



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala
CARRERA DE BIOLOGIA

ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO DE CALLOS Y CELULAS EN
SUSPENSION DE TRES VARIETADES DEL GENERO Capsicum
PARA LA PRODUCCION DE CAPSAICINOIDES.

T E S I S

Que para obtener el Título de
B I O L O G O

p r e s e n t a

Victoria Teresita Velázquez Martínez

Los Reyes Iztacala, Edo. de Méx. 1988



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



ESCUELA NACIONAL DE PROFESIONES
PROFESIONALES QUERÉTARO

ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO DE CALLOS Y CELULAS EN
SUSPENSION DE TRES VARIEDADES DEL GENERO Capsicum
PARA LA PRODUCCION DE CAPSAICINOIDES.

A mis queridos padres:

Sra. Joaquina Martínez de Velázquez.
Sr. Mauro Velázquez Vidals.

Por darme la oportunidad de elegir,
depositando en mí su amor y confianza.

A mis hermanos (as):

Quienes me han alentado a seguir
adelante, con su ejemplo y su cariño.

A mis compañeros del grupo de cultivo de
células vegetales:

Juanita, Bernarda, Mario, Patricia,
Sergio, Antonio, Gonzalo y Victor.

Por que hemos compartido experiencias
gratas, encontrando siempre el apoyo
incondicional que nos alienta a seguir
adelante. A quienes deseo que alcancen su
meta, cualquiera que esta sea.

Al M. en C. Carlos Arias Castro:

Quien me supo guiar a lo largo del presente trabajo con sus experiencias y conocimientos. Por la confianza que depositó en mí.

A mis compañeros de la carrera de Biología de la generación 82-85, deseándoles éxito hoy y siempre.

A Zeferino:

Por compartir conmigo cada momento. Por su cariño y apoyo.

Y a todas aquellas personas que contribuyeron conmigo para que esta se llevara a cabo....

GRACIAS

Así mismo, deseo hacer patente mi agradecimiento a las siguientes personas:

M. en C. Ana Carmela Ramos Valdivia, quien gracias a sus valiosos consejos y asesoría, pude llegar al término de mi trabajo.

M. en C. Graciano Calva Calva, a quien quiero agradecer su invaluable e incondicional asesoría en diversos aspectos del presente trabajo. Por los conocimientos transmitidos.

M. en C. Martha Alicia Rodríguez Mendiola, por su constante apoyo en el laboratorio durante la realización de esta.

Q.F.B. Elvira Ríos Leal, por su ayuda para la lectura de muestras en el equipo de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

Arq. Arturo Moreno, por su disponibilidad para la realización de las figuras aquí mostradas.

El presente trabajo se llevó a cabo bajo la asesoría del M. en C. Carlos Arias Castro, en el Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, como parte del proyecto "Producción de Capsaicinoides por Células del Género Capsicum en Cultivo Sumergido" (CLAVE CONACyT PVT/AI/NAL/85/3155).

CONTENIDO

TEMA	PAGINA
I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCION.....	3
III. OBJETIVOS.....	6
IV. ANTECEDENTES.....	7
1. Cultivo de tejidos vegetales.....	7
2. Metabolitos secundarios.....	11
3. Descripción de <u>Capsicum</u>	15
4. Generalidades sobre capsaicinoides.....	17
V. MATERIALES Y METODOS.....	22
1. Material biológico.....	22
2. Medios de cultivo.....	22
3. Condiciones de cultivo.....	23
4. Desinfestación de la semilla.....	24
5. Cinéticas de crecimiento de callos.....	24
6. Establecimiento del cultivo en suspensión.....	26
6.1. Cinéticas de crecimiento en suspensión.....	26
7. Evaluación del contenido de capsaicinoides.....	27
7.1. Extracción de capsaicinoides.....	27
7.2. Cuantificación de capsaicinoides.....	28
8. Evaluación del consumo de nutrientes.....	29
VI. RESULTADOS.....	31

VII. DISCUSION.....	38
VIII. CONCLUSIONES.....	52
IX. LISTA DE CUADROS.....	54
X. LISTA DE FIGURAS.....	64
XI. BIBLIOGRAFIA.....	75
XLL. APENDICE.....	81

I. RESUMEN

Uno de los recursos derivados del reino vegetal, con gran aplicación en la industria farmacéutica y de saborizantes son los llamados metabolitos secundarios, en los cuales quedan comprendidos los capsaicinoides, que son los compuestos responsables del sabor picante del chile y que además presentan varias propiedades de carácter farmacológico.

En este trabajo se presentan los resultados del contenido de capsaicinoides en los frutos de tres diferentes tipos de chile: Capsicum annuum var. annuum (chile de agua) y C. annuum var. glabriusculum (chiltepín y chilpay) evaluados mediante la técnica de HPLC, obteniéndose los siguientes valores (mg capsaicinoides/g fruto seco): 1.8; 11.9 y 14.9 respectivamente.

Por otra parte, después de diferentes preacondicionamientos de tipo físico y químico, se favoreció la germinación de las semillas de estos frutos, para obtener plántulas "in vitro" que sirvieron como fuente para la obtención de callos y posteriormente de células en suspensión en dos medios de cultivo: Murashige & Skoog (1962) y/o Shenck & Hildebrandt (1972).

Los callos obtenidos fueron fácilmente disgregables realizándose con ellas diversas cinéticas de crecimiento con las cuales se evaluó su velocidad específica de crecimiento (μ). Dichos valores quedaron comprendidos entre 0.098 y 0.19 días⁻¹. A su vez, en dichas cinéticas se evaluó el contenido de capsaicinoides, mismo que fué de 1.4 y 1.9 mg capsaicinoides/g callo para chiltepín y chilpay respectivamente, en tanto que fué nula para el chile de agua.

Los cultivos en suspensión se obtuvieron solo con los chiles

de la var. glabriusculum observándose que la μ del chiltepefn era de 0.6 dfa⁻¹ y para chilpay 0.12 dfa⁻¹ con una producción máxima de 0.47 y 0.38 mg capsaicinoides/ g peso seco respectivamente. Además en el transcurso de las cinéticas de crecimiento se evaluó el consumo de nutrientes (fosfatos, carbohidratos, nitratos y amonio) siéndo los fosfatos los que se consumieron con mayor rapidez, agotándose después de 10-15 dfa de cultivo, en comparación a los demás nutrientes, los cuales se consumieron en forma más lenta sin llegar a agotarse en el medio de cultivo.

II. INTRODUCCION

Sin duda alguna, el reino vegetal está dotado con una capacidad biosintética muy versátil, misma que ha permitido su empleo para satisfacer las múltiples necesidades del hombre, pues de las plantas se pueden obtener compuestos muy variados de gran importancia y la obtención de estos compuestos de origen vegetal se ha incrementado significativamente en los últimos años empleando las técnicas de cultivo de tejidos vegetales. La mayor parte de las investigaciones con este objetivo se han dirigido principalmente hacia la producción de compuestos farmacológicamente activos, colorantes, saborizantes, gomas y aceites esenciales que se han empleado normalmente en la elaboración de alimentos, medicamentos y cosméticos.

Sin embargo, los estudios acerca de la utilización del cultivo de células vegetales para la producción de metabolitos secundarios son relativamente escasos, como en el caso del chile, ya que a pesar de que este juega un papel muy importante en la dieta del mexicano, en México apenas se cuenta con muy pocos estudios acerca de los principios activos de este fruto, que son los responsables del picor que estos presentan, así como de su extracción y los productos que de este se pueden extraer.

El principio activo de los frutos de chile (Capsicum spp.) esta formado por un grupo de compuestos que reciben el nombre de capsaicinoides. Estos son estructuras muy complejas, cuyo contenido puede variar según sea la especie y las condiciones bajo las cuales estas dichas especies se reproducen.

Estos metabolitos tienen una gran importancia comercial, pues

tienen un gran número de aplicaciones tanto en la industria farmacéutica como en la alimentaria (Lega, 1984; Susuky e Iwai, 1984).

Así, es evidente la importancia de tratar de obtener los capsaicinoides por extracción directa en solventes a partir de los frutos como se realiza actualmente por métodos convencionales en diferentes países del mundo, sin embargo el cultivo de tejidos vegetales representa una alternativa para lograr la obtención de dichos metabolitos secundarios con las ventajas potenciales que dicha técnica conlleva, ya que una vez establecido el cultivo a nivel de laboratorio, podría ser posible posteriormente realizar el posible escalamiento a nivel de biorreactores para la manipulación de las condiciones fisicoquímicas del cultivo que permita incrementar la producción de estos metabolitos.

El presente trabajo de investigación forma parte de la etapa inicial de un proyecto global en donde se pretende esto último para lo cual se consideró la recolección de diferentes variedades de chile obtenidas de diferentes estados del territorio nacional para, posteriormente seleccionar la o las variedades con mayor capacidad de biosíntesis de capsaicinoides que podría (n) después ser sometidas a diversos estudios tales como la manipulación de nutrientes y reguladores de crecimiento, adición de precursores, selección de líneas celulares altamente productoras, escalamiento a nivel de biorreactores, con células en suspensión o inmobilizadas, así como estudios de validación de la ruta de biosíntesis.

Específicamente, se trabajó con las var. annuum (chile de agua) el cual es originario de Oaxaca, y dos tipos de chiles,

chile chiltepin y chile chilpay, ambos de la var. glabriusculum, los cuales son procedentes de Hermosillo, Sonora y de Oaxaca, respectivamente y En vista de que estos chiles pertenecen a una misma variedad pero son de diferente lugar, se habló de ellos como dos variedades diferentes. Los chiles de la var. glabriusculum son comunmente conocidos como piquines y de acuerdo a la literatura (Purseglove y col, 1981, Long-Solís, 1986) corresponden a uno de los tipos de chile más picantes.

Cabe aclarar que los cultivos "in vitro" se iniciaron a partir de las semillas de esta variedad con el fin de obtener un material libre de organismos contaminantes, así como para obtener cultivos a partir de fragmentos de la plántula un poco más homogéneos.

III. OBJETIVOS

1. Establecer las condiciones bajo las cuales germinen "in vitro" las semillas de tres diferentes variedades de Capsicum annuum.
2. Establecer el cultivo "in vitro" (callo y células en suspensión) de las variedades de Capsicum annuum ya especificadas a partir de un fragmento de algún órgano de la plántula obtenida.
3. Determinar el contenido de capsaicinoides en el fruto y en los cultivos de callos y células en suspensión previamente establecidos.
4. Evaluar algunas de las características cinéticas de los cultivos "in vitro" (μ , consumo de nutrientes)

IV. ANTECEDENTES

1. Cultivo de tejidos vegetales.

El cultivo de tejidos vegetales se refiere al cultivo "in vitro" de cualquier parte de la planta bajo condiciones asépticas, ya sea una célula, tejido u órgano.²⁾ Estas técnicas tienen un gran potencial como herramienta en estudios básicos y aplicados en la micropropagación de especies económicamente importantes y como un modelo que permita hacer estudios fisiológicos, genéticos, morfológicos y bioquímicos así como para la obtención de metabolitos secundarios, ya que estos, por su importancia en la industria, pueden ser obtenidos mediante esta técnica de tal manera que incluso, se pueden llevar los cultivos a una mayor escala para obtener una mejor y mayor producción del producto deseado.

Las etapas fundamentales implicadas en el cultivo de tejidos vegetales son muy simples, como a continuación se menciona:

1. Es necesario aislar fragmentos de tejidos u órganos de una planta completa y,

2. A estos tejidos proporcionarles un medio ambiente apropiado en el cual pueda expresar su capacidad intrínseca o inducida (López, 1985).

El éxito de dicho cultivo de tejidos vegetales está muy influenciado por la composición química de los medios de cultivo utilizados y otros parámetros ambientales como luz, temperatura, humedad, etc. Los medios de cultivo en general se encuentran constituidos por los siguientes componentes:

- I. Sales inorgánicas.
 - a) Macronutrientes.
 - b) Micronutrientes.
- II. Vitaminas.
- III. Reguladores de crecimiento (Fitohormonas).
- IV. Aminoácidos y suplementos orgánicos.
- V. Carbohidratos.
- VI. Agua.
- VII. Agente solidificante.
- VIII. Suplementos no definidos. (López, 1985)

Para establecer los cultivos de tejidos se emplean pequeños segmentos de órganos como raíces, tallos, hojas, pecíolo, embriones y partes de los órganos reproductivos.

Quando un órgano, tejido o célula es inoculado y cultivado en medios sintéticos, el patrón de desarrollo puede continuar de manera semejante al que tenía en la planta o cambiar totalmente. Estos aspectos se basan en el principio de totipotencialidad celular, es decir, que cada célula contiene un banco de genes que permite la producción de una copia exacta de la planta madre, con la síntesis de las sustancias características del progenitor bajo las mismas condiciones, de tal manera que la célula hija contiene toda la información genética de la célula de que procedió y posee la capacidad de regeneración del organismo adulto. De ahí que el término totipotencia se refiera al potencial genético total celular (Moore, 1979; Fowler, 1981).

Por otra parte, El desarrollo de la planta es un proceso rígidamente regulado, en donde intervienen sustancias orgánicas que pueden actuar en cantidades muy pequeñas (< 1 mM). Estas

sustancias son conocidas como hormonas y son formadas en ciertas partes de la planta desde donde son translocadas a otros sitios donde provocan respuestas específicas de tipo bioquímico, fisiológico y/o morfológico. Estas hormonas son agentes extremadamente importantes en la integración de las actividades del desarrollo y provocan respuestas de la planta al medio ambiente físico externo, además de regular la expresión del potencial genético intrínseco de la planta. Aunque, por otra parte, existen compuestos sintéticos que se emplean con el mismo fin que las hormonas (Moore, 1979).

-Cuando se tienen el tipo y balance hormonal adecuado es posible obtener a partir de los segmentos inoculados, después de un corto tiempo, nuevo material celular, que recibe el nombre de callo, que es una masa de células no diferenciadas y de crecimiento desordenado que pueden continuar su crecimiento hasta agotar los nutrientes del medio (Fowler, 1981). A partir de este callo se pueden obtener células aisladas o también se puede lograr una división organizada para dar lugar a un órgano de la planta perfectamente distinguible, ya sea una hoja, un tallo, raíces o embriones (Robert, 1985). La respuesta observada durante el cultivo depende de la fuente de tejido (tipo de tejido, posición de la planta, especie, etc) así como la composición del medio sintético y las condiciones del medio físico (Ochoa, 1985).

Cuando los callos se inoculan en medio líquido y se mantienen en agitación continua, las células se separan del tejido formando una suspensión constituida por células individuales o por pequeños agregados celulares. El establecimiento de los cultivos en suspensión depende en gran medida del grado de disgregabilidad

del callo. Esta técnica de cultivo es ampliamente usada como un sistema de estudio de las vías del metabolismo secundario, inducción enzimática y expresión genética, además de ser una fuente de material para la purificación de enzimas (Dixon, 1985).

De acuerdo a Robert (1985) el cultivo in vitro presenta varias ventajas, entre las que se pueden mencionar las siguientes:

- 1) Las condiciones físicas y químicas pueden ser controladas en forma tal que permitan la observación de respuestas a nivel bioquímico y fisiológico.
- 2) Se pueden obtener clones genéticamente estables de una cierta característica.
- 3) Cada célula es un organismo experimental que puede volver a diferenciarse e iniciar un desarrollo organizado que da como resultado la formación de nuevos organismos completos y fértiles.
- 4) Manipular una gran cantidad de células y analizar un gran número de condiciones experimentales en un espacio relativamente reducido y en un tiempo mucho menor que el que se emplea con plantas completas.
- 5) Preservar características de plantas que se encuentran en peligro de extinción, así como su propagación.
- 6) Se evita el empleo de herbicidas y pesticidas que lleguen a dañar al cultivo.

De tal manera que el cultivo con estas características puede abarcar cinco áreas:

- a) micropropagación.

- b) preservación de germoplasma.
- c) mejoramiento genético.
- d) biosíntesis de metabolitos.
- e) investigación básica.

2. Metabolitos secundarios.

Como se sabe, las plantas acumulan sustancias orgánicas en cantidades suficientes que permiten su aprovechamiento empleándolas como materias primas tanto en la industria como para fines científicos. Así, se pueden obtener productos como aceites industriales, resinas, taninos, saponinas, hules, gomas, ceras, colorantes y productos farmacéuticos entre otros. Dichos compuestos quedan comprendidos en alguno de los grandes grupos de sustancias que todas las plantas producen:

- a) **METABOLITOS PRIMARIOS:** Son sustancias ampliamente distribuidas en la naturaleza, manifestándose en todos los organismos. En las plantas superiores tales compuestos se concentran en semillas y partes vegetativas. Estos metabolitos están asociados con los procesos vitales de las células y la secuencia de reacciones donde estas aparecen se distingue porque es posible encontrarlas en las rutas metabólicas primarias.
- b) **METABOLITOS SECUNDARIOS:** Son compuestos biosintéticamente derivados de los metabolitos primarios y parece ser que su distribución general y su ubicación están restringidos, pues cada compuesto en particular aparece en solo un pequeño grupo de organismos. Estos

metabolitos se caracterizan por su ausencia de función metabólica esencial en el organismo, pero muchas veces tienen un papel de tipo ecológico, participando claramente en la reproducción del organismo mediante la atracción de insectos transportadores de polén, así como adaptaciones químicas a alteraciones ambientales o bien como defensas de tipo químico contra microorganismos, insectos y predadores superiores y aún sobre las plantas mismas (Balandrin, F. y col., 1985; Vining, 1986).

Generalmente, los metabolitos secundarios son productos vegetales que tienen más valor comercial. Existen tres principales categorías de metabolitos secundarios: aceites esenciales, glucósidos y alcaloides. Los aceites esenciales consisten de una mezcla de terpenoides y son empleados como agentes saborizantes, perfumes y solventes. Los glucósidos incluyen flavonoides, saponinas, fenólicos, taninos, glucósidos cianogénicos y aceites de mostaza, mismos que son empleados como tinturas, colorantes para alimentos y de uso farmacéutico. Los alcaloides son un grupo diverso de compuestos con más de 4000 estructuras conocidas. Generalmente, tales compuestos son muy activos fisiológicamente en los humanos y consecuentemente son de fuerte interés para la producción de medicinas. Algunos ejemplos son morfina, nicotina, atropina y cocaína (Shuler, 1981).

Además se sabe que dichos metabolitos secundarios, tienden a acumularse en aquellas partes de la planta donde no hay un crecimiento activo, como en hojas senescentes, frutos y semillas

encontrándose dichos compuestos en las partes maduras del cultivo y esto nos indica que los cultivos celulares en crecimiento no son una buena fuente de obtención de productos secundarios (Yeoman, 1980). Así mismo, en un cultivo "in vitro" la acumulación de productos secundarios ocurre principalmente cuando la velocidad de crecimiento del cultivo disminuye y cuando este muestra cierta diferenciación celular. En general, los cultivos de rápido crecimiento y que no muestran organización de ningún tipo acumulan los productos secundarios en bajas cantidades, es por esto que se considera que existe una relación inversa entre el crecimiento, la diferenciación y acumulación de dichos compuestos (Lindsey, 1983).

Actualmente se considera que para lograr la aplicación industrial del cultivo de tejidos vegetales para la producción de metabolitos secundarios se deben intentar satisfacer las siguientes condiciones como requerimientos mínimos:

- a) Las velocidades de crecimiento celular y biosíntesis deberán ser suficientes para la obtención de mayor cantidad del producto final y en un periodo de tiempo corto.
- b) Las células vegetales deberán ser genéticamente estables para que su producción sea constante.
- c) Los metabolitos deberán ser acumulados en las células sin que sean catabolizados rápidamente o, preferiblemente, deberán ser liberados en el medio, y
- d) Los costos de producción deberán ser lo suficientemente bajos como para que puedan ser aprovechados por el

productor. (Tabata, 1976).

Sin embargo, actualmente existen problemas que impiden en cierta forma la explotación comercial de los cultivos de tejidos vegetales para la producción de metabolitos secundarios, como son:

- Reducción del crecimiento y concentración celular como consecuencia de la manipulación del medio.
- Control de la diferenciación celular.
- Pérdida de totipotencia celular.
- Tendencia de las células a formar agregados.
- Inestabilidad genética, que se llega a manifestar mediante la variabilidad de las líneas celulares. (Shuler, 1981).

A pesar de lo anterior, se siguen empleando y a su vez modificando las técnicas ya existentes con el fin de encontrar una forma conveniente de explotación de dichas sustancias. Un procedimiento usual de lograr la producción de metabolitos secundarios en los cultivos de células vegetales es la manipulación del medio de cultivo así como de los reguladores de crecimiento, o bien la variación de las condiciones físicas tales como luz y temperatura. Estos factores pueden variar de tal forma que las cantidades del producto de interés pueden exceder a las producidas por la planta misma (Stafford y col. 1986).

3. Descripción de Capsicum.

La palabra Capsicum, término que se aplica a los frutos de las numerosas variedades de esta planta viene del griego "kapso" que significa morder, haciendo alusión a lo picante del fruto, y la palabra chile proviene del náhuatl "chilli" que significa capsula debido a la forma del fruto que guarda dentro de sí las semillas (Lomeli, 1986).

Las plantas de Capsicum (Cuadro 1) ocurren de manera espontánea y se distribuyen ampliamente desde el sureste de Estados Unidos, pasando por México y América Central hasta el noreste de Sudamérica (Purseglove y col, 1981).

Capsicum annuum var. annuum (Heiser y Pickersgill, 1975) tiene un gran número de cultivares y es el chile más importante desde el punto de vista económico. Casi todos los chiles de frutos largos, tanto picantes como no picantes, crecen en zonas templadas del norte. Los cultivares de la var. annuum muestran mucha variabilidad principalmente en sus frutos. Esta planta es una hierba o arbusto, erecto y muy ramificado, de 45 a 100 cm. de alto. Usualmente maduran en estadios tempranos y crecen anualmente. Los frutos son bayas indehiscentes con muchas semillas, penduloso o erecto y generalmente se sostienen en forma individual en los nodos. Los frutos son extremadamente variables en tamaño, forma y color, así como en el grado de picor. Generalmente se encuentran entre 0.8 a 30 cm de largo con un diámetro de ancho variable y puede ser lineal, cónico o globoso. El fruto inmaduro puede ser verde, amarillo o púrpura y cuando madura es rojo, anaranjado, amarillo, café o púrpura. Las semillas son aplanadas, amarillo pálido y de 3 a 5 mm en su diámetro más

largo (Purseglove, 1981).

C. annuum var. glabriusculum (Dunal, en Spices, 1981), es otra variedad de C. annuum y de acuerdo a Heiser y Pickersgill (1975) esta variedad es probablemente el ancestro de la var. annuum con la cual se llega a cruzar. Esta variedad es empleada generalmente como condimento. No es cultivada. Sus frutos son extremadamente picantes, de aproximadamente 13 mm de diámetro. Erectos y deciduos. De acuerdo a Heiser (1969) la variedad glabriusculum fué transportada a América Central y México por las aves, las cuales dispersan las semillas de los frutos, o bien por el hombre mismo. Una vez introducida el hombre la cultivó y mediante la selección de diversos habitats surgió una gran diversidad en la forma y color de los frutos así como en el grado de picor. Esta variedad está más ampliamente distribuída desde el sureste de Estados Unidos, México y América Central hasta llegar a Colombia. Estos frutos reciben diversos nombres vulgares de acuerdo a la región donde este se cultive: chiltepfn, chilpaya, mira pa'rrriba, chile de monte, entre otros. En forma general, se les conoce como chiles piquines (Long-Solfs, 1986).

En la actualidad, México es el país del mundo donde se consume más chile y tiene destinadas a su cultivo grandes extensiones de tierra distribuidos por todo el territorio mexicano (cuadro 2). A su vez, debido a la domesticación de la planta, esta ha sufrido modificaciones en las características de sus frutos presentando diferencias en su color, sabor, tamaño, olor y grado de picor (Lomelf, 1986)

Aunque se considera que existen aproximadamente 20 especies

silvestres del género Capsicum, de acuerdo a la FAO se reconocen solo cinco especies domesticadas: Capsicum annuum var. annuum, C. frutescens, C. baccatum var. pendulum, C. chinense y C. pubescens (Maga, 1975; Purseglove, 1981).

El chile (Capsicum) es, entre otros, uno de los productos agrícolas que México exporta. A pesar de ello, se importa a nuestro país el extracto saborizante el cual es denominado oleoresina, que se compone de aceites, pigmentos y capsaicinoides, siendo estos últimos los responsables del picor que los frutos de esta planta presentan.

La composición general de los frutos de esta planta, se muestra en el cuadro 3 y el contenido de estos componentes en el fruto varía de acuerdo a las condiciones ambientales en que se cultiven. De los componentes de este fruto, los capsaicinoides serán el motivo de nuestro estudio.

4. Generalidades sobre capsaicinoides.

El principio picante de los frutos de Capsicum fué aislado en su estado puro por Thresh en 1876 dándole el nombre de capsaicina. Años más tarde, Micko (1898) también obtuvo el compuesto en forma pura y cristalina y fué el primero en detectar la presencia de un grupo hidroxifenólico y un grupo metoxi en la molécula de capsaicina, hecho que lo condujo a la detección de un grupo vainillil.

Posteriormente, en 1910, Nelson estableció la estructura química de la capsaicina, proponiendo que tiene una unidad básica llamada vainillilamina y el ácido isodecenoico (8-metil-N-vainillilnon-6-enamida). Más tarde, Nelson y Dawson en 1923

sintetizaron un compuesto hidrogenado de la capsaicina al cual le denominaron dihidrocapsaicina. A su vez, Crombie (1955) corroboró la presencia de la dihidrocapsaicina y Kosuge e Inagaki (1962) concluyeron que el componente que se encontraba en mayor cantidad era la capsaicina y en menor cantidad la dihidrocapsaicina. Posteriormente, en 1968, Bennett y Kirby, confirman la fórmula estructural de la capsaicina y así mismo, aseguran que existen cinco vainillilamidas con variaciones en las cadenas laterales de ácidos grasos. El contenido de dichos compuestos era: capsaicina (C) 69%, dihidrocapsaicina (DHC) 22%, nordihidrocapsaicina (NDC) 7%, homocapsaicina (HC) 1% y homodihidrocapsaicina (HDC) 1%, en las muestras de C. annum que ellos emplearon y propusieron que estos compuestos se derivaban de la vainillilamina y plantearon, mediante técnicas de marcaje, que la síntesis de estos compuestos inicia a partir de la fenilalanina y la incorporación de dicho aminoácido a capsaicina se realiza por la vía del ácido cinámico.

Hasta 1982, Fujiwake propone la ruta de biosíntesis que se muestra en la fig. 1 en donde es posible apreciar que dicha ruta empieza con la fenilalanina a partir de la cual se sintetiza la vainillilamina, mientras que la valina y la leucina sirven como precursores de las cadenas de ácidos grasos que se unirán al anillo de la vainillilamina para formar la capsaicina y análogos. Cabe aclarar que los capsaicinoides son cristales blancos, que carecen de olor y sabor, cuyo punto de fusión es de 64-65 C (J.C.P.S.S.A.Ch. 1959) y que reciben su nombre de acuerdo al número de carbonos y a la presencia o ausencia de dobles enlaces en su cadena lateral. La estructura química de este grupo de

metabolitos secundarios se encuentra en la fig. 2.

El contenido de estos compuestos varía en el fruto de una especie a otra y aún de una variedad a otra (Maga, 1975) de tal manera que se pueden encontrar variedades "dulces" las cuales no tienen picor o si este existe es mínimo. Para este tipo de variedades la formación y acumulación de los capsaicinoides en los frutos se detectó durante la maduración y post-cosecha manteniéndolos bajo luz continua obteniendo valores de hasta 18 ug/100 g de peso seco de muestra tomada de la placenta del fruto y 24.8 ug/100 g de muestra seca del fruto entero a los 10 días de maduración después de la cosecha en comparación de los 2.4 3.2 ug/100 g de peso seco de muestra de placenta y fruto entero a los 4 días respectivamente. (Iwai, K. y col, 1977). En las variedades picantes sin embargo, se ha cuantificado una mayor cantidad de capsaicinoides inmediatamente después de la floración, alcanzando un máximo cuando llegan a la maduración (Iwai y col. 1979).

Otha (1962), Fujiwake y col. (1982) y Rowland y col. (1983) sugirieron que los capsaicinoides se forman en la placenta y en el septo interlocular del fruto de donde son excretados a un espacio intercelular denominado receptáculo de capsaicinoides, posteriormente, Susuki y col. (1980) empleando técnicas de microscopía de luz y ultravioleta propusieron que dicha biosíntesis era realizada en la vacuola y pequeñas vesículas de las células epidérmicas de la placenta y a su vez los mismos autores, en estudios posteriores (Fujiwake y col, 1980) aislaron las vacuolas de dichas células epidérmicas comprobando su hipótesis. En estudios más recientes, Zamski y col. (1987) emplearon técnicas de microscopía electrónica para dilucidar

específicamente en un nivel interno de la célula el sitio de biosíntesis y proponen que esta se realiza en compartimientos internos del retículo endoplásmico y que existen vesículas receptoras de capsaicinoides derivados de pequeños fragmentos del retículo endoplásmico que migran hacia el citoplasma y se funden con el plasmalema y una vez sintetizados dichos compuestos son liberados hacia el exterior de la célula.

Por otra parte, existen diversos métodos que permiten la cuantificación de los capsaicinoides, entre los que se pueden mencionar: la evaluación sensorial por métodos organolépticos, colorimetría, espectrofotometría, espectrometría infrarrojo, espectrometría de masas, cromatografía en columna, cromatografía en papel, cromatografía en capa fina, cromatografía de gases, cromatografía de líquidos de alta resolución, entre otros (Susuki, T., Iwai, K. 1984).

Los capsaicinoides constituyen un grupo de particular interés ya que tienen diversas aplicaciones, entre las que se pueden mencionar las siguientes: en la industria alimenticia como "saborizante", para la fabricación de cosméticos como rubefacientes, en la industria tabacalera, en la agricultura como repelente en los productos agrícolas y en la industria farmacéutica desempeñan un papel muy importante, ya que actúan sobre las formas estructurales de los receptores del dolor a través de su reacción con una sustancia química del cerebro denominada sustancia P y que se relaciona directamente con la transmisión del dolor (Virus y Gebhart, 1979; Leeman y Gamse, 1981). También son el principio activo de medicamentos contra el reumatismo, flatulencia, dolores musculares, actúa sobre el

sistema respiratorio, diarrea, etc, aunque existen algunos otros usos, los cuales estan asociados con las creencias de los pueblos indigenas y existen otros probables usos, los cuales aún están en investigación como es el caso de la posible aplicación en contra del cáncer, el cólera, el tifo y la malaria (Maga, 1975; Long-Solfs, 1986).

V. MATERIALES Y METODOS

1. Material biológico.

Las variedades de Capsicum empleadas en el presente trabajo fueron:

Capsicum annuum var. annuum (chile de agua). Oaxaca, Oax. Fruto grande, forma cónica con cajete en la unión del pedúnculo. Cuerpo cilíndrico o aplanado con ápice puntiagudo o chato. Verde claro cuando es inmaduro y rojo cuando es maduro. Picante.

Capsicum annuum var. glabriusculum (chiltepín). Hermosillo, Son. Frutos pequeños de menos de 13 mm de diámetro. Erectos y desiguos. Redondos u ovalados. Silvestre. Extremadamente picante.

Capsicum annuum var. glabriusculum (chilpay). Oaxaca, Oax. Fruto de aproximadamente 5 cm de largo, erecto y desigual, ovalado. Silvestre. Extremadamente picante. (Long-Solfs, 1986).

2. Medios de cultivo

Los medios de cultivo empleados en este trabajo fueron seleccionados de acuerdo a Ochoa (1986), y son los siguientes:

a) Murashige y Skoog (MS). (Murashige y Skoog, 1962).

b) Schenk y Hildebrandt (SH). (Schenk y Hildebrandt, 1972).

cuya composición se muestra en el cuadro 4.

Estos medios minerales con sus componentes orgánicos se emplearon para estimular la germinación "in vitro" de las semillas de Capsicum, mientras que para establecer los cultivos de callos y células en suspensión estos medios de cultivo fueron suplementados con reguladores de crecimiento; para el medio MS se empleó ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) 12.5×10^{-3} M, en

tanto que para el medio SH se adicionaron 2,4-D (2.5×10^{-6} M), Ac. p-clorofenoxiacético (1.0×10^{-5} M) y Cinetina (0.5×10^{-6} M). (Ochoa, 1986).

Para el cultivo de callos se emplearon frascos Gerber con 25 ml de los medios de cultivo anteriores, empleando como agente solidificante Gelrite (Kelco Division of Merck & Co., Inc.) en una cantidad de 1.5 gr/l.

Los cultivos en suspensión se desarrollaron en matraces Erlenmeyer de 125 ml de capacidad con 30 ml de medio de cultivo sin agente solidificante. Para la preparación de los medios, se empleó agua desionizada obtenida mediante una columna mixta Barnstea (Sargent-Welch Scientific Co.) El pH se ajustó a 5.8 en un potenciómetro (Fisher Accumet Modelo 525 digital), empleando soluciones de KOH 1M y HCl 1M según se requiriera.

Los medios de cultivo se esterilizaron en un autoclave a 15 lb/pulg² durante 15 minutos, manipulando los cultivos en condiciones de asepsia empleando para ello una campana de flujo laminar (Veco).

3. Condiciones de cultivo.

Los cultivos en medio semisólido (obtención de plántulas y de callos) se mantuvieron en un cuarto de incubación bajo las siguientes condiciones:

a) Iluminación: con lámparas de luz fluorescente (blanco frío) de 32 watts. Los cultivos de los medios semisólidos fueron expuestos a diferentes intensidades luminosas. La intensidad lumínica utilizada se especifica en cada experimento.

b) Temperatura: se mantuvo a $25 \pm 2^\circ$ C mediante un sistema

de aire acondicionado.

Por otra parte, los cultivos en suspensión se incubaron en una agitadora rotatoria (New Brunswick Scientific Co., Inc. modelo G53) a una velocidad de 80 rpm con una amplitud de giro de 2 pulgadas. La temperatura se mantuvo a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ mediante un sistema de aire acondicionado y la intensidad luminosa empleada fué de 5000 lux.

4. Desinfestación de la semilla.

Las semillas fueron sometidas también a diversos pretratamientos antes y durante su desinfestación con el fin de acondicionarlas para aumentar el número de plántulas y que estas se obtuvieran en menor tiempo con respecto a aquellas obtenidas sin estos pretratamientos.

Estos tratamientos fueron:

- i) Remojo de la semilla en agua destilada a dos diferentes tiempos de 1 h y 5 d.
- ii) Tratamiento de la semilla en una solución de H_2SO_4 1M y 0.5M durante 5 minutos.
- iii) Desinfestación de la semilla en hipoclorito de sodio 1% v/v durante 10, 15 y 20 minutos.

El procedimiento general para desinfestar las semillas de Capsicum se describe en la figura 3.

5. Cinéticas de crecimiento de callos

- a) HIPOCOTILO-CALLO: los fragmentos para la obtención de callos fueron obtenidos del hipocotilo de las plántulas que germinaron in vitro y se pesaron en una balanza analítica (Bosch-S200). Las cinéticas de

crecimiento se evaluaron mediante la determinación del peso fresco y peso seco del callo formado.

Peso fresco.- Se evaluó cada semana el incremento de peso de nueve fragmentos de hipocotilo colocando cada uno en charolas de aluminio previamente sometidas a peso constante y posteriormente se calculó la media aritmética (\bar{X}) para obtener un dato representativo del callo formado.

Peso seco.- Los callos a los que se les determinó el peso fresco se colocaron en una estufa con vacío (Lab-Line Duo-Vac oven), a una temperatura de 70° C hasta alcanzar peso constante.

- b) CALLO-CALLO: los callos con que se iniciaron éstas cinéticas procedieron de las que se habían inducido previamente IN VITRO. Se colocaron aproximadamente 1-2 gr de callo en frascos de cultivo y se determinó cada semana, por triplicado, su peso fresco.

El crecimiento celular se evaluó como velocidad específica de crecimiento (μ) en la fase logarítmica la cual es expresada mediante la siguiente ecuación (Aiba, 1973):

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$$

donde:

X = crecimiento expresado en gramos.

t = tiempo.

A su vez, la μ esta relacionada con el tiempo de duplicación de la masa (t_d) que se expresa mediante la ecuación:

$$t_d = 0.693 / \mu$$

Para medir la μ de los callos se empleó el método gráfico, graficando los logaritmos de los valores obtenidos de peso contra tiempo obteniendo la linealización de la fase exponencial donde el valor de la pendiente (m) corresponde a μ .

6. Establecimiento del cultivo en suspensión.

Los cultivos en suspensión se iniciaron colocando aproximadamente 2 g de callo peso fresco en matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad con 50 ml de medio de cultivo, manteniéndolos en agitación rotativa (80 rpm) y llevando a cabo resiembras cada 15 a 20 días.

6.1. Cinéticas de crecimiento en suspensión.

Primeramente se seleccionó un tamaño de inóculo con el cual se obtendría un crecimiento rápido y en menor tiempo. Así, las cinéticas se efectuaron por duplicado o triplicado en matraces Erlenmeyer de 125 ml de capacidad con 25 ml de medio de cultivo y 10 ml de inóculo de 10 a 15 días de edad. La toma de muestra se hizo cada tres o cinco días según se observara el crecimiento celular.

El crecimiento celular se evaluó mediante la determinación de peso seco.

Peso seco.- El contenido de cada matraz se pasó a través de un papel filtro (Whatman no.1) de peso conocido colocado en un embudo Buchner y conectado a una línea de vacío. Las células

colectadas se lavaron con agua desionizada y se colocaron en una estufa con vacío (Lab-Line Duo-vac oven, Lab-Line Instruments, Inc.) a una temperatura de 70° C hasta alcanzar peso constante.

7. Evaluación del contenido de capsaicinoides.

7.1. Extracción de capsaicinoides.

a) Fruto: a los frutos recolectados se les extrajeron las semillas y se colocaron en una estufa de tiro forzado (Robertshaw Controls Co.) para secarlos a una temperatura de 40 a 50 C. Posteriormente, los frutos ya secos se pulverizaron y se procedió a hacer la extracción de acuerdo al procedimiento descrito en la figura 4.

b) Callo: a los callos obtenidos en las diferentes cinéticas se les aplicó el mismo procedimiento de extracción descrito en la figura 4.

c) Medio semisólido: la extracción se hizo en los medios donde se encontraban los callos de las cinéticas. El medio semisólido se fundió en una placa de calentamiento (Stir Plate 1000 Thermolyne Co.) y se homogenizó con un agitador magnético dejando solidificar nuevamente. Para la extracción de capsaicinoides se emplearon 3 g de medio de cultivo homogenizado empleando el procedimiento de la figura 4.

d) Medios en suspensión: el medio de cultivo libre de células se sometió a extracción (3x) con cloroformo. El extracto obtenido se secó en baño María a una temperatura de 55-60° C.

7.2. Cuantificación de capsaicinoides.

A las muestras de frutos y callos se les cuantificó el contenido de capsaicinoides mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC), empleando para ello un cromatógrafo (marca Tracor) bajo las siguientes condiciones de trabajo: columna Supelcosil-C18; fase móvil metanol/agua (60:40 v/v) + 0.05 M de AgNO_3 con un flujo de 1 ml/min, así como un detector de luz ultravioleta a 280 nm e inyectando un volumen de muestra de 10 μl (Tapia 1987).

Para los cultivos en suspensión, la cuantificación se hizo aplicando el método colorimétrico propuesto por Bajaj en 1980.

Las muestras secas que fueron extraídas con cloroformo se redisolviéron en acetato de etilo (2ml), se agitaron y se separaron dos muestras de 1 ml cada una en tubos de ensayo y nuevamente se evaporó el solvente. A continuación se les adicionó a los tubos 1 ml de agua desionizada, 2 ml de HCl 0.5 M y 1 ml de solución de NaNO_2 0.5 M y Na_2MoO_4 0.025 M. De acuerdo a este procedimiento el nitrito de sodio en presencia de molibdeno como catalizador reacciona con la capsaicina bajo condiciones ácidas, produciendo un compuesto de color amarillo el cual se intensifica adicionándole 2 ml de NaOH 1 N. Las lecturas de absorbancia se efectuaron contra un blanco en un espectrofotómetro (Perkin-Elmer 35) a una longitud de onda de 430 nm. Los datos obtenidos se interpolaron en una curva patrón de capsaicina elaborada con capsaicina (8-metil-n-vainillyl-6-nonenamide) obtenida de Sigma Chemical Co. (Apéndice 1).

8. Evaluación del consumo de nutrientes.

En los cultivos en suspensión se evaluó el consumo de nutrientes, específicamente fosfatos, carbohidratos (sacarosa), amonio y nitratos, de acuerdo a los métodos descritos a continuación.

CARBOHIDRATOS: Según el método propuesto por Loewus (1952). Se tomó una alícuota de 5 μ l de medio de cultivo y se llevó a un volumen de 2 ml con agua desionizada, posteriormente se adicionaron 0.5 ml de solución de antrona al 2% y 5 ml de H_2SO_4 concentrado agitando vigorosamente. De esta forma se hidrolizan los polisacáridos formando furfurales de los monosacáridos e hidroximetil furfurales de las hexosas, los cuales en presencia de una amina aromática producen compuestos coloreados. Todos los carbohidratos excepto los aminoazúcares dan productos coloreados. Posteriormente la muestra se leyó en un espectrofotómetro (Perkin-Elmer 35) a una longitud de onda de 620 nm y se calculó la concentración de azúcares interpolando los datos obtenidos en una curva de calibración de sacarosa (Merck). (Apéndice 2).

FOSFATOS: De acuerdo al método propuesto por Lindberg y Ernest en 1957, a 1 ml de medio de cultivo libre de células, se le adicionaron 2 ml de agua destilada, 0.5 ml de H_2SO_4 5 M, 5 ml de la solución de isobutanol-benceno 1:1 y 0.5 ml de molibdato de amonio al 10%. Bajo estas condiciones el ácido fosfomolibdico que se forma en la solución ácida se extrae con la mezcla de isobutanol-benceno. Se agitó la mezcla durante 15" y se observó la formación de 2 fases, se toma 1 ml de la fase orgánica y se aforó a un volumen de 5 ml con una solución etanólica de H_2SO_4 al (3:2). Para desarrollar el color se adicionaron 0.5 ml de una

solución de $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ al 10% en HCl concentrado y se hizo la lectura en un espectrofotómetro (Perkin-Elmer 35) a una longitud de onda de 724 nm. La curva patrón se elaboró con una solución de KH_2PO_4 (100 $\mu\text{g/ml}$). (Apéndice 3).

AMONIO Y NITRATOS: Para la determinación de estos compuestos se tomó una alícuota de 2 ml de medio de cultivo sin células y se colocaron en un matraz balón de 100 ml, adicionando 8 ml de agua desionizada y 200 mg de MgO , se procedió a una destilación por arrastre de vapor según el método propuesto por Bremner y Keney (1960). El destilado se recogió en un matraz Erlenmeyer de 50 ml que contenía 5 ml de solución indicadora de ácido bórico hasta alcanzar un volumen final de 30 ml. Este destilado se tituló con una solución de H_2SO_4 0.005 N hasta observar el cambio de color, determinándose la cantidad de amonio existente en el medio de cultivo. Al residuo del matraz de destilación se le adicionaron 200 mg de liga de Devarda y se repitió el procedimiento de destilación y titulación anteriormente descritos evaluándose con la segunda destilación la cantidad de nitratos existentes en el medio de cultivo.

VI. RESULTADOS

Una vez que fueron obtenidos los frutos de las variedades que se emplearon, se realizó la evaluación del contenido de capsaicinoides en los frutos.

Los resultados obtenidos se presentan en el cuadro 5, en la cual se observa que los frutos correspondientes a C. annum var. glabriusculum (chilpay y chiltepin) son los que presentaron mayor contenido de capsaicinoides totales. Para los tres casos, los capsaicinoides que se encontraron en mayor cantidad son capsaicina y dihidrocapsaicina.

Posteriormente, se intentó la germinación "in vitro" de las semillas de las tres variedades con el fin de obtener plántulas que servirían como fuente de material biológico para el establecimiento de callos "in vitro".

En las tablas correspondientes a la germinación (cuadros 6 y 7) de las semillas de las tres variedades, se muestran los porcentajes de germinación obtenidos siguiendo la metodología de la figura 5, así como aplicando diversos tratamientos para mejorar la germinación.

En el cuadro 6 se aprecia que el medio de cultivo en donde se obtuvo una mayor germinación de semillas fué el medio de SH, en el cual, germinaron en mayor proporción el chile de agua y el chiltepin.

Las semillas germinaron en todo el rango de intensidades luminosas examinadas, observándose que las plántulas presentaban diferencias en sus características morfológicas según el rango de luz a que estuvieran expuestas. Las plántulas obtenidas a mayor

intensidad luminosa presentaban un mayor desarrollo foliar, y a su vez presentaban un hipocotilo engrosado, piloso, de color café y un color verde más intenso, con un amplio desarrollo radicular; en cambio, las plántulas obtenidas a una menor intensidad de luz, tenían el hipocotilo más largo, verde y con un solo par de primordios foliares, por lo que éstas últimas fueron las seleccionadas para el establecimiento del cultivo de callos.

Por otra parte, como el porcentaje de germinación de la germinación de las semillas fué muy bajo y por lo tanto, no había suficiente fuente vegetal para intentar los primeros cultivos de callo, se decidió tratar de mejorar la germinación mediante los tratamientos de acondicionamiento descritos en Materiales y Métodos.

En el cuadro 7, se muestran los resultados de dichos experimentos y se puede apreciar que, previo al tratamiento de esterilización, las semillas sometidas a un remojo en solución de H_2SO_4 , incrementaron su porcentaje de germinación en las tres variedades empleadas.

Una vez que se logró incrementar el número de plántulas, se procedió a iniciar los cultivos de tejido calloso, empleando para ello fragmentos del hipocotilo de las plántulas. Se decidió trabajar con esta parte de la planta debido a que en experimentos preliminares se emplearon fragmentos de hoja, hipocotilo, epicotilo y raíz colocados bajo las mismas condiciones de cultivo para seleccionar la parte de la planta que formara callo más friable y en menor tiempo y estos se obtuvieron con segmentos de hipocotilo. Por otra parte, el cuadro 8 muestra los resultados obtenidos en forma cualitativa el efecto de la luz sobre las

características morfológicas de los callos tales como tamaño, color y friabilidad, observándose que las intensidades de luz más adecuadas para el desarrollo de los callos fueron 5400 lux para C. annuum var. annuum (chile de agua) en el medio SH, y 300 lux para los chiles de C. annuum var. glabriusculum (chilpay y chiltepín) en los medios MS y SH respectivamente. Bajo estas condiciones, los callos obtenidos tenían un buen crecimiento, blanquecinos con tonos café muy claros y presentaban un alto grado de disgregabilidad, características de suma importancia para el establecimiento de cultivos en suspensión.

Una vez establecidos los parámetros de fuente de explante e intensidad luminosa para la formación de callos, se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento de callos a partir de explantes en ambos medios de cultivo con el fin de seleccionar a uno de los dos medios de cultivo empleados hasta el momento (figuras 5, 6 y 7).

Con respecto al crecimiento del callo del chile chiltepín (Fig. 5), fué posible observar que, desde el inicio de la cinética hasta el término de la misma, existió un mayor crecimiento en el medio SH.

Este mismo comportamiento se presentó en el medio MS aunque se observó que en este medio el crecimiento para esta variedad fué ligeramente menor, por otro lado, los callos obtenidos en el medio SH presentaron una coloración blanquecina con tonos ligeramente amarillos, además de que fueron fácilmente disgregables, mientras que los callos que se obtuvieron en el medio MS fueron más compactos y se tornaron café oscuro en la

parte final de la cinética.

La fig. 6 permite apreciar el crecimiento de callos del chile chilpay en los medios MS y SH, observándose que en este último existió una fase lag de 14 días mientras que en el primero, el crecimiento celular empezó aproximadamente a los 3 días por lo tanto, en el medio MS fué posible obtener callos en un menor período de tiempo. Además, los callos fueron blancos con tonalidades ligeramente cafés y muy friables mientras que en medio SH tendían a ser más compactos y menos friables presentando una tonalidad café claro.

Por otra parte para el chile de agua, (fig. 7), se pudo apreciar que en el medio MS existe un crecimiento celular activo hasta los 14 días a partir de los cuales se inició la fase de desaceleración, en tanto que en el medio SH a este tiempo las células entraron en su fase de crecimiento exponencial obteniéndose así una mayor cantidad de biomasa a los 28 días. Para este caso, los callos obtenidos en el medio SH a partir de explantes del chile de agua, fueron fácilmente disgregables, además de que presentaron un color blanco durante toda la cinética de crecimiento.

En cada cinética se calcularon los valores de u y t_d . Los resultados se presentan en la cuadro 9 y en base a ellos se decidió seleccionar uno de los medios de cultivo (MS y SH) que permitiera el mejor desarrollo de los callos.

Posteriormente se procedió a realizar una evaluación del contenido de capsaicinoides en los cultivos bajo las condiciones de luz y medio de cultivo ya mencionados anteriormente.

Debido a que los callos que se obtuvieron primeramente fueron

En los cultivos del chile chiltepin, se realizó una cinética preliminar de crecimiento evaluando a su vez la producción de capsaicinoides (fig. 8). Esta cinética se realizó empleando callos de aproximadamente 9 días de edad que se encontraban en su fase de crecimiento exponencial correspondientes a la cuarta resiembra, sin embargo no se observó crecimiento celular pero sí una alta producción de capsaicinoides con un máximo de 1.9 mg capsaicinoides/g de callo.

Posteriormente, se obtuvo el material biológico para realizar las cinéticas correspondientes a las otras dos variedades con los resultados que a continuación se mencionan. El chile chilpay (fig. 9), presenta una $\mu = 0.0509 \text{ días}^{-1}$ y una producción máxima de 1.04 mg capsaicinoides/g de callo después de 21 días de cultivo. Dicha producción empezó desde el inicio del cultivo durante los siguientes siete días, después de los cuales, esta empezó a disminuir y cuando se alcanzó la fase estacionaria ya no se cuantificaron estos metabolitos. En cambio, para la variedad annuum (chile de agua) se obtuvo una $\mu = 0.0954 \text{ días}^{-1}$. Sin embargo no se detectó producción alguna de estos metabolitos.

Por otra parte, se establecieron cultivos en suspensión de C. annum var. glabriusculum (chiltepin y chilpay) realizando resiembras de dichos cultivos cada 15 a 20 días a partir de los cuales se obtuvo el inóculo para iniciar las cinéticas de crecimiento.

Sin embargo no se logró establecer el cultivo en suspensión de C. annum var. annuum (chile de agua) en los medios de cultivo empleados en el presente trabajo.

En dichas cinéticas, se evaluó el crecimiento celular y

producción de capsaicinoides, así como el consumo de nutrientes (fosfatos, carbohidratos, amonio y nitratos).

En la fig. 10a, se muestra el comportamiento de cada uno de estos parámetros para el chile chiltepin, y se puede apreciar que con respecto al crecimiento celular, este llegó a su fase estacionaria después de los 15 días con un crecimiento sigmoideal. Con respecto a la producción de capsaicinoides, esta empezó a los diez días de cultivo que es cuando las células se encontraban en la mitad de su crecimiento exponencial y alcanzaron su producción máxima al término de dicha fase obteniendo una producción de 470 $\mu\text{g/g}$ peso seco/l a los 15 días del cultivo.

En cambio con respecto a los nutrientes, los fosfatos son los que se consumieron en primer término. Los demás mostraron un consumo más lento pero sin llegar a agotarse, en tanto que, al llegar a la corta fase estacionaria empezó a aumentar la cantidad de estos nutrientes en el medio.

El chile chilpay, como se ve en la figura 11, observó el siguiente comportamiento

En un período de tiempo de 24 días, apenas se notó una ligera tendencia a entrar a la fase estacionaria correspondiente a la curva de crecimiento y también se observó una curva diáuxica entre los días 10 y 13 (11a), para esta variedad, la producción de capsaicinoides empezó a partir del octavo día alcanzando una producción máxima de 381.43 $\mu\text{g/g}$ peso seco/l en el décimo sexto día. Respecto a los nutrientes (11 b) como la gráfica anterior, los fosfatos son los que se agotaron antes que los demás. En tanto que los nitratos y amonio se consumieron aparentemente en poca proporción y después de 15 días del cultivo.

Por último, en el cuadro 10 se muestran los resultados obtenidos a lo largo de la parte experimental del presente trabajo. En este se puede observar que los chiles de la var. glaberrimuscuim son los que contienen mayor cantidad de capsaicinoides en el fruto y a su vez presentaron mayor producción IN VITRO tanto en callo como en los cultivos en suspensión. En cambio, para la var. annuum, el contenido de capsaicinoides en fruto fué muy bajo, en tanto que en callo no hubo producción.

VII. D I S C U S I O N

Una vez obtenidos los frutos de las variedades, se procedió a cuantificar el contenido de capsaicinoides en los frutos. Para ello existen, sin embargo, un gran número de técnicas (Iwai y col., 1979; J.C.P.S.S.A.Ch, 1959,; Bajaj, 1980, entre otras) y por lo tanto se tuvo que seleccionar el método apropiado que permitiera hacer esta determinación. Por lo que se siguió la metodología de extracción y cuantificación de capsaicinoides planteada por Tapia (1987) y así se obtuvieron los resultados de la evaluación del contenido de capsaicinoides para los tres tipos de chile mostrados en el cuadro 5, en el cual se puede observar que el chile de agua es el que tuvo un menor contenido de capsaicinoides totales de los cuales, la capsaicina (C) y dihidrocapsaicina (DHC) son los que se encuentran en mayor cantidad con un 59 y 40 % respectivamente, en tanto que la nordihidrocapsaicina (NDC), homocapsaicina (HC) y homodihidrocapsaicina(HDC) no fueron detectados. Con respecto a los chiles chiltepin y chilpay de la var. glabriusculum el contenido de capsaicinoides es mucho mayor y se aprecia que capsaicina se encuentra en un 65 y 61% para cada tipo de chile respectivamente, mientras que la DHC varía de 30 a 31% . A diferencia de la var. annuum, se pudo cuantificar NDC en 3.36 y 7.35% para chiltepin y chilpay respectivamente.

Estos datos concuerdan con lo reportado por Iwai y col. (1977), Fujiwake (1980) y Susuki y col. (1980, 1981a), quienes mencionan que la C y DHC son los componentes del grupo de los capsaicinoides que se encuentran en mayor proporción en C. frutescens.

Es conveniente mencionar que la determinación de capsaicinoides se efectuó solo en pericarpio y placenta de los frutos, ya que de acuerdo a reportes previos (Iwai, 1977; Rowland y col. 1983) en las semillas no ocurre biosíntesis de dichos metabolitos, o si bien existe, ocurre en cantidades poco detectables y no cuantificables. De acuerdo a reportes más recientes (Zamski, 1987) se comprueba dicha hipótesis al detectar que el sitio de biosíntesis ocurre en el retículo endoplásmico de las células del tejido epidérmico de la placenta.

Por otra parte, al comparar los valores obtenidos en este trabajo con las variedades ya mencionadas, con respecto a los reportados en la bibliografía debe tomarse en cuenta que existen varios factores que limitan una comparación directa, tales como la especie o variedad seleccionadas, condiciones de cultivo, método de cuantificación o bien el estado de maduración y condiciones bajo las cuales se llevó a cabo esta. Es importante hacer notar que los frutos empleados en este trabajo se encontraban en diferente estado de maduración, es decir, el chile de agua y el chilpay se encontraban en estado fresco y verde mientras que el chiltepín estaba maduro y seco, siendo estas las formas comunes en que los frutos son consumidos popularmente y que al parecer son las formas en que los frutos son más picantes. De acuerdo a Iwai y col. (1977 y 1979) y Maga (1975) existen variaciones en el contenido de capsaicinoides de los frutos cuando son cosechados y madurados bajo luz continua o si son cosechados después de la floración.

Considerando ahora otro de los aspectos desarrollados en este trabajo, respecto a la germinación "in vitro" de las semillas de

Capsicum es conveniente mencionar que en condiciones naturales la maduración de las semillas incluye el desarrollo de mecanismos internos que controlan el inicio de la germinación de tal manera que esta coincida con períodos del año en que es más probable que se presenten condiciones ambientales favorables para la supervivencia de las plantas. En las semillas de la mayoría de las plantas un método de control es la reducción del contenido de humedad a un nivel inferior al que se requiere para la germinación, pero la mayoría de las semillas recién cosechadas tienen mecanismos adicionales que impiden la germinación aún cuando las condiciones del medio parezcan favorables (Hartman, 1980), mientras que otras semillas pueden germinar ayudadas de otros mecanismos como es el hecho de ser ingeridas por algún organismo, por ejemplo, aves, que dentro del tracto digestivo del animal, la semilla recibe un "preacondicionamiento" el cual le permite, una vez que es desechada al exterior, germinar más fácilmente.

Por otra parte, las semillas de los diferentes chiles empleados en el presente trabajo, presentaron una germinación muy baja "in vitro" (cuadro 6) en los medios de cultivo MS y SH.

Es conveniente recordar que existen diversos factores que afectan la germinación de las semillas y que pueden impedir, en un momento dado que ésta se lleve a cabo (Cronquist, 1977; Hartman, 1980; Cochran, 1943). Dichos factores pueden ser:

a) Impermeabilidad al agua, el cual es un factor de principal importancia en el mantenimiento del letargo de las semillas en especies de ciertas familias como las Solanáceas.

b) Inhibidores químicos, que son producidos durante el desarrollo del fruto y de la semilla y se llegan a acumular en el fruto, las cubiertas de las semillas y el embrión.

c) Presencia de embriones rudimentarios, donde los embriones no se han desarrollado por completo morfológicamente al tiempo de maduración de la semilla.

d) Presencia de embriones latentes que responden al enfriamiento.

e) Edad del fruto de donde se obtienen las semillas.

f) Luz y temperatura inadecuadas.

g) Intercambio de gases entre el embrión y la atmósfera.

h) Restricción de la aireación por las cubiertas de las semillas.

Es probable que los dos primeros factores sean los que mayormente afectan la germinación de las semillas. Pero en general, debido a las limitantes antes señaladas, en algunas ocasiones es necesario aplicar métodos de preacondicionamiento para estimular la germinación, entre estos métodos están el de escarificación con ácido, estimulantes químicos, almacenamiento en seco, remojo-secado-remojo, etc. (Hartman, 1980).

En este caso, se decidió aplicar el primer método, pues por la acción del ácido, se modifica el tegumento de la semilla de tal forma que permite el paso del agua al embrión y estimula la germinación. Esto concuerda con los resultados obtenidos en el cuadro 7 ya que se aprecia que al emplear el método de escarificación por ácido, se obtuvo la mayor cantidad de plántulas.

Otro factor que juega un papel muy importante para el

establecimiento de cultivos "in vitro" (plántulas, callos y células en suspensión) es el efecto de la luz sobre el desarrollo y diferenciación de las plántulas y posteriormente su capacidad para generar callos.

En los resultados obtenidos con plántulas germinadas y crecidas a diferentes intensidades luminosas es evidente que presentaron diferencias morfológicas de acuerdo a la cantidad de luz recibida de tal forma que aquellas que germinaron a mayor intensidad de luz presentaron mayor desarrollo foliar con hipocotilo engrosado, piloso y verde intenso con tonalidades café en su base y amplio desarrollo radicular, en tanto que las plantas obtenidas a baja intensidad de luz, presentaron hipocotilo alargado, verde menos intenso y un solo par de primordios foliares, en tanto que las semillas germinadas en oscuridad, fueron de hipocotilo alargado, incoloro y sin desarrollo foliar.

Como es sabido, la luz tiene un papel muy importante para las plantas o tejidos vegetales en diferentes aspectos como son crecimiento, desarrollo y patrones bioquímicos celulares y dependiendo de la cantidad de luz que reciba la planta, se llevarán a cabo sus procesos metabólicos. Para los cultivos de tejidos vegetales las características de la radiación luminosa que afectan a las plantas en su ambiente natural son las mismas cuando estas crecen IN VITRO y estas características son clasificadas como intensidad de luz, calidad del espectro y periodo de exposición (Staba, 1980). A su vez la intensidad de luz parece afectar el contenido y el tipo de pigmentos, ya que el contenido de clorofila se llega a encontrar en menor cantidad

a baja intensidad luminosa, pero cuando esta aumenta la clorofila disminuye en cantidad manifestandose otros pigmentos accesorios tales como carotenoides, es decir, hay una adaptación cromática (Larcher, 1975) y a esto se puede atribuir la coloración del hipocotilo de las plántulas obtenidas en este trabajo a mayores intensidades de luz.

En los cultivos de plantas "in vitro" las funciones normales de los cloroplastos se ven inhibidas (Maretzki y col., 1974) por lo tanto, es necesario proporcionar fuentes de carbono sustitutos de aquellos carbohidratos que podrían ser generados fotosintéticamente en la planta. En nuestro caso, empleamos sacarosa como fuente de carbono, misma que proporcionaría la energía para el crecimiento de nuestros cultivos. Por otra parte, existen reportes de algunos autores donde se establece que hay una relación entre intensidad de luz proporcionada en el laboratorio y la fuente de carbono suministrada.

En base a la descripción ya mencionada, se seleccionaron las plantas que germinaban a 300 lux, ya que, a comparación de las demás, presentaban un hipocotilo vigoroso y un solo par de primordios foliares para establecer los cultivos de callos en ambos medios y a diferentes intensidades de luz.

Dado que los requerimientos de luz no son iguales para todos los cultivos fué necesario detectar bajo que intensidad luminosa se obtenía un callo friable y de crecimiento rápido en vista de que existe una relación de fitocromo-luz (Staba, 1980; Rojas, 1984) y de acuerdo a la intensidad de luz que reciba el tejido, se incrementa o reduce la síntesis de proteína y la división celular y esto puede influir para que se obtenga un buen

crecimiento del callo.

Esta evaluación se hizo en forma cualitativa y de acuerdo a las características morfológicas del callo antes mencionadas (cuadro 8).

Así, una vez definida la intensidad de luz que favorecía el desarrollo del callo se realizó la cinética de crecimiento para seleccionar el medio que mejor favorecía el crecimiento celular.

Se consideró importante realizar dichas cinéticas de crecimiento, porque la evaluación de μ (velocidad específica de crecimiento) permite conocer un parámetro cualitativo que refleja en general el comportamiento celular, ya sea la velocidad de síntesis celulares, de velocidad de formación de productos y de los efectos del medio ambiente sobre estos parámetros (Quintero, 1981).

De esta manera se obtuvieron las cinéticas de crecimiento de las figuras 5, 6 y 7 que fueron realizadas primeramente para determinar la velocidad de formación de callo a partir de fragmentos de hipocotilo para las tres variedades trabajadas y en dos diferentes medios de cultivo (MS y SH). Las diferencias observadas en el comportamiento de las variedades de C. annuum var. glabriusculum es evidente. El chile chilpay presentó un crecimiento notoriamente superior en ambos medios de cultivo después de 28 días, en tanto que el chile chiltepín en este mismo tiempo estaba prácticamente al final de la fase lag en ambos medios de cultivo, requiriendo un período adicional para observar con claridad la formación de callos. Además de esta diferencia, el medio de cultivo SH en el chile chiltepín y el medio MS en el chile chilpay favorecieron la formación de callos y sus

características de disgregabilidad al final de los períodos de cultivo examinados, 42 y 28 días respectivamente.

Por otra parte, con C. annum var. annuum (chile de agua) es clara la formación de callo después de 7 días de cultivo en ambos medios, lo cual supera notablemente a lo obtenido en las variedades C. annum var. glabriusculum y después de 28 días de cultivo la cantidad de tejido calloso fué la mayor de las tres variedades examinadas, sobre todo en el medio SH. Esto fué aún más evidente debido a que en los callos de esta variedad el contenido de agua fué mayor, como lo indican las diferencias entre los valores de peso fresco y peso seco de la figura 7, lo cual da lugar a callos de gran tamaño.

Esto se puede atribuir a que llega el momento en que las células disminuyen su velocidad de crecimiento y empieza una fase de expansión celular, misma que puede estar dada por la absorción de agua (Stafford y col. 1986) lo que hace que las células empiecen a aumentar de volumen y disminuya su velocidad de división celular.

Es claro que existe diferencia en cuanto a la selectividad del medio de cultivo para chiltepín y chilpay, pues a pesar de pertenecer ambos a la var. glabriusculum cada uno presentó un mejor crecimiento en diferente medio de cultivo. Esto se podría atribuir en cierta forma a las condiciones naturales bajo las cuales estas variedades crecen en sus lugares de origen (no hay que olvidar que el chiltepín fué obtenido de Hermosillo, Son. y el chilpay de Oaxaca) y que en ambos lugares, las condiciones climáticas y los tipos de suelos son diferentes, por lo que quizá las células tiendan a presentar una cierta afinidad por un medio

determinado.

Por otro lado, el hecho de que los callos de una misma variedad presenten diferencias morfológicas en los dos medios de cultivo empleados, se puede atribuir quizá a la diferencia en la concentración de nutrientes y de hormona, pues en base de resultados obtenidos por Ramos (1988), manipulando la especie C. pubescens se puede obtener un comportamiento diferente de los cultivos si se disminuye o aumenta la concentración de hormonas, mismo que se refleja en un crecimiento más rápido o más lento con el subsecuente cambio en el contenido de biomasa.

Una vez establecido todo lo anterior se procedió a evaluar la capacidad de biosíntesis de capsaicinoides de los cultivos de callos de Capsicum, empleando los medios de cultivo que se encontraron satisfactorios para su crecimiento, para chiltepin y chile agua el medio SH y para chilpay el medio MS.

Es conveniente mencionar que hasta el momento no se ha encontrado en la literatura ningún reporte en donde se haga mención del comportamiento de las cinéticas de crecimiento y su producción de capsaicinoides a partir de callo de Capsicum.

Como se mencionó en la sección de resultados, los primeros callos obtenidos fueron los del chile chiltepin (figura 8) con los cuales se realizó una cinética en la cual no se observó ningún crecimiento celular en los callos, sin embargo la producción de capsaicinoides totales fué significativamente alta. Esto probablemente puede atribuirse a que la formación de protefna e inducción de crecimiento celular del callo, se vió inhibida por algún factor originando con ello entre otros efectos

no cuantificados un incremento en la biosíntesis de capsaicinoides. Esto concuerda con lo propuesto por Yeoman (1980) acerca de la existencia de una relación inversamente proporcional entre la división y crecimiento celular y la producción de metabolitos secundarios.

Por otra parte, en el chile chilpay (figura 9) la biosíntesis de capsaicinoides tuvo el valor máximo de producción cuando las células se encuentran en fase exponencial de crecimiento aunque esto no concuerda con lo propuesto por Yeoman (1980). Sin embargo de acuerdo a lo planteado por Stafford y col. (1986) en algunos sistemas, el crecimiento y la síntesis del producto no son mutuamente exclusivos y la síntesis puede ocurrir durante la fase de crecimiento; sin embargo, hasta el momento, no hay trabajos específicos acerca de la producción de capsaicinoides a nivel de callo, sino que solo se emplea este como un paso intermedio para pasar al establecimiento de cultivos en suspensión y estos últimos no nos aportan datos suficientes para permitirnos dar una explicación correcta de lo obtenido.

Para el chile de agua, en cambio, sólo se observó crecimiento celular y no biosíntesis de capsaicinoides, probablemente debido a la rápida velocidad de crecimiento que presenta el callo, además de que en el fruto se cuantificó una cantidad muy pequeña de capsaicinoides, lo cual nos da una idea de que por naturaleza, esta variedad no llega a producir estos compuestos en grandes cantidades.

Otro aspecto importante de establecer es si la biosíntesis de capsaicinoides por el cultivo de callos sufre algún cambio cuando el sistema de cultivo empleado es el de células en suspensión,

además que este sistema tiene la ventaja potencial que permite manipular las células, nutrientes, hormonas y medio ambiente en forma semejante a como se lleva a cabo en la producción de metabolitos secundarios de microorganismos. Con estos últimos generalmente se pretende primeramente inducir la biosíntesis de biomasa y posteriormente optimizar las condiciones que favorecen la producción de metabolitos secundarios.

En este caso particular, se pretende establecer los cultivos en suspensión de las células de Capsicum y en estos cuantificar la producción de capsaicinoides de tal manera que en estudios posteriores se trate de incrementar su producción.

Por otra parte, como se mencionó en un principio, los nutrientes desempeñan un papel importante tanto para el crecimiento celular como para la producción de capsaicinoides. De tal forma que los mecanismos de consumo de nutrientes por células vegetales, tienen importantes consecuencias sobre la velocidad de crecimiento y productividad celular (Staba, 1980). Así la velocidad de crecimiento puede ser independiente de la concentración de nutrientes, mientras que la productividad final puede ser dependiente de la cantidad de nutrientes suministrados y a su vez, muy pocos de ellos pueden encontrarse en el medio después del crecimiento.

Existen trabajos acerca de los efectos del suministro de nutrientes sobre la síntesis y acumulación de metabolitos secundarios, donde el efecto de los nutrientes ha sido asociado con una alteración en la velocidad de crecimiento de las células cultivadas, aunque los mecanismos de regulación no sean aún claros (Lindsey, 1985).

En forma particular, se tienen reportes acerca de la influencia de fosfatos, nitratos y amonio (Lindsey, 1985; Hahlbrock, 1974) y carbohidratos como sacarosa (Mizukami, 1977; Fowler, 1978), específicamente, sobre el crecimiento y productividad del cultivo "in vitro" de especies como C. annuum, Catharantus roseus entre otros, por lo tanto se consideró conveniente determinar el contenido de estos nutrientes en los medios de cultivo en suspensión.

En la figura 10a se obtuvo una curva de crecimiento completa para chiltepin que duró 24 días, donde el punto máximo de producción es a los 15 días del cultivo, que es cuando las células están en su fase de desaceleración. Con respecto a los nutrientes, como se muestra en la figura 10b, se observó una disminución de estos a lo largo de la cinética hasta llegar al término de la fase exponencial, aunque, cuando empezó la fase de desaceleración se observó un aumento en la concentración de los nutrientes. Esto se debió probablemente a que en dicha fase de crecimiento, empezó a haber lisis celular, lo cual fue verificado por observaciones al microscopio. Sin embargo de estos nutrientes (fosfatos, nitratos, y carbohidratos) los que se agotaron primero que los demás fueron los fosfatos y a su vez, con este dato concuerda el contenido máximo de capsaicinoides producidos en este medio, con una producción máxima de 471.95 mg/g peso seco celular. Nettleship y Slator (1974) sugirieron que los fosfatos controlan la actividad de la fosfatasa, la cual podría hidrolizar los intermediarios activados en la síntesis de aminoácidos y esto podría provocar un aumento en la síntesis de metabolitos secundarios.

En el chile chilpay (figura 11a) el comportamiento fué un tanto diferente, ya que al principio se observó un descenso en el crecimiento celular a los tres días del cultivo, lo cual pudo ser causa del cambio de un medio de cultivo agotado de nutrientes a un medio completo, lo que pudo haber provocado estrés en las células manifestándose esta como lisis celular, liberando al medio nutrientes que tenían almacenados en su interior, lo que puede ser comparado con la figura 11b con el aumento que presentaron los nutrientes examinados, posteriormente, las células presentaron un crecimiento diauxico con una ligera disminución a los 13 y 15 días del cultivo volviendo a su fase de crecimiento exponencial. Con respecto a la producción de capsaicinoides en esta misma gráfica, se puede observar que se empezaron a producir a los 7 días del cultivo, alcanzando su máxima producción a los 16 días del cultivo. Si observamos la figura 11b, observamos que a medida que los cultivos fueron creciendo, los nutrientes empezaron a disminuir aunque nuevamente, los fosfatos se agotaron totalmente a los 10 días del cultivo.

La producción de capsaicinoides para esta variedad, coincidió con lo mencionado por Stafford y col. (1986) acerca de que la inducción del producto ocurre debido a la limitación de nutrientes de tal forma que cuando los cultivos se encuentran en su fase de crecimiento exponencial no hay acumulación del producto, sin embargo, cuando el crecimiento empieza a disminuir hay una tendencia a acumular los metabolitos secundarios que las células están produciendo, debido probablemente a la limitación de algunos nutrientes del medio.

Como se observa, en las figuras 9, 10 y 11, se puede apreciar que llega un momento en que los capsaicinoides no se detectan en el medio. En este caso, Lindsey y Yeoman (1984) proponen que las fluctuaciones en los niveles de capsaicina deben probablemente a que en un principio, debido a las condiciones de cultivo hay una liberación rápida en el medio de estos metabolitos, ya que altas concentraciones de capsaicina no se acumulan intracelularmente. Cuando la producción de capsaicina no se efectúa durante un período de tiempo quizá es debido a que hay una inhibición por retroalimentación de su síntesis, lo que hace que las células disminuyan su capacidad biosintética al menos durante un período de tiempo corto.

Lindsey, en 1985, propone que el efecto de los nutrientes sobre la actividad metabólica secundaria puede actuar en gran parte para alterar la actividad de las vías metabólicas primarias. Desde el punto de vista práctico, la manipulación de los nutrientes esenciales permitiría hacer variar la velocidad de división celular y los procesos metabólicos asociados en los cultivos celulares que podrían permitir emplear técnicas para la producción en gran escala de metabolitos secundarios de gran importancia. es por esto que sería conveniente, en estudios posteriores, realizar una manipulación del medio de tal forma que se pueda incrementar la producción de dichos metabolitos.

VIII. C O N C L U S I O N E S

- Debido a las condiciones fisiológicas de las semillas de Capsicum, fué necesario someter a las semillas a un preacondicionamiento de tipo químico para incrementar el porcentaje de germinación. El remojo en H₂SO₄ durante 5 minutos, fué el método apropiado para ello.
- Los callos de C. annum var. glabriusculum fueron disgregables cuando se empleó una intensidad luminosa de 300 lux, mientras que los de C. annum var. annuum requirieron de 5400 lux.
- El desarrollo de callos a partir de explante fué mejor en medio SH para chile chiltepin y chile de agua en tanto que el medio MS lo fué para los callos del chile chilpay.
- La producción de capsaicinoides por callos y células en suspensión de las variedades de C. annum examinadas, no presenta un patrón que lo ligue a alguna etapa específica de crecimiento, además, estos metabolitos aparentemente no son estables o al menos sufren una modificación que impide detectarlos por los métodos empleados.
- Los capsaicinoides que se encontraron en mayor cantidad en los frutos de los diferentes tipos de chile fueron capsaicina, dihidrocapsaicina y en menor proporción nordihidrocapsaicina.
- En callo se presentaron en mayor proporción capsaicina, nordihidrocapsaicina y en menor cantidad dihidrocapsaicina,

mientras que en los cultivos en suspensión los únicos componentes fueron capsaicina y dihidrocapsaicina.

- En los cultivos en suspensión, el consumo de nutrientes como los fosfatos parecería tener una cierta relación con la producción de capsaicinoides, aunque también la disminución en el contenido de nitratos y amonio en los medios de cultivo, podrían indicar que estos podrían ser nutrientes limitantes que estimularan la biosíntesis de estos metabolitos.

CUADRO 1. CLASIFICACION BOTANICA DE LA PLANTA DE
C a p s i c u m

DIVISION:	Spermatophyta
SUBDIVISION:	Angiospermae
CLASE:	Dicotyledoneae
ORDEN:	Tubiflorae
FAMILIA:	Solanaceae
GENERO:	<u>Capsicum</u>

FUENTE: Sánchez, S. (1979).

CUADRO 2. PRINCIPALES REGIONES PRODUCTORAS DE CHILE Y AREA SEMBRADA

REGION	TOTAL (Ha)	AREA (Ha)	PRINCIPALES TIPOS DE CHILE*
GOLFO	12 900		jalapeños y serranos.
Veracruz		10 400	
Tamaulipas (Sur)		2 500	
BAJIO	12 260		anchos, pasillas mulatos
Guanajuato		6 240	
Aguascalientes		3 100	
Jalisco		2 920	
MESA CENTRAL	6 530		poblanos, miahuatecos, serranos carricillos
Puebla		3 330	
Hidalgo		3 200	
PACIFICO NORTE	13 500		bell, anaheim, caribe, fresno, serrano y ancho
Sinaloa		7 500	
Nayarit		3 800	
Sonora y B.C. Norte		2 200	
NORTE	29 100		mirasol, ancho jalapeño
Zacatecas		16 600	
Durango		3 000	
San Luis Potosí		6 500	
Chihuahua		2 000	
SUR	7 200		jalapeño, costero habanero
Guerrero		2 000	
Yucatán		700	
Oaxaca		4 200	
TOTAL	81 490		

FUENTE; SARH-INIA, (1982).

*: Nombre común.

CUADRO 3. COMPONENTES PRINCIPALES DE LOS FRUTOS DE
C a p s i c u m

-
- . Aceites fijos
 - . Aceites volátiles
 - . Pigmentos: capsantina, capsorubina, B-carotenos, etc.
 - . Principio picante: capsaicinoides
 - . Resinas
 - . Celulosas
 - . Pentosas
 - . Protefnas
 - . Elementos minerales
-

FUENTE: Purseglove y col.(1981).

CUADRO 4. COMPOSICION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO DE MURASHIGE & SKOOG Y SHENCK & HILDEBRANDT.

CONSTITUYENTE	MOLARIDAD EN EL MEDIO (moles)	
	MS	SH
MACRONUTRIENTES		
KNO ₃	1.8×10^{-2}	2.5×10^{-2}
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1.5×10^{-2}	1.5×10^{-2}
NH ₄ H ₂ PO ₄	—	2.5×10^{-2}
CaCl ₂ · 2H ₂ O	3.00×10^{-2}	2.5×10^{-2}
NH ₄ NO ₃	2.06×10^{-2}	—
MICRONUTRIENTES		
MnSO ₄ · 4 H ₂ O	9.99×10^{-5}	5.9×10^{-5}
H ₃ BO ₃	1.00×10^{-5}	1.3×10^{-5}
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	2.99×10^{-6}	0.35×10^{-6}
KI	5.00×10^{-7}	6.0×10^{-7}
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1.00×10^{-6}	8.0×10^{-6}
Na MoO ₄ · 2H ₂ O	1.00×10^{-7}	0.41×10^{-7}
CoCl ₂ · 6H ₂ O	1.00×10^{-7}	4.2×10^{-7}
FUENTE DE FIERRO		
FeSO ₄ · 7H ₂ O	1.00×10^{-4}	0.54×10^{-4}
Na EDTA	1.00×10^{-4}	0.54×10^{-4}
SUPLEMENTO ORGANICO		
Tiamina-HCl	3.00×10^{-5}	1.5×10^{-5}
Acido nicotínico	4.66×10^{-6}	41.0×10^{-6}
Piridoxina-HCl	2.40×10^{-6}	2.4×10^{-6}
Mio-inositol	4.90×10^{-4}	56.0×10^{-4}
FUENTE DE CARBONO		
Sacarosa	8.80×10^{-2}	8.8×10^{-2}

FUENTE: Dixon, (1985).

CUADRO 5. EVALUACION* DEL CONTENIDO DE CAPSAICINOIDES
EN FRUTOS DE C. annuum

MUESTRA	C	NDC	HC	DHC	HDC	TOTAL
	mg/g peso seco					
<u>C. annuum</u> <u>var. annuum</u> (chile de agua).	1.072 (59.48)	nd -	nd -	0.73 (40.5)	nd -	1.802 (100)
<u>C. annuum var.</u> <u>glabriusculum</u> (chiltepin)	7.81 (65.69)	0.40 (3.36)	0.11 (0.92)	3.57 (30)	tr -	11.90 (100)
<u>C. annuum var.</u> <u>glabriusculum</u> (chilpay)	9.14 (61.16)	1.1 (7.35)	tr -	4.70 (31.48)	tr -	14.95 (100)

*:empleando HPLC; nd: no detectado; tr: trazas; C: capsaicina;
NDC: nordihidrocapsaicina; HC: homocapsaicina; DHC:
dihidrocapsaicina; HDC: homodihidrocapsaicina; (): %.

CUADRO 6. PORCENTAJE DE GERMINACION "in vitro" DE SEMILLAS DE
C. annuum.

VARIEDAD	MEDIO DE CULTIVO		INTENSIDAD LUMINICA (Lux)
	SH*	MS**	
<u>C. annuum</u> var. <u>annuum</u> (chile de agua)	11	10	190-8400
<u>C. annuum</u> var. <u>glabriusculum</u> (chiltepin)	15	9	190-8400
<u>C. annuum</u> var. <u>glabriusculum</u> (chilpay)	14	15	190-8400

Temperatura: 25 ± 2° C.

* Shenck & Hildebrandt (1972) sin reguladores de crecimiento.

** Murashige & Skoog (1962) sin reguladores de crecimiento.

CUADRO 7. PORCENTAJE DE GERMINACION* "in vitro" DE SEMILLAS DE C. annuum SOMETIDAS A DIVERSOS TRATAMIENTOS

		V A R I E D A D					
TRATAMIENTO		<u>C. annuum</u> var. <u>annuum</u> (chile de agua)		<u>C. annuum</u> var. <u>glabriusculum</u> (chiltepín)		<u>C. annuum</u> var. <u>glabriusculum</u> (chilpay)	
MEDIO DE CULTIVO		SH	MS	SH	MS	SH	MS
1) Remojo (agua)	1 h	10	10	30	10	30	ng
	5 d	10	ng	33	10	30	10
2) Remojo en hipoclorito (1% v/v)	10"	ng	ng	20	20	20	20
	15"	10	ng	50	45	50	50
	20"	10	ng	60	60	60	60
3) H ₂ SO ₄ (5 min)	0.5 M	57	11	100	80	72	67
	1.0 M	57	18	100	82	75	87

*: Temperatura 25 + 2° C; Intensidad luminosa: 300 lux; ng: no germinó; d: días.
h: horas; M: moles; b: realizado antes de la desinfestación de la semilla.
a: Shenck & Hildebrandt (1972) sin reguladores de crecimiento.
b: Murashige & Skoog (1962) sin reguladores de crecimiento.

CUADRO 8. INDUCCION DE CALLO A PARTIR DE EXPLANTES DE HIPOCOTILO
CON TRES VARIETADES DE *C. annuum* A DIFERENTES
INTENSIDADES LUMINOSAS.

		INTENSIDAD LUMINOSA (lux)									
		90		300		1600		5400		8400	
VARIEDAD	MEDIO DE CULTIVO	SH*	MS**	SH	MS	SH	MS	SH	MS	SH	MS
<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i> (chile de agua)	TAMANO	-	-	+	+	+	+	+++	+	++	++
	COLOR	-	-	blanquecino	blanquecino	blanquecino	blanquecino	café claro	café claro	blanco	verdoso
	FRIABILIDAD	-	-	++	++	+	+	+++	+++	+	+
<i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i> (chiltepin)	TAMANO	-	-	++	+	+	+	+	+	++	+
	COLOR	-	-	café claro	café claro	café claro	café claro	café	café	café	café
	FRIABILIDAD	-	-	+++	+	+	+	+	+	++	++
<i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i> (chilpay)	TAMANO	+	+	++	+++	+	+	+	++	++	+
	COLOR	café claro	café claro	café claro	café claro	café	café	blanquecino	blanquecino	café claro	café claro
	FRIABILIDAD	++	+++	+	+++	+	+	+	++	+++	++

Temperatura: 25 ± 2° C.

*: Shenck & Hildebrandt (1972) + 10⁻⁶ M PCA + 0.5 x 10⁻⁶ M Cinetina + 2.5 x 10⁻⁶ M 2,4-D.

** : Murashige & Skoog (1962) + 12.5 μM 2,4-D.

-, +, ++, +++: Grado de crecimiento o de friabilidad del callo.

CUADRO 9. VALORES DE LA VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO (μ)
Y TIEMPO DE DUPLICACION (td) DE CALLOS A PARTIR DE
HIPOCOTILO DE TRES VARIEDADES DE C. annuum.

VARIEDAD	μ (días) **		td (días)	
	PF ^a	PS ^b	PF	PS
<u>C. annuum</u> var. <u>annuum</u> (chile de agua)	MS* 0.1397 SH** 0.1917	0.2191 0.1701	4.9616 3.6157	3.1636 4.0749
<u>C. annuum</u> var. <u>glabriusculum</u> (chilpay)	MS 0.1400 SH 0.1346	0.0914 0.0900	4.9510 5.1496	7.5836 7.7016
<u>C. annuum</u> var. <u>glabriusculum</u> (chiltepín)	MS 0.0980 SH 0.1212	0.0740 0.1180	7.0729 5.7190	9.3668 5.8741

* : Murashige & Skoog (1962) + 12.5 μ M de 2,4-D.

** : Shenck & Hildebrandt (1972) + 10⁻⁵ M PCA + 0.5 x 10⁻⁶ M Cinetina + 2.5 x 10⁻⁶ M de 2,4-D.

a : μ considerando peso fresco.

b : μ considerando el peso seco.

CUADRO 10. TABLA COMPARATIVA DEL CONTENIDO DE CAPSAICINOIDES EN FRUTO,
CALLOS Y CULTIVO EN SUSPENSION DE C. annuum.

VARIEDAD	capsaicinoides		
	FRUTOS (mg/g p.s.)	CALLO (mg/g p.f.)	CULTIVO EN SUSPENSION* (mg/g p.s.)
<u>C. annuum</u> var. <u>annuum</u> (chile de agua)	1.8	0	ne
<u>C. annuum</u> var. <u>glabriusculum</u> (chiltepín)	11.9	1.94	0.47
<u>C. annuum</u> var. <u>glabriusculum</u> (chilpay)	14.9	1.06	0.38

* : Obtenidos en matraces de 125 ml con 25 ml de medio de cultivo.
a : Medio Shenck & Hildebrandt + 10^{-5} M PCA + 0.5×10^{-6} M Cinetina +
 2.5×10^{-6} M 2,4-D.
b : Medio Murashige & Skoog + $12.5 \mu\text{M}$ de 2,4-D.
ne : No establecido.

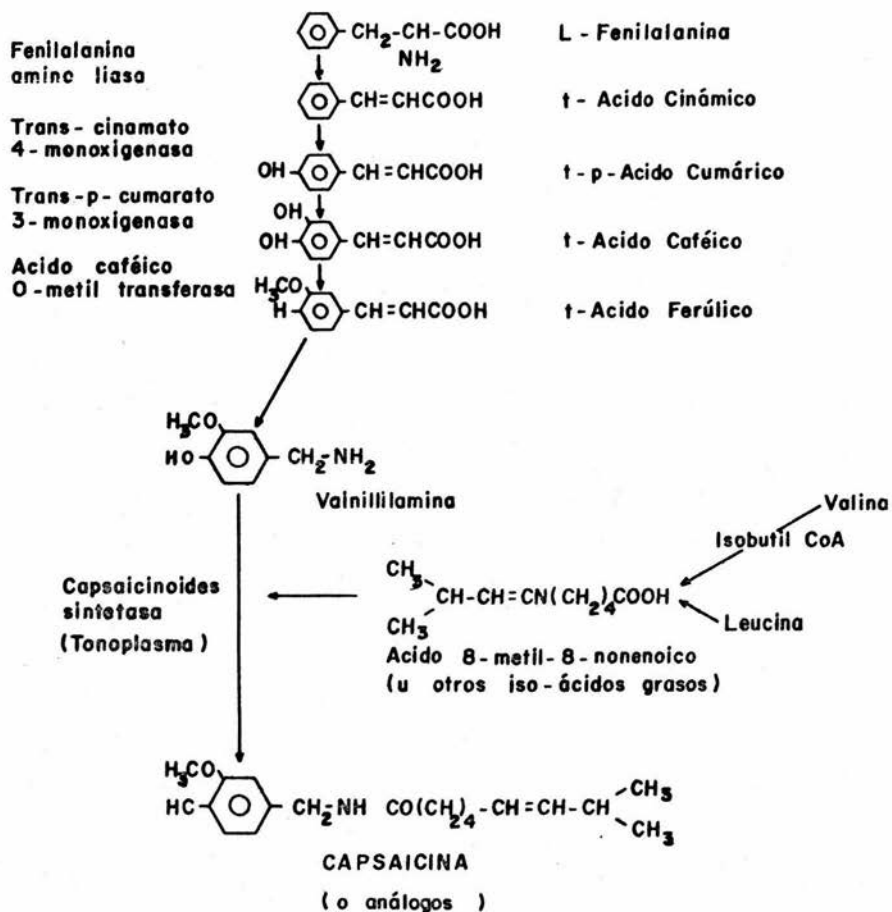
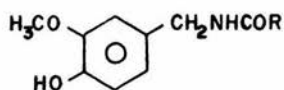


Fig. 1 Vía propuesta de la Biosíntesis de Vainillilamina y Capsaicinoides .

Fujiwake, H. y col. (1962) .



R	GRUPO ACILO	NOMBRE	GRUPO DE CAPSAICINOIDES
$\begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{CHCH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4 \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array}$ -	iso-C _{10:1}	capsaicina (CAP)	1
$\begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{CH}(\text{CH}_2)_6 \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array}$ -	iso-C _{10:0}	dihidrocapsaicina (DC)	1
$\begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{CH}(\text{CH}_2)_5 \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array}$ -	iso-C _{9:0}	nordihidrocapsaicina (NDC)	2
$\begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{CHCH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_5 \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array}$ -	iso-C _{11:1}	homocapsaicina (HC)	2
$\begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{CH}(\text{CH}_2)_7 \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array}$ -	iso-C _{11:0}	homodihidrocapsaicina (HDC)	2

Fig.2 Estructura química y nomenclatura de capsaicina y sus análogos. (Susuki, 1981).

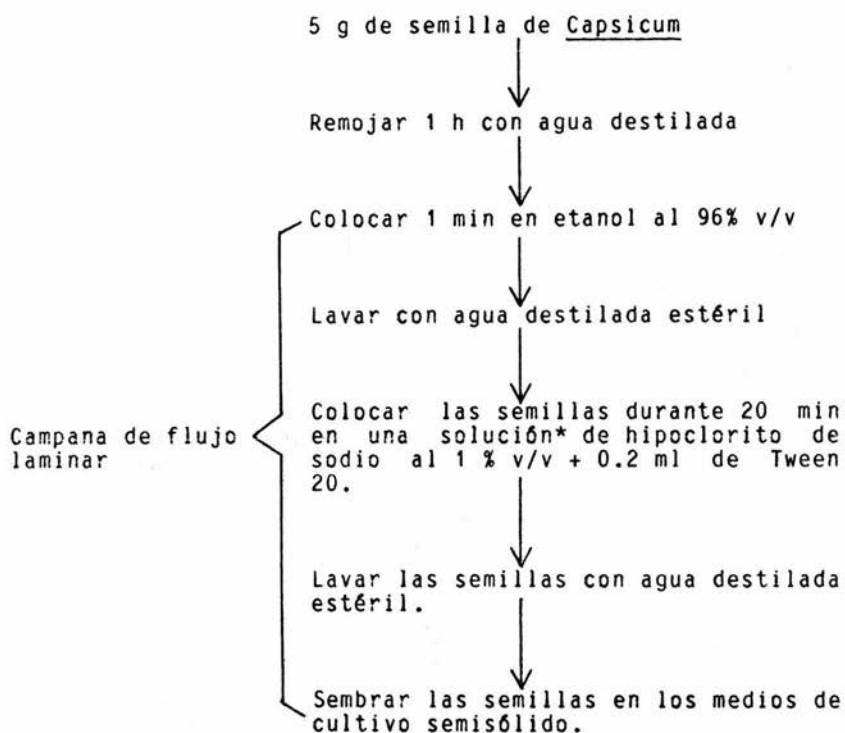


Fig. 3 Método de desinfestación de las semillas de Capsicum (Ochoa, 1986).

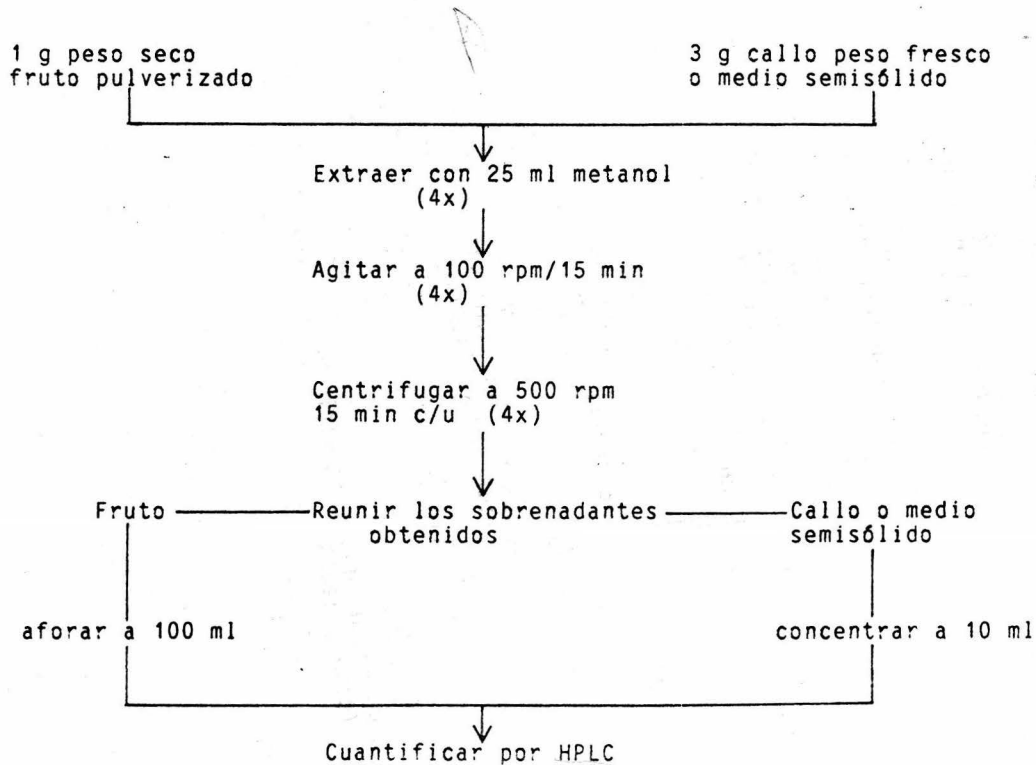


Fig. 4. Diagrama de flujo del método de extracción de capsaicinoides contenidos fruto, callo y medio semisólido de Capsicum annuum según Tapia (1987).

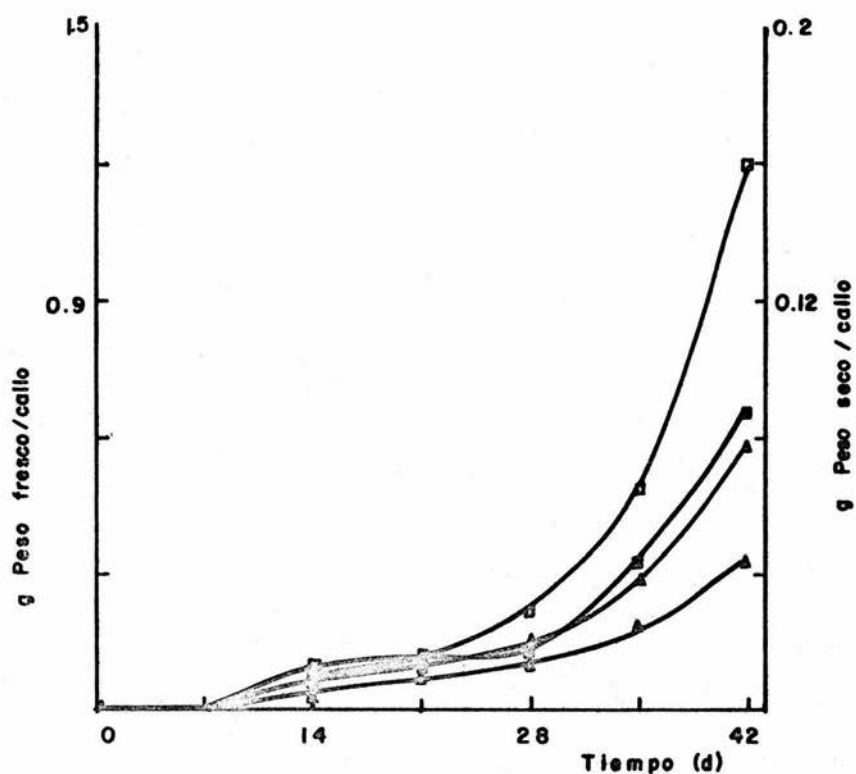


Fig.5 Cinética de crecimiento de callos inducidos a partir de hipocotilo de *C. annuum* var. *glabriusculum* (chiltepín).

▲ Peso fresco MS ▲ Peso seco MS
 ○ Peso fresco SH ■ Peso seco SH

Intensidad luminosa: 300 lux.

Temperatura: $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Los datos representan la media de tres muestras

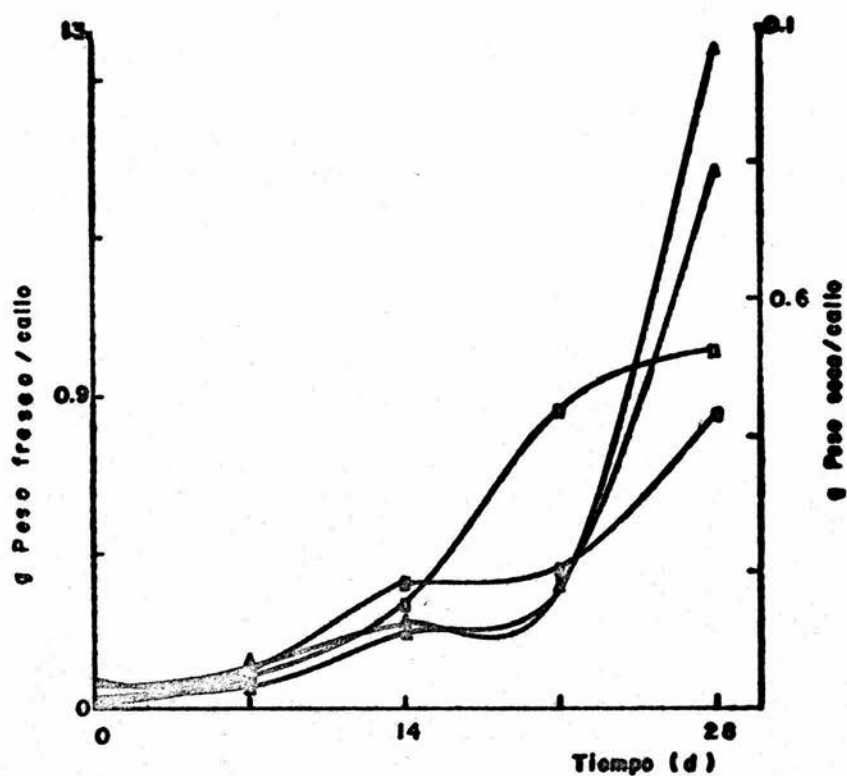


Fig. 6 Cinética de crecimiento de callos inducidos a partir de hipocotilo de C. annuum var. glabriusculum (chilpay).

▲ Peso fresco MS ▲ Peso seco MS
 ■ Peso fresco SH ■ Peso seco SH

Intensidad luminosa : 300 lux

Temperatura : 25±2°C

Los datos representan la media de tres muestras

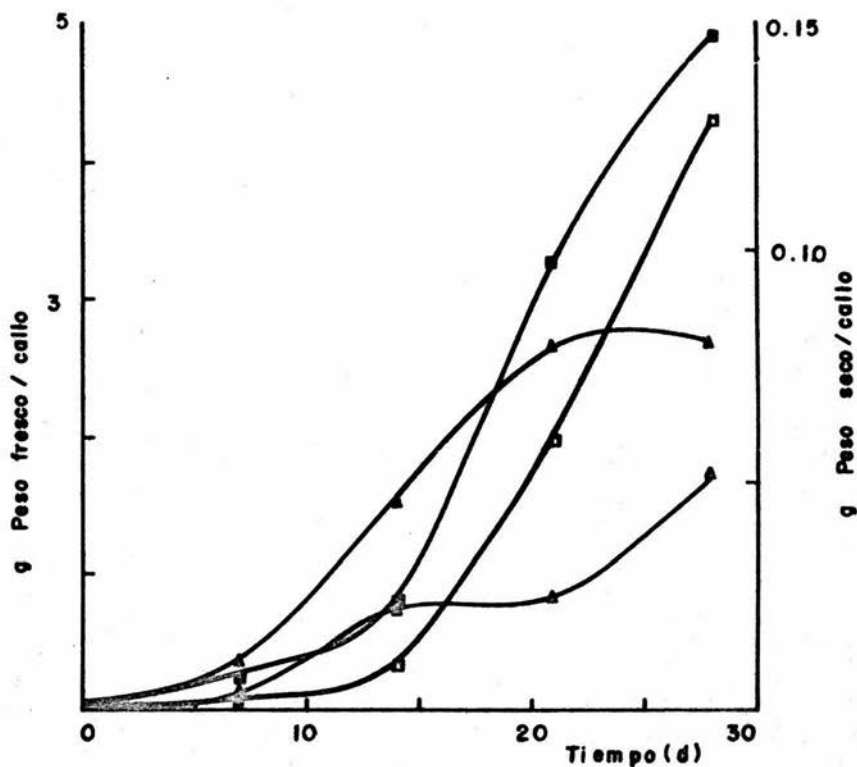


Fig.7 Cinética de crecimiento de callos inducidos a partir de hipocotilo de C. annuum var. annuum (chile de agua)

▲ Peso fresco MS ▲ Peso seco MS
 □ Peso fresco SH ■ Peso seco SH

Intensidad Luminosa : 5400 lux

Temperatura : $25 \pm 2^\circ\text{C}$

Cada dato representa la media de tres muestras

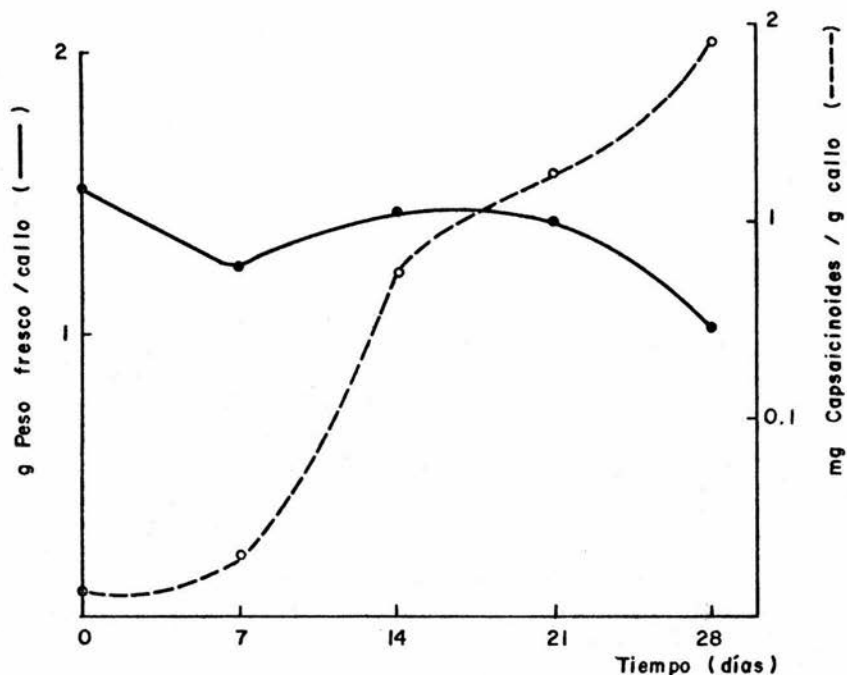


Fig.8 Cinética de Crecimiento y Producción de Capsaicinoides a partir de tejido calloso de C. annuum var, glabriusculum (Chiltepín) en medio SH .
 Intensidad lumínica : 300 lux
 Temperatura : $25 \pm 2^\circ \text{C}$.

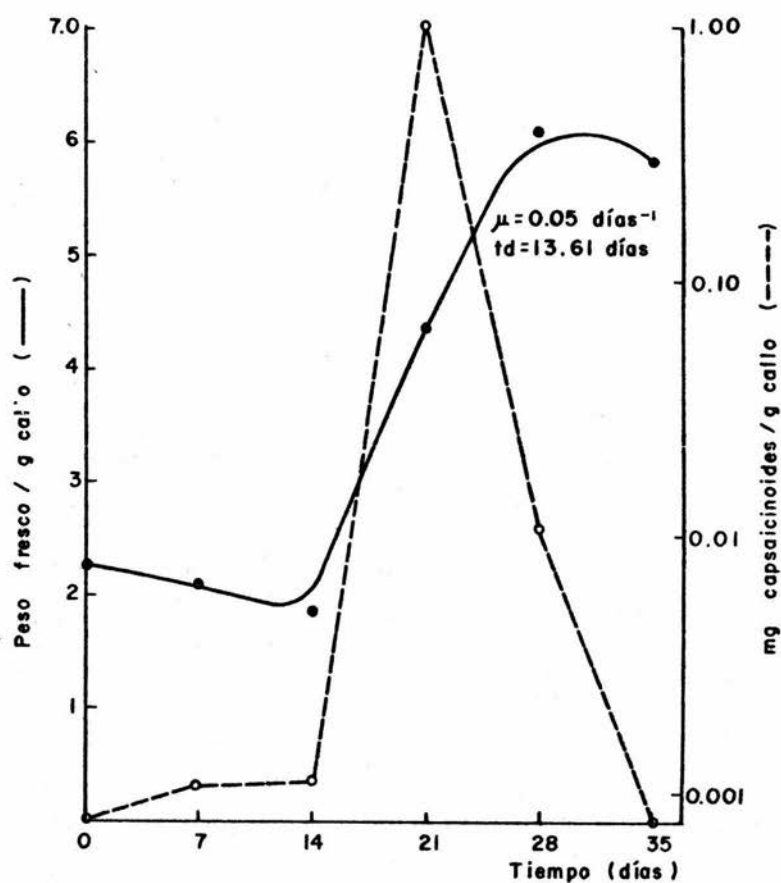


Fig. 9 Cinética de Crecimiento y Producción de Capsaicinoides de callos de *C. annuum* var. *glabriusculum* (Chilpay), en medio MS + 12.5 μ M 2,4 D. Intensidad Lumínica : 300 lux Temperatura : 25 \pm 2° C .

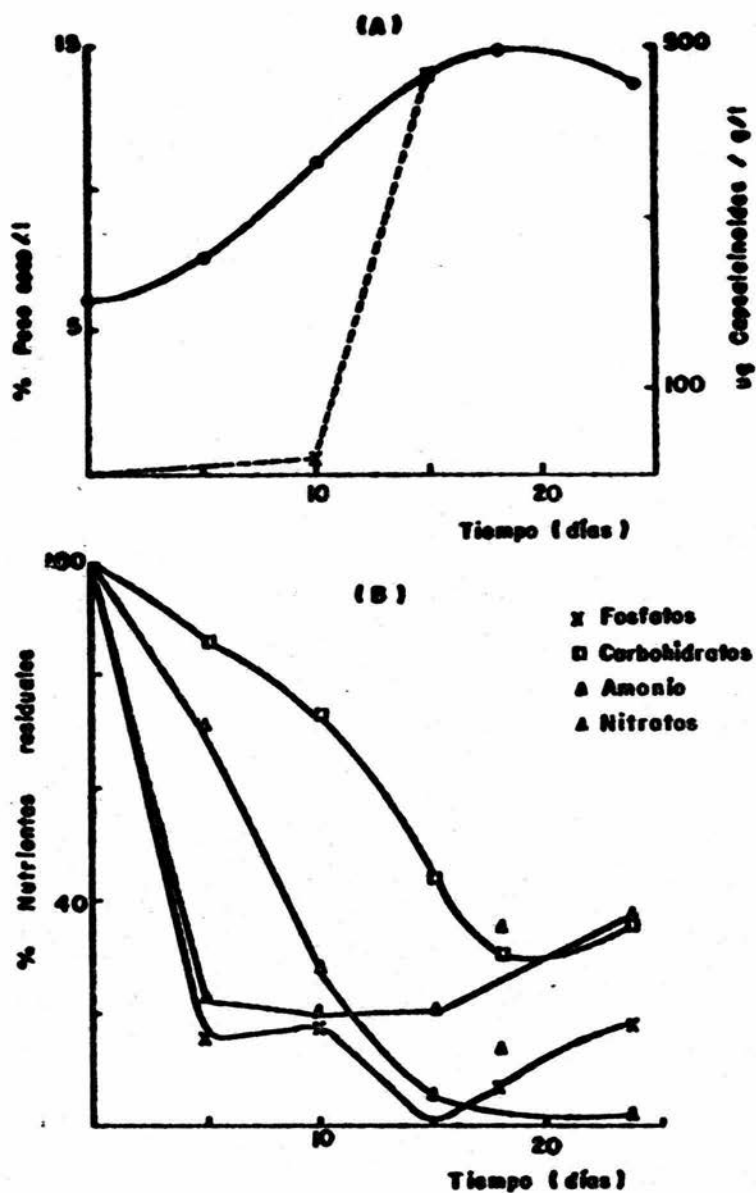


Fig. 10 Cinética de crecimiento y producción (A) y consumo de nutrientes (B) de *C. guzmanii* var. *glabrescens* (chiltepín) en suspensión en el medio SH.

Temperatura : $25 \pm 2^\circ\text{C}$

Agitación : 80 rpm.

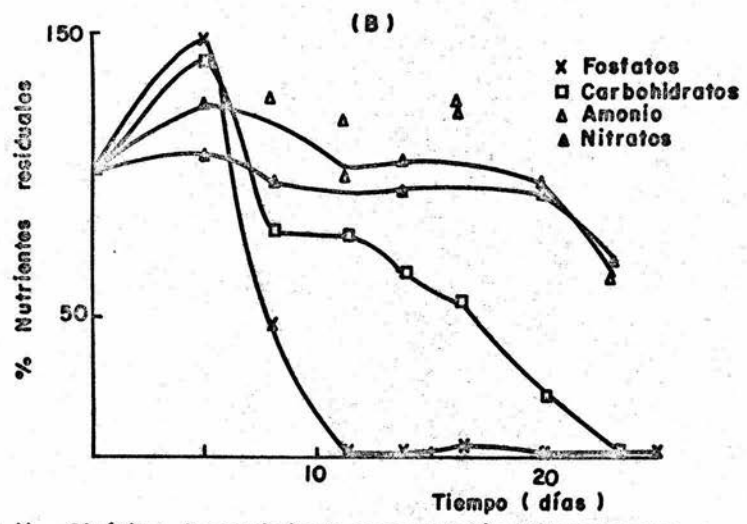
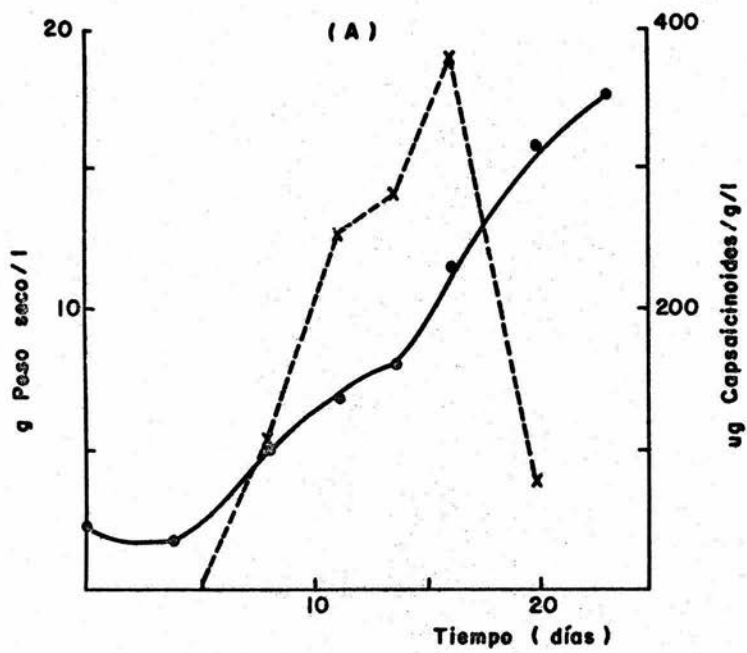


Fig. II Cinética de crecimiento y producción (A) y consumo de nutrientes (B) de *C. annuum* var. *glabriusculum* (chilpay) en suspensión en el medio MS.

Temperatura : 25 ± 2°C

Agitación : 80 rpm.

IX. BIBLIOGRAFIA

- Aiba, A., A.E. Humphrey y N.F. Mills. 1973. Biochemical Engineering. 2nd ed. Academic Press, Inc. New York.
- Bajaj, K.L. 1980. Colorimetric Determination of Capsaicin in Capsicum Fruits. Assoc. Off. Anal. Chem. 63 (6): 2314-2316.
- Balandrin, F. M., J. A. Klocke, E. S. Wurtele y Wm. H. Bollinger. 1985. Natural Plant Chemicals: Sources of Industrial and Medicinal Materials. Science 228: 1154-1160.
- Bennett, D.J. y G.W. Kirby. 1968. Constitution and Biosynthesis of Capsaicin. J. Chem. Soc. (C): 442-446.
- Bremner, J.M. y Keney. 1960. Magnesium Oxide Devarda Alloy Methods for Soils Extracts. In Methods of Soils Analyst. vol. II (Black, C.A. Ed.). Amer. Soc. of Agronomy Inc. Publishers Madison Wisconsin, U.S.A.
- Cochran, H. L. 1943. Effect of Stage of Fruit Maturity at Time of Harvest and Method of Drying on the Germination of Pimiento Seed. Proc. Am. Soc. Hort. Sci. (43): 229-239.
- Crombie, L.; S.H. Dandegaonker y K.B. Simpson. 1955. Amides of vegetable origen. Part VI. Synthesis of Capsaicin. J. Chem. Soc.: 1025.
- Cronquist, A. 1977. Introducción a la Botánica. Compañía Editorial Continental, S.A. México.
- Dixon, R.A. 1985. Isolation and Maintenance of Callus and Cell Suspension Cultures. In Plant Cell Culture. A Practical Approach (Dixon, R.A. Ed.). Oxford, England.
- Fowler, M.W. 1978. Regulation of Carbohydrate Metabolism in Cell Suspension Cultures. In Frontiers of Plant Tissue Cultures (Thorpe, A. Ed.) University Calgary Press: 443-452.
- Fowler, M.W. 1981. Plant Cell Biotechnology to Produce Desirable Substances. Chemistry and Ind.
- Fujiwake, H.; T. Susuki y K. Iwai. 1980. Intracellular Localization of Capsaicin and Its Analogues. In Capsicum Fruits II. The Vacuole as de Intracelular accumulation Site of Capsaicinoids in the Protoplast of Capsicum Fruit. Plant Cell Physiol. 21 (6): 1023-1030.
- Fujiwake, H.; T. Susuki; S. Okai; K. Iwai. 1980. Enzymatic Formation of Capsaicinoids From Vanillilamine and Iso-type Fatty Acids by Cell-free extracts of Capsicum annum var. anuum cv. Karayatsubusa. Agric. Biol. Chem. 44 (12): 2907-2912.
- Fujiwake, H.; T. Susuki y K. Iwai. 1982. Capsaicinoid Formation in the Protoplast from the Placenta of Capsicum Fruits. Agric.

Biol. Chem. 46 (10): 2591-2592.

- Govindarajan, V.S. 1985. Capsicum- Production, Technology, Chemistry, and Quality. Part I: History, Botany, Cultivation and Primary Processing. Crit. Rev. in Food Sci. and Nutr. 22 (2):109-176.
- Hahlbrock, K. 1974. Correlation Between Nitrate Uptake Growth and Changes in Metabolic Activities of Cultured Plant Cell. In Tissue Culture and Plant Science. (Street, H. Ed). England.
- Hartman, T. y D. Kester. 1980. Propagación de Plantas. Principios y Prácticas. CECSA Ed. México.
- Heiser, C.B. 1969. Nightshades. San Francisco. Freeman.
- Heiser C.B. y Pickersgill, B. 1969. Names for the Cultivated Capsicum Species (Solanaceae). Taxon., 18: 277-283.
- Heiser, C.B. y B. Pickersgill. 1975. Names for the Birds Peppers (Capsicum-Solanaceae); Bailey, (19): 151-6.
- Iwai, K.; K.R. Lee; M. Kobashy y T. Susuki. 1977. Formation of Pungent Principles in Fruits of Sweet Pepper, Capsicum annuum L. var. grossum During Post-Harvest Ripening Under Continuous Light. Agric. Biol. Chem. 41 (10): 1873-1876.
- Iwai, K.; T. Susuki y H. Fujiwake. 1979. Formation and Accumulation of Pungent Principle of Hot Pepper Fruits, Capsaicin and Its Analogues, in Capsicum annuum var. annuum cv. Karayatsubusa at Different Growth Stages After Flowering. Agric. Biol. Chem. 43 (12): 2493-2498.
- Joint Committees of the Pharmaceutical Society and the Society for Analytical Chemistry on Methods of Assay of Crude Drugs. 1959. Determination of Capsaicin Content of Capsicum and Its Preparations. Analyst (84).
- Kawada, T. y K. Iwai. 1985. "in vivo" and "in vitro" Metabolism of Dihydrocapsaicin, A Pungent Principle of Hot Pepper in Rats. Agric. Biol. Chem. 49 (2): 441-448.
- Kosuge, S. y Y. Inagaki. 1962. Pungent Principles of Red Pepper. XI. Determination and Contents of Two Pungent Principles. Nippon Nogai Kagaku Kaishi. 36: 251. en Chem. Abstr. 61: 7620g, 1964.
- Larcher, W. 1975. Physiological Plant Ecology. Academic Press. New York. U.S.A.
- Leeman, E.S. y R. Gamse. 1981. Substance P in Sensory Neurons. Trends Pharmacol. Sci. 2 (5): 119- 121.
- Lega, C.M. 1984. HPLC in the Flavor/Spice Industry. Food Techn. April: 84-87.

- Lindsey, K.; M. Yeoman. 1984. The Viability and Biosynthetic Activity of Cells Capsicum frutescens Mill. cv. annuum. Immobilized in Reticulate Polyurethane. J. of Exp. Bot. 35 (160): 1684-1696.
- Lindsey, K. 1985. Manipulation by Nutrient Limitation of the Biosynthetic Activity of Immobilized Cells of Capsicum frutescens Mill. cv. annuum. Planta. 165: 126-133.
- Loewus, F.A. 1952. Improvement in Anthrone Method for Determination of Carbohydrates. Anal. Chem. 24 (1): 219.
- Lomeli, A. 1986. El Chile y Otros Picantes. Prometeo Libre Ed. México.
- Long-Solis, J. 1986. Capsicum y Cultura. La Historia del Chilli. Fondo de Cultura Económica. México.
- López, P.C. 1985. Establecimiento de Un Laboratorio de Cultivo de Tejidos. en Fundamentos teóricos-Prácticos de Cultivo de Tejidos Vegetales (Villalobos A. V. Ed.). Colegio de Postgraduados, Chapingo. México.
- López, P. C. 1985. Medios de Cultivo. en Fundamentos Teóricos-Prácticos de Cultivo de Tejidos Vegetales (Villalobos A. V. Ed.). Colegio de Postgraduados, Chapingo, México. pp. 25-53.
- Maga, J.A. 1975. Capsicum. Crit. Rev. in Food Sci. and Nutr. 6 (1): 177-199.
- Maretzki, A; M. Thom y L. G. Nickell. 1974. Utilization and Metabolism of Carbohydrates in Cell and Callus Cultures. In Tissue Culture and Plant Science. (Street, H. Ed). Academic Press. London.
- Mata, M.; E. Burgueño y J. Paniagua. 1987. Determinación Cuantitativa de la Capsaicina en Diferentes Variedades de Chile. 23-28.
- Micko, L. 1898. Isolation of Capsicum. Z. Unters. Nahr. Genussm. Gebrauchsgegenstaende, 1 (1818).
- Mizukami, H., M. Konoshima y M. Tabata. 1977. Effect of Nutritional Factors on Shikonin Derivative Formation in Lithospermum Callus Cultures. Phytochemistry (16): 1183-1186.
- Moore, C. T. 1979. Biochemistry and Physiology of Plant Hormones. Springer-Verlag. New York.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassay With Tobacco Tissue Culture. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Nelson, E.K. 1910. Capsaicin, The Pungent Principle of Capsicum and the Detection of Capsicum. J. Ind. Eng. Chem. 2:

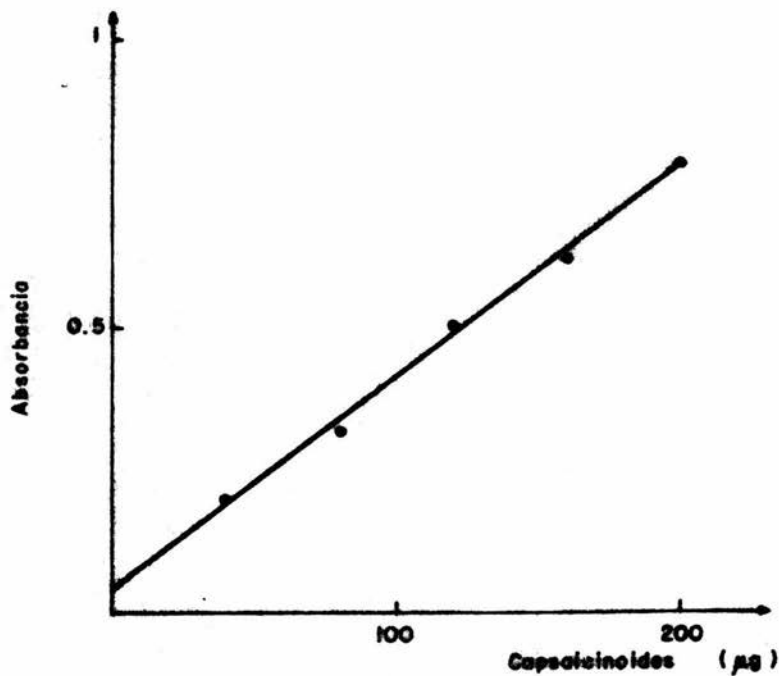
419-421.

- Nelson, E. K. y L. E. Dawson. (1923). The Constitution of Capsaicin. J. Amer. Chem. Soc. (45): 2179-81).
- Nettleship, L. y Slator, M. 1974. Adaptation of Peganum harmala Callus to Alkaloid Production. J. Exp. Bot. (25): 1114-1123.
- Ochoa, A. N. 1985. Establecimiento de Cultivos "in vitro" en Fundamentos Teóricos-Prácticos de Cultivo de Tejidos Vegetales (Villalobos A. V. Ed.). Colegio de Postgraduados, Chapingo, México. pp. 64-71.
- Ochoa, N. 1986. Comunicación Personal.
- Olsen, S. R. 1965. Phosphorus. In Methods of Soil Analysis (Black, C.A. Ed.) vol. II. Amer. Soc. of Agronomy Inc. Publishers Madison Wisconsin, USA.
- Otha, Y. 1962. Resumen. Jap. Jour. Genetics.(37): 86.
- Purseglove, J.N; E.G. Brown; C.L. Green; S.R.L. Robbins. 1981. Chillies: Capsicum spp.. Species. Longman Group Limited Vol.1 London and New York.
- Quintero, R.R. 1981. Ingeniería Bioquímica. Alhambra Ed. México.
- Ramos, V. A. 1988. Comunicación personal.
- Robert, L. 1985. El Cultivo de Tejidos Vegetales en México. en Prospectiva de la Biotecnología en México. CONACyT.
- Rojas, G.M. 1984. Fisiología Vegetal Aplicada. 2a. ed. Ed. McGraw Hill. México.
- Rowland, B.J.; B. Villalon y E.E. Burns. 1983. Capsaicin Production in Sweet Bell and Pungent Jalapeno Pepper. J. Agric. Food Chem. 31: 484-487.
- Sánchez, S. O. 1979. La Flora del Valle de México. 5a. ed. Ed. Herrero, S.A. México.
- SARH-INIA. 1984. Presente y Pasado del Chile en México. Publicación Especial No.85, 1a. Reimpresión.
- Shenck, R. y A. Hildebrandt. 1972. Medium and Techniques for Induction and Growth of Monocotyledoneus and Dicotyledoneus Plant Cell Cultures. Can. J. Bot. 50: 199-204.
- Seitz, U. 1987. Cryopreservation of Plant Cell Cultures. Planta Med. 53 (4): 311-314.
- Shuler, M.L. 1981. Production of Secondary Metabolism From Plant Tissue cultures. Problems and Prospects. Ann. N.Y. Acad.

Sci. 369: 65-79.

- Staba, E.J. 1980. Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals. Boca ratón: CRC. Press Inc.
- Stafford, A.; P. Morris; M.W. Fowler. 1986. Plant Cell Biotechnology a Perspective. Enzyme Microb. Technol. 8: 578-587.
- Susuki, T.; H. Fujiwake y K. Iwai. 1980a. Intracellular Localization of Capsaicin and Its Analogues, Capsaicinoids in Capsicum Fruit I. Microscopic Investigation of the Structure of the Placenta of Capsicum annuum var. annuum cv. Karayatsubusa. Plant Cell Physiol. 21 (5): 839-853.
- Susuki, T.; T. Kawada y K. Iwai. 1981a. Biosynthesis of Acyl moieties of Capsaicin and Its Analogues from Valine and Leucine in Capsicum Fruits. Plant Cell Physiol. 22 (1):23-32.
- Susuki, T.; T. Kawada y K. Iwai. 1981b. The Precursors Affecting the Composition of Capsaicin and Its Analogs in the Fruits of Capsicum annuum var. annuum cv. Karayatsubusa. Agric. Biol. Chem. 45 (2):535-537.
- Susuki, T.; k. Iwai. 1984. Constituents of Red Pepper Species: Chemistry, Biochemistry, Pharmacology and Food Science of the Pungent Principle of Capsicum Species. In The Alkaloids. vol. XXIII. Brossi A. Ed. Acad. Press. Orlando, Fla. Chap. 4.
- Tabata, M. 1977. Recent Advances in the Production of Medicinal Substances by Plant Cell Cultures. In Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application (Barz, W., E. Reinhard and M. H. Zenck Eds). Springer-Verlag Berlfn, New York. 3-16.
- Tapia, R. 1987. Caracterización de Capsaicinoides por HPLC Producidos en Frutos, Callos y Células en Suspensión del Género Capsicum. Tesis de Licenciatura, UNAM.
- Tresh, L. T. 1876. Isolation of Capsaicin. Pharm. J. 6: 941.
- Villalobos, A. 1985. Fundamentos Teórico-Prácticos de Cultivo de Tejidos Vegetales. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México.
- Vining, L. C. 1986. Secondary Metabolism. In Biotechnology. Microbial Products (Rhom, H. & Reed, G. Eds) vol. 4. Germany.
- Virus, M.R. y G.F. Gebhart. 1979. Pharmacologic Actions of Capsaicin: Apparent Involvement of Substance P and Serotonin. Life Sciences. 25: 1273-1284.
- Yeoman, M. 1980. The Synthetic Potential of Cultured Plant Cells. In Plant Cell Cultures: Results and Perspectives. Ed. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. 327-343.

- Zamski, E.; O. Shoham; D. Palevitch y A. Levy. 1987. Ultraestructure of Capsaicinoid- secreting Cells in Pungent and Non pungent Red Pepper (Capsicum annuum L.) Cultivars. Bot. Gaz. 148 (1):1-6.

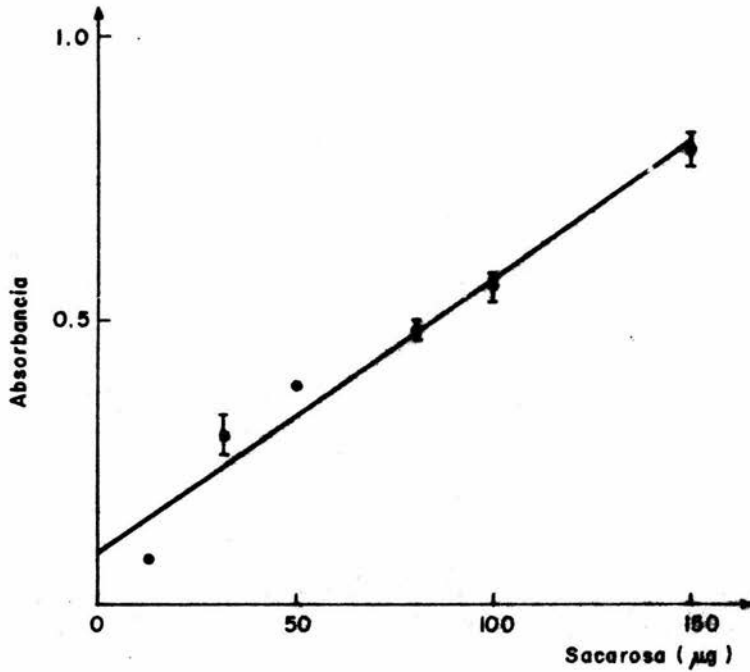


Curva patrón para la determinación de Capsaicinoides
(Bajaj, 1980).

$$y = 3.74 \times 10^{-3} x + 0.032$$

$$r = 0.9958$$

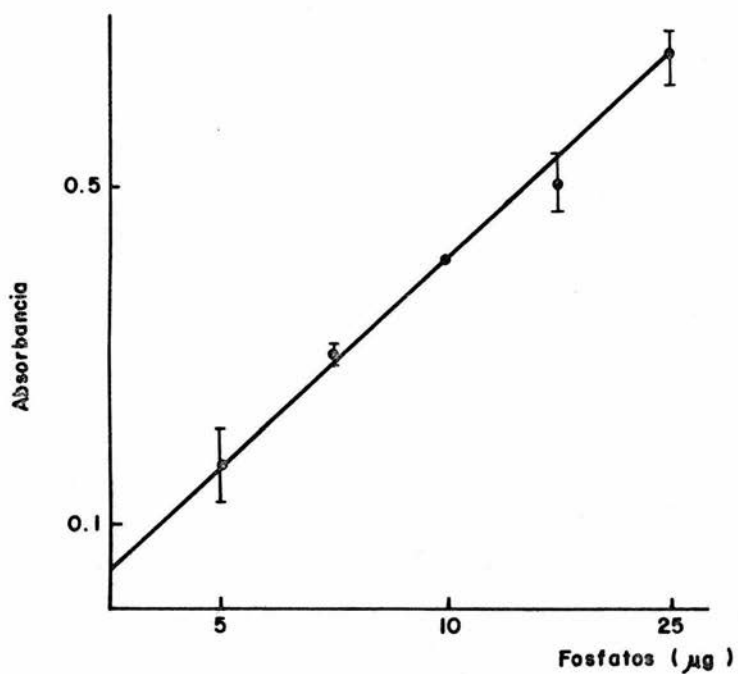
Apéndice 2



Curva patrón para la determinación de Sacarosa
(Loewus, 1952).

$$y = 4.82 \times 10^{-3}x + 0.09$$
$$r = 0.983$$

Apéndice 3



Curva patrón para la determinación de Fosfatos
(Bremner y Keney, 1960)

$$y = 0.024x + 0.047$$

$$r = 0.986$$