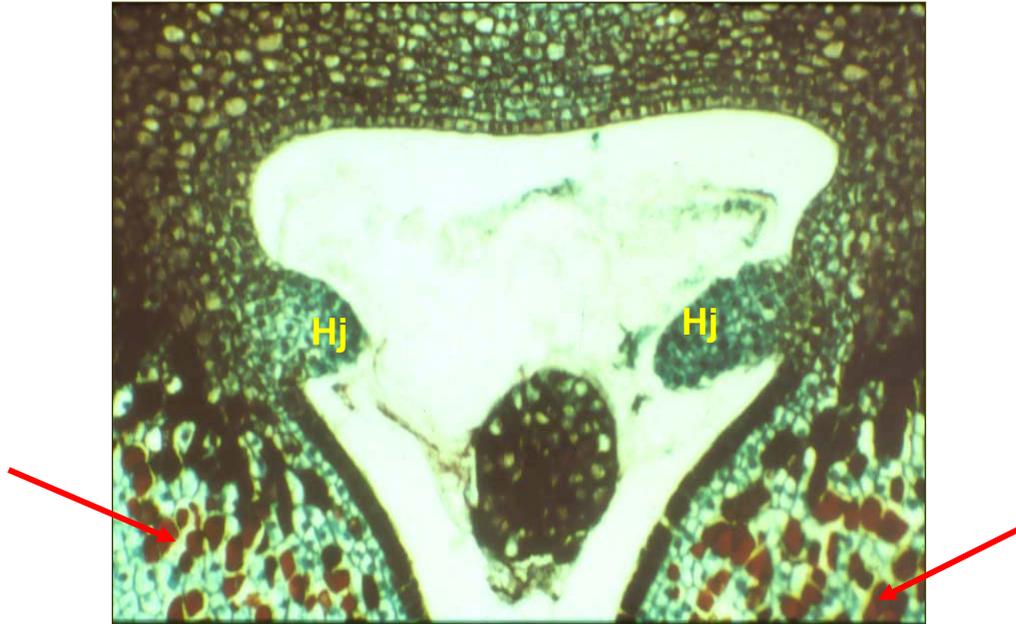


Figura 17. Corte transversal (10x) de primordio foliar en desarrollo de hojas jóvenes en el meristemo de *Clusia multiflora*. Se observa la presencia de pigmentos antocianos (Flechas) en el parénquima esponjoso. Hj: Hojas jóvenes.

8. DISCUSIÓN

8.1 Hipótesis 1: Uno o varios tipos de pigmentos antocianos.

Debido a la copigmentación desarrollada por varios tipos de antocianinas, en la naturaleza algunas especies presentan varios tipos de pigmentos antocianos. Con base en esto se esperaba encontrar que en las muestras obtenidas de los individuos de las especies *Clusia multiflora* y *Miconia biappendiculata* presentaran varios tipos de pigmentos antocianos dentro de cada una de estas; pero de acuerdo con los resultados en las muestras de *Clusia multiflora* se encontró que los primordios foliares en crecimiento solamente acumulan un solo tipo de pigmentos antocianos conocido como la Pelargonidina, mientras que en las muestras de *Miconia biappendiculata* se encontró que los primordios foliares en crecimiento acumulan un tipo diferente de pigmentos antocianos, la Cianidina; coincidiendo con lo propuesto por Harborne 1967.

La presencia de diversos pigmentos antocianos presentes en la naturaleza, ha permitido una clasificación en cuanto al tipo de estructura molecular, lo que ayuda a diferenciar una especie de otra (Harborne 1967).

La cianidina y la pelargonidina son los dos tipos de pigmentos antocianos más abundantes que existen en la naturaleza (Harborne 1967) debido a que participan en la coloración de flores y frutos (Salisbury & Ross 1994), razón por la que era esperar su aparición en *Miconia biappendiculata* y *Clusia multiflora*.

Es de esperarse que existan estas diferencias debido a la evolución de estos pigmentos; para aspectos sistemáticos la cianidina es el pigmento más primitivo de las antocianinas, mientras que la pelargonidina tiene un desarrollo biogénico más reciente. Se ha encontrado incluso, que en especies de los géneros *Antirrhinum* y *Streptocarpus* del viejo mundo tienen diferentes tipos de pigmentos antocianos que en las de nuevo mundo (Harborne 1967).

Los valores promedio de los picos máximos de tiempo de retención (RT) reportados en las muestras de cada especie *C. multiflora* y *M. biappendiculata*, indican que estas especies, acumulan en los meristemas una gran concentración de pigmentos antocianos (71%), más que otros tipos de sustancias, probablemente con el fin de proteger sus tejidos internos, ya que éstos se encuentran en diferentes estados de división celular. De hecho, al observar los primordios foliares en *Clusia multiflora*, la Pelargonidina cubre en su totalidad el envés de la lámina foliar y, al observar los primordios foliares de *Miconia biappendiculata*, la Cianidina cubre en

su totalidad el haz y el envés de la lámina foliar y, una vez que los primordios de estas dos especies han terminado su crecimiento, los pigmentos desaparecen ya que los tejidos se encuentran totalmente diferenciados y las hojas ya están totalmente desarrolladas.

En hojas jóvenes de algunas especies de plantas que poseen colores rojizos se ha encontrado que la cianidina está presente en un 93 % y un 80% (Harborne 1967). En las hojas jóvenes la cianidina se ha encontrado en un 94%, en hojas de otoño en un 80%, en frutas en un 69% y en las flores en un 50%. La comparación entre géneros de Archichlamydae y Sympetalae mostró que la pelargonidina se encuentra en un 24% en ambos grupos y la cianidina en un 56% en Archichlamydae y en un 45% en Sympetalae (Harborne 1967).

Para las especies estudiadas esta hipótesis no se cumple, por que no se presentaron varios tipos de pigmentos antocianos.

8.2. Hipótesis 2: Diferencia en el espectro de absorción.

Un aspecto de las características físicas de los pigmentos antocianos es que, de acuerdo al color de sus órganos estas, se caracterizan por tener diferentes espectros de absorción. De acuerdo con esto se esperaba encontrar que en *Clusia multiflora* y *Miconia biappendiculata* los dos

pigmentos tuvieran diferentes picos de absorción debido a la diferente coloración de sus primordios.

De acuerdo a los datos de los resultados en espectrofotometría, se encontró que los picos de absorción fueron ligeramente diferentes (281.5 nm y 295 nm) lo que permite decir que tanto la especie *M. biappendiculata* como *C. multiflora* acumulan en sus primordios foliares dos tipos diferentes de pigmentos antocianos.

Al ser dos pigmentos diferentes en cuanto a estructura molecular y picos de absorción, éstos dos tipos de pigmentos se encuentran dentro de una misma región UV-B (320 nm –280 nm).

Por naturaleza, la cianidina y la pelargonidina se caracterizan por absorber este tipo de radiación, por lo que se encuentran en los tejidos que conforman el primordio foliar que están en crecimiento activo y son muy susceptibles a daños ocasionados por la radiación UV-B (Gould & Quinn 1999).

En cuanto a *Clusia multiflora* los primordios foliares opuestos recientemente extendidos toman una posición paralela al eje de la rama y casi siempre perpendiculares a los rayos del sol, de manera que la yema apical queda protegida por las láminas foliares y en el envés de estas láminas se acumula la pelargonidina, probablemente con el fin de absorber la radiación UV-B.

Esta hipótesis se cumple ya que los picos de absorción fueron diferentes.

8.3 Hipótesis 3. Función de Protección de acuerdo con la ubicación.

Dentro del Reino vegetal las antocianinas se ubican en diferentes órganos de acuerdo a la función que cumplan. Dentro de *Miconia biappendiculata* y *Clusia multiflora*, al menos para los órganos trabajados, la función más probable que se establece por parte de este tipo de pigmentos es la de protección, ya que en los resultados de este estudio se encontró que la ubicación de los pigmentos antocianos es diferente en las dos especies estudiadas. En la *C. multiflora*, la pelargonidina se acumula en la epidermis inferior y en el parenquima esponjoso y en la *M. biappendiculata* la cianidina se sitúa en las células que conforman la epidermis superior e inferior.

Estudios realizados por Gould y Quinn (1999) con algunas especies nativas de Nueva Zelanda encontraron que la pelargonidina se acumula en el tejido esponjoso, en la epidermis inferior y en el parénquima vascular.

También encontraron que algunas especies nativas acumulan cianidina en la epidermis superior e inferior cuando están expuestas a la radiación UV-B; se sugiere que las antocianinas tienden a ubicarse dentro de estos tejidos

para conformar un escudo de protección de las hojas frente a este tipo de radiación.

En *Miconia biappendiculata* la ubicación de la cianidina en las epidermis superior e inferior de los primordios foliares recientemente extendidos, así como los registros de división celular en la base de las láminas foliares, donde se encuentra este pigmento y la gran capacidad de absorción de energía radiante de alto contenido energético permiten inferir sobre un posible mecanismo de protección que brinda este pigmento al absorber (Hipótesis 2) la luz UV-B especialmente a nivel de las zonas pigmentadas de las láminas foliares donde se registra actividad mitótica.

En *Clusia multiflora*, dada la presencia temporal del pigmento antociano Pelargonidina en la epidermis inferior de los primordios foliares, recientemente extendidos, así como la escasa concentración de clorofilas en las células epidérmicas, permiten establecer que la Pelargonidina no está correlacionada con la actividad fotosintética, sino con la actividad organogénica debido a la división celular que se registra en las láminas foliares, es decir que también puede haber función protectora.

Tanto en *Miconia biappendiculata* como *Clusia multiflora* la presencia zonificada de pigmentos antocianos puede representar una funcionalidad

que estaría relacionada con los períodos de reactivación del crecimiento, en los que, gracias a la actividad mitótica, se producen nuevas hojas y el impedimento de la entrada de luz UV-B a las células meristemáticas, donde afectaría la estructura funcional de los ácidos nucleicos y proteínas.

Se acepta la hipótesis de que la ubicación de los pigmentos, pelargonidina en la epidermis inferior de *Clusia multiflora* y cianidina en las dos capas epidérmicas de *Miconia biappendiculata*, pueden tener una función protectora al rodear los tejidos meristemáticos y no diferenciados de los ápices caulinares, dada su capacidad de absorción de radiación UV-B.

8. CONCLUSIONES

- El tipo de pigmento antociano acumulado en los primordios foliares de la especie *Miconia biappendiculata* fue la Cianidina y en los primordios foliares de la especie *Clusia multiflora* fue la Pelargonidina.
- Debido a las diferencias en los tipos de pigmentos antocianos presentes en las especies *Clusia multiflora* y *Miconia biappendiculata*, el espectro de absorción en la región UV-B fue diferente en cuanto a que se presentaron dos picos de absorción diferentes.
- La ubicación de los pigmentos antocianos Cianidina y Pelargonidia fueron diferentes: en *Miconia biappendiculata* la Cianidina esta presente en la epidermis superior e inferior y en *Clusia multiflora* la Pelargonidina está ubicada en tanto en la epidermis inferior como en el tejido esponjoso.
- La hipótesis 1 que establece que cada una de las especies tiene en sus primordios foliares diversos tipos de pigmentos antocianos , no se

cumple , por que las dos especies no presentaron varios tipos de pigmentos antocianos.

- La hipótesis 2 que establece la diferencia en el espectro de absorción de los pigmentos antocianos de los primordios foliares de las dos especies, se cumple, debido a que los picos de absorción fueron diferentes en las dos especies.
- La hipótesis 3 que establece una posible función de protección por parte de los pigmentos antocianos ubicados en tejidos indiferenciados se acepta, ya que la Pelargonidina al encontrarse en la epidermis inferior y la Cianidina en la epidermis superior e inferior (tejidos indiferenciados) poseen la capacidad de absorber la radiación UV-B.

9. RECOMENDACIONES

- Ampliar la muestra.
- Intensificar los estudios ecológicos de ambas especies con el fin de conocer sus interacciones con el ambiente físico.
- Hacer densitometría con el fin de determinar el tamaño de la estructura molecular de los pigmentos antocianos presentes en ambas especies.
- Verificar si las especies repiten el patrón en otros bosques andinos o ecosistemas.
- Realizar estudios moleculares de las características de las moléculas químicas de la Pelargonidina y Cianidina.
- A futuro realizar estudios que permitan la identificación de los genes involucrados en la producción de estos antocianos.

10. REFERENCIAS

- Ahston, F. & A. S. Crafts. 1981. Mode of Action of Herbicides. Awiley-Interscience Publication. New York. pp. 85-89.
- Arias, G. 1985. Análisis de los compuestos menos polares presentes en los frutos de *Clusia multiflora*. Tesis. Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional. Colombia. 124p.
- Asen, S. 1958. Anthocyanins in Bracts of *Euphorbia pulcherrima* as Revealed by Paper Chromatographic and Spectrophotometric Methods. *Plant Physiology*. 33:14-16.
- Ballare, C., Scopel, A., Stapleton, A. & Yanovsky, M. J. 1996. Solar Ultraviolet-B radiation affects seedling emergence, DNA integrity, plant morphology, growth rate, and attractiveness to herbivore insects in *Datura ferox*. *Plant Physiology*. 112: 161-170.
- Brouillard, D. 1983. The *in vivo* expression of anthocyanin color in plants. *Phytochemistry*. 22:1311-1323.

- Cockell, C. & J, Knowland. 1999. Ultraviolet radiation screening compounds. *Biol.Rev.* 74: 311-345.
- Correa, E & H, Y, Bernal. 1993. Especies vegetales promisorias de los países del Convenio Andrés Bello Tomo IX. SECAB, Bogotá, Colombia. pg.482.
- DAMA, 2000. Protocolo distrital de restauración ecológica. Guía para la restauración de ecosistemas nativos en las áreas rurales de Santa Fé de Bogotá. Departamento Técnico Administrativo Medio Ambiente Alcaldía Mayor Santa Fé de Bogotá. Fundación Bachaqueros Estación Biológica Colombia. pg: 288
- Davies, D. 1987. *The Biochemistry of Plants. Physiology of Metabolism.* Academic Press. San Diego. pp. 260.
- Domínguez, A. 1975. *Cromatografía en papel y en capa delgada.* Limusa. Madrid. pg.34-65 .
- Goodwin, T. 1965. *Chemistry and Biochemistry of plant pigments.* Academic Press. London. pp. 434.

- Goodwin, T. & E. I. Mercer. 1988. Introduction to plant biochemistry. Pergamon Press. London. pp.415.
- Gould, K. & B. D. Quinn. 1999. Do anthocyanins protect leaves of New Zealand native species from UV-B?. New Zealand Journal of Botany. 37:175-178.
- Gross, J. 1987. Pigments in fruits. First Edition. Academic Press. London. pp.59-84.
- Hagen, C. 1966. The Differentiation of Pigmentation in Flowers Parts. II. Changes in Pigments During Development of Buds in *Impatiens balsamina* Genotype HHHPP¹. American Journal of Botany.53: 54-60.
- Harborne, J. 1967. Comparative biochemistry of the flavonoids. First Edition. Academic Press. England. pp. 320.
- Harborne, J. 1973. Phytochemical Methods A Guide to Modern Technique of plant. Chapman and Hall. London. pp. 210.

- Heinrich-Krause, G., C. Schmude, H. Garden, O. Koroleva, & K. Winter. 1999. Effects of solar ultraviolet radiation on the potential efficiency of photosystem II in leaves of tropical plants. *Plant Physiology*. 121: 1349-1358.
- Hernández, M. 1992 *Clusia multiflora* En Plantas Colombianas su aplicación medicinal. primera edición. Editorial Presencia. Bogotá. pg. 115, 116.
- Hernández, A. 1993. Taxonomía numérica del genero *Miconia* Ruiz & Pavón, en el parque Nacional Natural Chingaza (Cundinamarca, META –COLOMBIA). Trabajo de Grado (Biólogo). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias, Carrera Biología. Bogotá. 281p.
- Instituto de Ciencias Nucleares y Energías Alternativas (INEA), 1988. Atlas de radiación en Colombia. Editorial Ciencias Nucleares y energías alternativas. Colombia. pg. 25-35.

- Instituto Geográfico Agustín Codazzi (IGAC) 2001. Contribución al conocimiento del régimen térmico y pluviométrico en Colombia, publicado por la revista Colombia Geográfica Vol. XII No. 2. pg.44-56.
- Julien, D. 2000. "Why are roses shoots red"(en linea). Rose Petals The official Website for the Seattle Rose Society. Publicado en <http://www.bmi.net/roseguy/redshoot.html>.
- Kendrick, R & G. Kronenberg. 1986. Photomorphogenesis in plants. Martinus Nijhoff Publishers. Boston. pp. 775.
- Kootstra, A. 1994. Protection from UV-B-induced DNA damage by flavonoids. Plant Molecular Biology. 26: 771-774.
- Levy & Skiles 1996. Response of two plants species to two Ultraviolet -B Radiation of UV screening pigments (flavone glycosides and anthocyanins) in the epidermal cell layer of plant leaves. http://www.ugcs.caltech.edu/levy/UV-B_paper.pdf.
- Lindoo S. & M. Caldwell, M M. 1978. Ultraviolet-B Radiation –induced Inhibition of Leaf Expansion and Promotion of Anthocyanin Production. 61:278-282.

- Lee, W. 1997. Red coloration in leaves of everglades plants. (en linea).
En Walt Dineen Society Annual Confernce 1997 Session 1: Upland
Plants Abstract No 97105. lades. fiu. Edu /Ever glades. fiu. Edu /
dineen/97105.html Information Network & Digital library. Florida
International University.
- Lo. S & R. L. Nicholson, 1998. Reduction of Light- Induced
Anthocyanin Accumulation in Inoculated Sorghum Mesocotyls. *Plant
Physiology*. 116:979-989.
- Maguire, 1978. Notes on the Clusiaceae. *Revista Fitologia* 38:3:207-
208.
- Maekawa, M.2002. Recent information on anthocyanins pigmentation
Research Institute for Bioresources, Okayama University, 710,Japan.
http://www.gramene.org/newsletters/rice_genetics/rgnhtml.
- Markham, K. K, Gould. C., Winefield, Mitchell, K. A. Bloor, S. J. & M.
R. Boase. 2000. Anthocyanic vacuolar inclusions their nature and
significance in flower colouration. *Phytochemistry*. 55: 327-336.

- Mazza, C., Boccalandro, H., Giordano, C., Battista, D., Scopel, A., & L. Ballare. 2000. Functional significance and induction by solar radiation of ultraviolet-absorbing sunscreens in field-grown soybean crops. *Plant Physiology*. 122:117-125.
- Middleton, E. & H. Teramura. 1993. The Role of Flavonol Glycosides and Carotenoids in Protecting Soybean from Ultraviolet-B Damage. *Plant Physiology*. 103:741-752.
- Mirecki, R. & A. H. Teramura. 1984. Effects of Ultraviolet-B Irradiance on Soybean. *Plant Physiology*. 74:475-480.
- Nair, M. & Esquivel B. 1980. *Cromatografía líquida de alta presión*. 2.da edición. Secretaria general de la Organización de los Estados Unidos.Chile. 72p.
- Pérez, E. 1996. *Plantas Útiles de Colombia*. Quinta edición. Edición de Centenario. Bogotá, Colombia. pg. 831.

- Sarma, A., & R. Sharma. 1999. Anthocyanin-DNA copigmentation complex: mutual protection against oxidative damage. *Phytochemistry*. 52: 1313-1318.
- Salisbury, F. & C. Ross. 1994. *Fisiología Vegetal*. Grupo editorial Iberoamericana. Mexico. pg. 759 .
- Scott, L. 1999. Environmental Significance of Anthocyanins in Plant Stress Responses. *Photochemistry and Photobiology*. 70(1):1-9.
- Searles, P., Caldwell, M. & K. Winter. 1995. The Response of Five Tropical Dicotyledon species to Solar Ultraviolet-B Radiation. *American Journal of Botany*. 82(4):445-453.
- Sharma, R. 2001. Impact of Solar UV-B on Tropical Ecosystem and Agriculture. Case Study: Effect of UV-B on Rice. http://194.236.255.117/lkpakvarie/defdac/articles/Case_Study_Effect_of_UV-B_on_rice.html.
- Siegelman, H. & S. B. Hendricks, 1957. Photocontrol of Anthocyanin Formation in Turnip and Red Cabbage Seedlings. *Plant Physiology*. 32: 393-398.

- Stapleton, A. & V. V. Walbot. 1994. Flavonoids Can Protect Maize DNA from the Induction of Ultraviolet Radiation Damage. *Plant Physiology*. 105: 881-889
- Steyermark, & O. Huber. 1978. Flora del Avila. Flora y vegetación de las montañas del Avila, de la Silla y del Naiguatá. Publicación Especial de la Sociedad Venezolana de Ciencias Naturales. Caracas pg. 71.
- Taiz & Zeiger, 1991. *Plant Physiology*. The Benjamin Cummings Publishing Company, New York. pp. 105-109.
- Torres R.J. 1983 *Clusia multiflora* In: Contribución al conocimiento de las plantas tintóreas registradas en Colombia. Primera edición Editorial carrera séptima. Bogota Colombia. pg. 122.
- Uribe, 1940. *Clusia multiflora*. En Flora de Antioquia. Primera Edición. Imprenta Departamental. Medellín Colombia. pg. 136.
- Uribe, L. 1960. Sertula Florae Colombiae. *Revista Caldasia* 8:38: 319-329.

