

19.
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"

SELECCION DE LINEAS CELULARES DE
Capsicum annum y Capsicum chinense ALTAMENTE
PRODUCTORAS DE CAPSAICINOIDES

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
LIDIA PATRICIA JARAMILLO QUINTERO



MEXICO, D. F.

1990

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

INDICE

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	1
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCION.....	3
3. ANTECEDENTES.....	7
3.1. EL GENERO <i>Capsicum</i>	13
3.2. LOS CAPSAICINOIDES.....	18
3.3. EL CULTIVO DE CELULAS VEGETALES PARA LA PRODUCCION DE METABOLITOS SECUNDARIOS.....	24
3.3.1. MANIPULACION DEL MEDIO DE CULTIVO.....	21
3.3.1.1. REGULADORES DE CRECIMIENTO.....	21
3.3.1.2. FUENTE DE CARBONO.....	22
3.3.1.3. MACRONUTRIENTES.....	22
3.3.2. ADICION DE PRECURSORES.....	23
3.3.3. MANIPULACION DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES.....	24
3.3.4. INDUCCION DE MUTANTES.....	24
3.3.5. INMOVILIZACION CELULAR.....	25
3.3.6. SELECCION DE LINEAS CELULARES.....	29
3.3.6.1. METODOS DE SELECCION DE CELULAS PRODUCTORAS DE METABOLITOS SECUNDARIOS.....	27
3.3.6.2. OBTENCION DE LINEAS CELULARES (CLONACION CELULAR).....	42
3.3.6.3. LINEAS ALTAMENTE PRODUCTORAS..	50
3.3.6.4. VARIACION SOMACLONAL.....	59
3.3.6.4.1. CAMBIOS EN EL NUMERO DE CROMOSOMAS..	60
3.3.6.4.2. REAPREGLOS CROMOSOMICOS.....	61

3.3.6.4.3.	CAMBIOS EN GENES CITOPLOSMATICOS....	61
3.3.6.4.4.	INTERCRUZAMIENTO MITOTICO.....	62
3.3.6.4.5.	ACTIVACION DE TRANSPONONES.....	62
3.3.6.4.6.	CAMBIOS INDUCIDOS POR EL EXPLANTE....	62
3.3.6.4.7.	EXPRESION ALTERADA EN FAMILIAS DE MULTIGENES.....	63
3.3.6.5.	VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA VARIACION SOMACLONAL.....	63
4.	MATERIALES Y METODOS.	
4.1.	MATERIAL BIOLÓGICO.....	66
4.2.	MEDIOS DE CULTIVO.....	66
4.3.	ACONDICIONAMIENTO Y DESINFESTACION DE LAS SEMILLAS.....	70
4.4.	GERMINACION Y OBTENCION DE PLANTULAS.....	72
4.5.	INDUCCION Y DESARROLLO DE TEJIDO CALLOSO.....	72
4.6.	ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS EN SUSPENSION.....	73
4.7.	OBTENCION DE CELULAS AISLADAS.....	73
4.9.	PLAQUEO CELULAR.....	74
4.9.	SELECCION PRIMARIA DE CLONES PRODUCTORES DE CAPS.....	77
4.10.	SELECCION SECUNDARIA DE CLONES PRODUCTORES DE CAPS.....	79
4.11.	INDICE DE CRECIMIENTO.....	91
4.12.	EXTRACCION DE LOS CAPSAICINOIDES.....	91
4.13.	CUANTIFICACION DE LOS CAPSAICINOIDES.....	92
4.14.	ESTUDIO PARCIAL DE LA ESTABILIDAD.....	92

5.	RESULTADOS Y DISCUSION	
5.1.	MATERIAL VEGETAL.....	93
5.2.	INDUCCION DE TEJIDO CALLOSO.....	98
5.3.	ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS EN SUSPENSION PARA LA OBTENCION DE CELULAS AISLADAS	
5.3.1.	SELECCION DEL MEDIO DE CULTIVO.....	02
5.3.2.	SELECCION DEL ESTADO FISIOLÓGICO DEL CULTIVO PARA LA OBTENCION DE CELULAS AISLADAS.....	03
5.4.	PLAQUEO CELULAR Y OBTENCION DE CLONES CELULARES.....	05
5.4.1.	ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA EFICIENCIA DE PLAQUEO OBTENIDA EN CADA UNO DE LOS METODOS DE PLAQUEO CELULAR EN LAS ESPECIES DE <i>Capsicum</i>	108
5.5.	SELECCION PRIMARIA DE CLONES PRODUCTORES DE CAPS.....	111
5.6.	SELECCION SECUNDARIA DE CLONES PRODUCTORES DE CAPS.....	119
5.7.	RELACION DE LA CAPACIDAD DE BIOSINTESIS DE CAPEAICINOIDES ENTRE EL CULTIVO INICIAL Y LAS LINEAS CELULARES OBTENIDAS.....	125
5.8.	RELACION ENTRE CRECIMIENTO Y CAPACIDAD BIOSINTETICA ENTRE LAS LINEAS CELULARES OBTENIDAS PARA CADA ESPECIE.....	131
5.9.	LINEAS ALTAMENTE PRODUCTORAS DE CAPEAICINOIDES.....	134
5.10.	ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LAS LINEAS CELULARES OBTENIDAS.....	137
6.	CONCLUSIONES.....	149
7.	REFERENCIAS.....	151

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.

TABLAS.

I.	METABOLITOS SECUNDARIOS Y SU APLICACION INDUSTRIAL...	9
II.	ESTRUCTURA QUIMICA, NOMENCLATURA Y GRADO DE PICOR DE LA CAPSAICINA Y SUS ANALOGOS.....	19
III.	SUSTANCIAS OBTENIDAS MEDIANTE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.....	25
IV.	FACTORES QUE INFLUYEN EN LA PRODUCCION DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN CULTIVOS DE CELULAS EN SUSPENSION.....	27
V.	EJEMPLOS DE LINEAS CELULARES ALTAMENTE PRODUCTORAS QUE SE HAN MANTENIDO ESTABLES A TRAVES DEL TIEMPO....	46
VI.	FACTORES QUE INCREMENTAN LA EFICIENCIA DE PLAQUEO....	47
VII.	LINEAS CELULARES ALTAMENTE PRODUCTORAS DE METABOLITOS OBTENIDOS POR PROCESOS DE SELECCION EN CULTIVOS <i>in vitro</i>	55
VIII.	COMPOSICION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO DE MURASHIGE Y SKOOG (1962) Y SCHENK Y HILDEBRANDT (1972).....	67
IX.	CONCENTRACION DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO UTILIZADOS EN LOS CULTIVOS DE CALLO, SUSPENSION E INDUCCION DE CLONES DE LAS ESPECIES DE <i> Capsicum</i>	80
X.	METODOS DE ACONDICIONAMIENTO Y DESINFESTACION DE LAS SEMILLAS DE <i> Capsicum</i>	71
XI.	CONTENIDO DE CAPSAICINOIDES EN EXTRACTOS DE FRUTOS DE DIFERENTES ESPECIES DE <i> Capsicum</i> POR HPLC.....	84
XII.	PORCENTAJE DE GERMINACION DE SEMILLAS DE <i> Capsicum</i> EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO.....	86
XIII.	INDUCCION Y CRECIMIENTO CUALITATIVO DE TEJIDO CALOSO A PARTIR DE EXPLANTES DE HIPOCOTILO DE LAS ESPECIES	

	DE <i>Capsicum</i>	90
XIV.	NUMERO DE CLONES OBTENIDOS Y TIEMPO DE INDUCCION EN CADA UNO DE LOS METODOS DE PLAQUEO CELULAR USADOS EN LAS ESPECIES DE <i>Capsicum</i>	97
XV.	INDICE DE CRECIMIENTO Y CONTENIDO DE CAPSAICINA EN CULTIVOS EN SUSPENSION DE LAS LINEAS CELULARES Y LOS CULTIVOS DE LOS QUE SE ORIGINARON EN <i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i> (JALAPENO).....	127
XVI.	INDICE DE CRECIMIENTO Y CONTENIDO DE CAPSAICINA EN CULTIVOS EN SUSPENSION DE LAS LINEAS CELULARES Y LOS CULTIVOS DE LOS QUE SE ORIGINARON EN <i>C. annuum</i> var. <i>glaberrimum</i> (CHILTEPIN).....	120
XVII.	INDICE DE CRECIMIENTO Y CONTENIDO DE CAPSAICINA EN CULTIVOS EN SUSPENSION DE LAS LINEAS CELULARES Y LOS CULTIVOS DE LOS QUE SE ORIGINARON EN <i>C. chinense</i> (CHABANERO).....	130
XVIII.	PRODUCCION DE CAPSAICINOIDES EN LAS LINEAS CELULARES SELECCIONADAS COMO ALTAMENTE PRODUCTORAS EN LAS ESPECIES DE <i>Capsicum</i>	135

FIGURAS.

1.	RUTA BIOSINTETICA DE LOS CAPSAICINOIDES.....	21
2.	ESTRATEGIA DE SELECCION PARA LA PRODUCCION DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN CULTIVO DE CELULAS VEGETALES.....	20
3.	PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA OBTENCION DE LINEAS CELULARES ALTAMENTE PRODUCTORAS DE METABOLITOS SECUNDARIOS.....	43
4.	ESQUEMATIZACION DE LOS METODOS DE PLAQUEO CELULAR....	76
5.	DIAGRAMA DE LA METODOLOGIA PARA LA OBTENCION DE CLONES DE <i>Capsicum</i> PRODUCTORES DE CAPSAICINOIDES....	90

6.	EFICIENCIAS DE PLAQUEO OBTENIDAS EN TRES ESPECIES DE <i>Capsicum</i> USANDO DIFERENTES METODOS DE PLAQUEO CELULAR.....	107
7.	CORRELACION ENTRE CONCENTRACION DE CAPSAICINA Y ABSORBANCIA (315 nm).....	116.
8.	CORRELACION ENTRE SELECCION PRIMARIA Y SELECCION SECUNDARIA EN <i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i> (JALAPEÑO).....	119
9.	CORRELACION ENTRE SELECCION PRIMARIA Y SELECCION SECUNDARIA EN <i>C. chinense</i> (HABANERO).....	121
10.	CORRELACION ENTRE SELECCION PRIMARIA Y SELECCION SECUNDARIA EN <i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i> (CHILTEPINO).....	123
11.	FLUCTUACION EN EL CONTENIDO DE CAPSAICINOIDES DE 10 LINEAS CELULARES SELECCIONADAS DE <i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i> (JALAPEÑO).....	128
12.	FLUCTUACION EN EL CONTENIDO DE CAPSAICINOIDES DE 12 LINEAS CELULARES SELECCIONADAS DE <i>C. chinense</i> (HABANERO).....	142
13.	FLUCTUACION EN EL CONTENIDO DE CAPSAICINOIDES DE 13 LINEAS CELULARES SELECCIONADAS DE <i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i> (CHILTEPINO).....	144

1. RESUMEN.

La técnica de Cultivo de Células Vegetales se ha considerado una alternativa potencial en la producción de metabolitos secundarios, donde quedan comprendidos los capsaicinoides (CAPS), compuestos responsables del sabor picante del chile (*Capsicum*) y con amplio uso en las industrias de alimentos y farmacéutica, principalmente.

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos durante la selección de líneas celulares altamente productoras de capsaicinoides, a partir de dos especies de *Capsicum*: *C. annuum* var. *annuum* (Jalapeño), *C. annuum* var. *glabriusculum* (Chiltepin) y *C. chinense* (Habanero).

Para la obtención de las líneas celulares se llevó a cabo la técnica de clonación celular, para lo cual se partió de la germinación *in vitro* de las semillas, seguida del establecimiento del tejido caloso y de los cultivos en suspensión, de los cuales se obtuvieron las células aisladas.

Durante el plaqueo celular se implementaron varios métodos, encontrándose los mejores resultados para Jalapeño y Habanero con el método de Weber y Lark modificado^M, mientras que para Chiltepin el de Horsch modificado^M; en ambos se comprobó el efecto positivo de las células alimentadoras, como promotoras del crecimiento en células aisladas a bajas densidades celulares.

Las eficiencias de plaqueo más altas que se obtuvieron fueron 13.04% para *C. annuum* var. *annuum* (Jalapeño), 10.80% para *C. chinense* (Habanero) y 4.03% para *C. annuum* var. *glabriusculum* (Chiltepin), observándose que esta última especie tuvo mayores requerimientos nutricionales durante la inducción de clones.

Se estableció como método de selección primaria de capsaicinoides una modificación del propuesto por Rajpoot y Govindarajan (1981) con el uso del reactivo de Gibbs, el cual resultó ser rápido y confiable, aun cuando presentó algunos problemas de interferencia.

Se obtuvieron dos líneas celulares altamente productoras en Jalapeño (J122 y J172) cuyas producciones variaron de 239.12 a 289.99 $\mu\text{gC/g}$ P.S.; para Chiltepin se seleccionaron dos (C29 y C34) con niveles de producción de 1302.86 a 3189.99 $\mu\text{gC/g}$ P.S.; mientras que para Habanero se lograron establecer 6 líneas (H39, H40, H78, H80, H84 Y H48), cuyo rango de producción fue de 515.46 a 1717.18 $\mu\text{gC/g}$ P.S.

La capacidad biosintética de CAPS entre el cultivo de origen y las líneas que de él se obtuvieron no presentó ningún tipo de relación clara, lo que también sucedió cuando se estudio el crecimiento y la producción de estos compuestos en las líneas celulares seleccionadas.

Aun cuando en las líneas obtenidas se observó variabilidad en la producción de CAPS a lo largo de los subcultivos se pudieron establecer rangos más o menos claros, por lo que se sugiere llevar a cabo procesos de selección continua, para evitar tanto la inestabilidad como la posible pérdida de la característica de producción de estos metabolitos.

En base a la inestabilidad observada se plantea como posible causa la aparición de cambios epigenéticos inducidos por las variaciones que se presentan en las condiciones de cultivo durante los subcultivos. De lo que resalta la necesidad de realizar estudios que permitan esclarecer tanto las causas de este fenómeno como la forma de regularlo mediante la manipulación de las condiciones físicas y/o químicas en las líneas seleccionadas.

2. INTRODUCCION.

El género *Capsicum*, conocido popularmente como chile, es un cultivo que a pesar de ser originario de América del Sur y las Antillas se encuentra ampliamente distribuido por el mundo, donde forma parte importante en las industrias de alimentos, de fármacos y de cosméticos. En la industria alimenticia se usa como condimento o por sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas, mientras que en la farmacéutica se aprovechan sus efectos como anestésico local y en tratamientos contra el reumatismo (Pickersgill, 1969; Maga, 1975; Govindarajan, 1988a). Esta importancia comercial del chile se debe a las características estimulantes y picantes que presentan sus frutos, lo cual a su vez se atribuye a un grupo de metabolitos secundarios denominados capsaicinoides.

El grupo de los capsaicinoides está formado por cinco compuestos análogos, cuyas proporciones varían de acuerdo a la especie y a las condiciones de cultivo bajo las cuales dichas especies se están desarrollando (Iwai y col., 1977 a y b). Industrialmente los capsaicinoides se comercializan como un extracto impuro llamado "oleorresina", sin embargo su uso presenta un gran número de limitantes, entre las que destacan el enranciamiento que sufre con el tiempo y el bajo contenido de capsaicinoides que presenta, lo cual implica que los rendimientos de extracción de estos compuestos sean bajos y los costos altos (Purseglove y col., 1981; Suzuki e Iwai, 1984; Long, 1986). Aunado a lo anterior, se tiene la problemática de que estos metabolitos están constituidos por estructuras químicas muy complejas que dificultan su síntesis química. En base a esto y a la demanda de estos compuestos en

el mercado, se han buscado alternativas para su producción, entre las que se encuentran las técnicas de Cultivo de Tejidos Vegetales (Fowler, 1983).

Aun cuando se ha establecido la utilidad de esta técnica para la obtención de cultivos con altas producciones de metabolitos secundarios, donde se incluyen los capsaicinoides, se ha encontrado que su explotación a nivel comercial presenta grandes limitaciones, entre las que sobresalen por un lado los bajos niveles de producción comparados con los obtenidos en las plantas *in vivo*, y por el otro la variabilidad que se presenta en la producción, aun dentro de un mismo cultivo (Zenk, 1978), factores que han sido solucionados a través de dos grandes alternativas. La primera de ellas ha sido mediante la manipulación de las condiciones de cultivo, tanto nutricionales como ambientales, que se ha observado presentan algún efecto regulatorio sobre el metabolismo secundario; y la segunda, a través de la cual se ha mejorado la capacidad biosintética hacia la biosíntesis de un metabolito secundario del cultivo explotando únicamente su variabilidad genética mediante la selección, clonación y estabilización de una línea altamente productora.

Como ya ha sido observado y discutido por varios autores, los cultivos de células vegetales están constituidos por un gran número de tipos celulares, lo cual se evidencia en todos los niveles, pero sobretodo a nivel bioquímico, donde la principal implicación es que las células difieren en su capacidad de producir metabolitos secundarios. Aunado a lo anterior se encuentra la particularidad de que las condiciones *in vitro*, son generadoras de variabilidad genética, fenómeno conocido como Variación Somaclonal, ya sea por la inducción de cambios genéticos o epigenéticos a nivel celular. Aunque estos factores de variabilidad se han

considerado perjudiciales para el establecimiento de cultivos celulares productores. también plantean la posibilidad de usarlos como fuente de obtención de células variantes, cuya capacidad biosintética sea muy alta. En base a estas premisas Zonk y col. establecieron en 1977 una estrategia para la obtención de líneas celulares altamente productoras de compuestos naturales, la cual aun cuando ha sufrido algunos cambios continúa siendo valedera; esta estrategia basada unicamente en la explotación del potencial genético de la célula diploide, ha permitido establecer cultivos cuyas producciones han igualado e incluso superado las producciones de las plantas *in vivo*.

Ya que a lo largo del trabajo de investigación sobre la producción de capsaicinoides por células del género *Capsicum* en cultivo sumergido que se realiza en el Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN se ha observado un alto grado de variabilidad en la producción de estos compuestos, se planteó la necesidad de contar con líneas celulares con las características de ser productoras y estables, lo cual a su vez permitiría el escalamiento de este sistema en biorreactores de mayor capacidad. De esta manera y con los antecedentes ya expuestos se plantearon dentro de este trabajo los siguientes objetivos:

1) Establecer el método de plaqueo celular que permita obtener mayores eficiencias de plaqueo en *Capsicum annuum* var. *annuum*, *C. annuum* var. *glabriusculum* y *C. chinense*.

2) Establecer un método de selección primaria que permita analizar rápida y confiablemente un gran número de cultivos celulares productores de capsaicinoides.

3) Obtener y seleccionar líneas celulares de *C. annuum*

var. *annuum*, *C. annuum* var. *glabriusculum* y *C. chinense* con altas producciones de capsaicinoides mediante un método de selección secundaria.

4) Evaluar la influencia de la capacidad biosintética de capsaicinoides del cultivo de origen, sobre la productividad de las líneas celulares obtenidas.

5) Relacionar el comportamiento del crecimiento de las colonias celulares (manejado como índice de crecimiento) y la producción de capsaicinoides en los cultivos en suspensión de las líneas celulares seleccionadas.

6) Evaluación de la estabilidad de las líneas celulares a través de subcultivos continuos sin selección.

3. ANTECEDENTES.

El espectro de estructuras químicas sintetizadas por el reino vegetal es más amplio que en quizá cualquier otro grupo de organismos, es por esto que durante siglos las plantas han sido usadas por el hombre como fuentes principales de productos tanto de importancia química, biológica y por lo tanto han pasado a tomar interés industrial (Fowler, 1984).

A pesar de los avances en química orgánica, no se ha logrado establecer la producción sintética de estos compuestos, debido principalmente a que estos pueden presentar una estructura compleja que dificulta su síntesis química, o se puede dar el caso de que el costo de la misma sea muy elevado comparado con su extracción de la fuente convencional (Fowler, 1984; Suzuki e Iwai, 1984; Govindarajan, 1986).

Muchos de estos compuestos son llamados "metabolitos secundarios", los cuales se han definido como aquellas sustancias no esenciales para la sobrevivencia de la planta, o que se encuentran envueltas en secuencias metabólicas muy alejadas de las vías centrales o primarias de la célula, y que en su mayoría se restringen a un pequeño grupo de organismos e incluso en ocasiones a uno solo. Además de presentar importancia económica, muchos de estos compuestos intervienen en papeles ecológicos y fisiológicos de las plantas superiores. Investigaciones en el área de bioquímica ecológica indican que algunos de ellos protegen a la planta de microorganismos, insectos y otros predadores, aumentan la capacidad de la misma para competir por un hábitat particular o intervienen en la reproducción del organismo mediante la atracción de insectos que permiten la polinización; (Fowler, 1984; Balandrin y cols., 1985).

Dentro de los metabolitos secundarios existen 3 grandes categorías: los aceites esenciales, los glucósidos y los alcaloides. Los aceites esenciales se emplean como saborizantes, perfumes y solventes; los glucósidos se usan como tinturas, colorantes para alimentos y en la industria farmacéutica; y por último los alcaloides que se destinan principalmente a la producción de medicamentos. De lo anterior se puede concluir, como se observa en la Tabla 1, que el rango de sectores industriales que utilizan metabolitos secundarios en una forma u otra es bastante amplio e incluye industrias farmacéuticas, de alimentos y bebidas, de cosméticos, perfumería y agroquímicos (Shuler, 1981).

Desde un punto de vista de mercado estos compuestos se comercializan como productos de poco volumen pero de alto costo, lo cual se debe a los problemas de extracción y purificación aunado a que muchas plantas productoras son de cultivo difícil y tardado; por lo cual resulta necesario encontrar alternativas para la producción estable y continua de estas sustancias. Una de las opciones que actualmente ha dado resultados satisfactorios, es el uso de la técnica de Cultivo de Células Vegetales, cuya aplicación industrial por la compañía Mitsui Petrochemical, ha generado en Japón un sistema de producción bien establecido para el compuesto shikonina, el cual es biosintetizado por células de *Lithospermum erythrorhizon*; además de que existen otros sistemas económicamente interesantes a nivel de planta piloto (Fujita y col., 1981; Shuler, 1981; Fowler, 1983; Mantell y Smith, 1983; Balandrin y cols., 1985). Cabe mencionar que todos estos sistemas se han logrado establecer a partir de estudios sobre la influencia que tienen algunos factores físicos y/o químicos sobre el metabolismo secundario

TABLA I. METABOLITOS SECUNDARIOS Y SU APLICACION INDUSTRIAL.

SECTOR INDUSTRIAL Y PRODUCTO.	ACTIVIDAD	FUENTE VEGETAL
FARMACEUTICO		
Quinina	Antimalárico	<i>Cinchona</i> <i>lanceolata</i>
Morfina	Analgésico	<i>Papaver</i> <i>somniferum</i>
Codeína	Analgésico	<i>Papaver</i> <i>somniferum</i>
Diosgenina	Anticonceptivo	<i>Dioscorea</i> <i>deltoidea</i>
Reserpina	Antihipertensivo	<i>Rauwolfia</i> sp.
Vincristina	Antileucémico	<i>Catharanthus</i> <i>roseus</i>
ALIMENTICIO		
Taumatina	Edulcorante	<i>Thurmatococcus</i> sp.
Quinina	Agente amargante	<i>Cinchona</i> <i>lanceolata</i>
AGROQUIMICOS		
Piretrinas	Insecticida	<i>Chrysanthemum</i> <i>cinerariifolium</i>
PERFUMES/AROMAS		
Jazmin	Perfume	<i>Jasminum</i> sp.
Altaí de rosas	Perfume	<i>Rosa</i> sp.

(Fowler, 1983).

de las células, los que algunas veces carecen de un respaldo bioquímico totalmente claro y dilucidado.

En general se ha observado que las células *in vitro* de rápido crecimiento y que no presentan algún tipo de organización acumulan los productos secundarios en bajas cantidades, por lo que se ha determinado que existe una relación inversa entre el crecimiento, la diferenciación y la acumulación de estos compuestos (Lindsey y Yeoman, 1983).

En base a lo anterior y a los resultados y experiencia que se tiene en la aplicación industrial del Cultivo de Células Vegetales para producir metabolitos secundarios, Tabata (1977) ha propuesto cumplir con los siguientes requerimientos para que su uso sea totalmente válido.

a) Contar con velocidades de crecimiento celular y de biosíntesis lo suficientemente altas, para obtener en un menor tiempo, la mayor cantidad de producto final.

b) Contar con células genéticamente estables para asegurar una producción constante.

c) Evitar el catabolismo acelerado de los metabolitos, o en el mejor de los casos, inducir su liberación al medio.

d) Manejar costos de producción bajos para hacer el sistema más atractivo al productor.

Aun cuando se han tomado en cuenta estos factores durante la aplicación de esta técnica existen todavía una serie de problemas que impiden su explotación comercial, entre los que destacan:

- Inestabilidad genética, lo que genera una gran variabilidad en la producción.

- Agregación celular.

- Control de la diferenciación celular.

- Reducción del crecimiento y la concentración celular como consecuencia de la manipulación del medio.

- Desconocimiento de las bases bioquímicas y de la ruta biosintética de la mayoría de los metabolitos secundarios (Shuler, 1981).

Sin embargo, a pesar de lo anterior, estas técnicas se siguen usando y modificando con el propósito de generar sistemas estables y productivos, ya sea mediante la manipulación del medio de cultivo, de las condiciones ambientales y/o el uso de líneas celulares altamente productoras (Stafford y col., 1986).

3.1 EL GENERO *Capsicum*

La familia de las Solanaceas agrupa a diferentes plantas de interes economico, entre las más importantes se encuentran la papa (*Solanum tuberosum* L.), la berenjena (*S. melongena* L.), el tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), el tabaco (*Nicotiana glauca* L.) y el chile (*Capsicum* sp) (Purseglove y cols., 1981).

De acuerdo a Heiser y Pickersgill (1960), el genero *Capsicum*, que tiene como centros de origen America del Sur y las Antillas, presenta una gran dificultad en su clasificacion taxonomica debido esto a la gran diversidad y variabilidad en los tipos de chiles tanto cultivados como silvestres, a sus cruzamientos interespecificos y a la fertilidad de los hibridos resultantes; sin embargo, este grupo ha reconocido sólo cinco especies de *Capsicum* domesticadas. Estas especies son: *C. annuum*, *C. chinense*, *C. baccatum*, *C. frutescens* y *C. pubescens*, de las cuales las dos primeras son las más ampliamente difundidas en México.

El genero *Capsicum* es usado principalmente en las industrias alimenticia y farmaceutica, dentro de las primeras se comercializa por su picor como fruto completo o en polvo para la elaboracion de salsas e chiles en conserva, sin embargo para el sazonamiento de alimentos elaborados es más conveniente usar el extracto aceitoso del fruto, el cual es conocido como "oleoresina". En la industria farmaceutica se hace uso de la oleoresina, ya sea como estimulante o carminativo en prescripciones orales, o como contrairritante de enfermedades como el reumatismo, la neuralgia y en inflamaciones de garganta en prescripciones cutaneas o externas (Heiser y Smith, 1953; Purseglove y cols., 1981; Green

y Flammer, 1999).

Entre las propiedades más importantes de la oleorresina, desde el punto de vista tecnológico, son su color, olor y sobretodo su picor (Purseglove y col., 1981; Govindarajan, 1987).

Según Maga (1975), el color es debido a un gran número de pigmentos, entre los que predominan la capsantina, capsorutina, β -carotenos, violoxantina y criptoxantina; mientras que el olor está dado por diversos compuestos, entre los que destaca el 2-metoxi-3-isobutilpirazina (Govindarajan, 1986b y 1987).

El picor que presenta la oleorresina es debida a una serie de compuestos análogos a los capsaicinoides como capsaicinoides cuya estructura química está formada por una amida ácida de vainillilamina unida a una cadena lateral de ácidos grasos, que difieren en su número de carbonos (de 0 a 11) y en el grado de saturación (Bennett y Kirby, 1988).

Dentro de las grandes limitaciones que presenta el uso de la oleorresina son su baja pureza, ya que los capsaicinoides se encuentran en muy pequeñas cantidades (máximo 5 a 10 %), el enranciamiento que sufre a través del tiempo y el que su calidad se ve influenciada por una gran cantidad de factores tales como el estado de madurez del fruto, el tratamiento tanto de secado como de trituración del fruto, y sobretodo del disolvente usado para su extracción. Considerando por un lado la problemática anterior y por el otro la necesidad de las industrias alimenticias y farmacéuticas de contar con un producto puro, estable y de fácil almacenamiento, resulta necesario disponer de capsaicinoides de uso industrial. Sin embargo, aun cuando se ha realizado la síntesis química de estos compuestos, se ha concluido que ésta es un proceso costoso y largo, ya que

involucra una gran cantidad de pasos que al final generan una mezcla de isómeros de picor diferente al de los capsaicinoides; por otro lado, su obtención a partir de la purificación de cloorrasinas es un proceso con bajos rendimientos y altos costos (Suzuki e Iwai, 1984; Purseglove y col., 1981).

En México, el chile juega un papel tan importante dentro del régimen alimenticio que se le considera como parte de la cultura del mexicano, encontrándose relacionado con sus creencias y tradiciones (Pickersgill, 1980; Long, 1986; Lemeli, 1986).

Desde el punto de vista nutricional el chile es importante como fuente de vitaminas tales como tiamina, riboflavina, niacina, ácido ascórbico y retinol, además de presentar algunos minerales como el hierro y el calcio, proteínas, carbohidratos y grasas (Instituto Nacional de la Nutrición, 1977; Long, 1986).

De las especies de *Capsicum*, cuyos frutos tienen un alto grado de aceptación y diversidad en México se encuentran *C. annuum*, donde se incluyen los chiles Jalapeños (*C. annuum* var. *annuum*) y los piquines (*C. annuum* var. *glaberrimum*). Los chiles Jalapeños son los más importantes económicamente tanto en el mercado nacional como en el extranjero, catalogándose como una variedad picante; en la actualidad se cuenta con dos cultivares mejorados (Jarocho y Papaloapan) que se formaron por el método de línea pura, a través de autofecundaciones y selecciones individuales en poblaciones nativas de chile. Los frutos de esta especie son de forma cónica, de paredes gruesas y carnosas, de cuerpo cilíndrico o aplanado con ápice puntiagudo o chato. De color verde oscuro con paredes lisas en estado tierno y rojo con estrias al madurar.

En cuanto al chilo Chiltepin, clasificado como una variedad muy picante, forma parte del grupo de los piquines (llamados así por su tamaño tan pequeño), considerados como los tipos más silvestres de *C. annuum* y probablemente sean los progenitores de los chiles Jalapeños; dentro de esta variedad existe mucha variación en sus formas, colores, sabores y nombres. Sus frutos son de menos de 13 milímetros de diámetro, redondos u ovalados, erectos y deciduos, son silvestres y extremadamente picantes.

Otra de las especies de *Capsicum* catalogada también como muy picante es *C. chinense* (chile Habanero), cuya distribución se encuentra limitada a la península de Yucatán, y por ende su uso se restringe en su mayor parte a aspectos culinarios regionales. Los frutos son pequeños con forma de trompo y con una marcada constricción en la base. Verde claros en estado tierno y con tonos salmón, rojo, café o amarillo al madurar. (Purseglove y col., 1981; Pozo y Laborde, 1984; Long, 1986).

3.2 LOS CAPSAICINOIDES.

Como se mencionó anteriormente, los frutos de chile presentan una serie de compuestos conocidos con el nombre genérico de capsaicinoides (CAPS), las cuales se usan como aditivos alimenticios con estabilidad en el picor y con propiedades antioxidantes y antimicrobianas sobre *Sacillus cereus* y *S. subtilis* (Govindarajan, 1987). Además presentan una amplia gama de aplicaciones en la industria farmacéutica, ya sea por sus efectos sobre el sistema respiratorio y cardiovascular, como analgésico local al actuar sobre algunos neurotransmisores o como estimulante (Todd y col., 1978; Loeman y Rainer, 1981; Monserrateusorn y col., 1982).

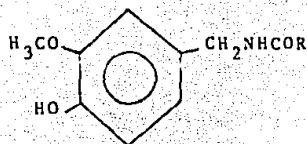
La sustancia picante de la oleorresina fue obtenida por primera vez en forma cristalina en 1876 por Tresh, quien además le designó el nombre de capsaicina; sin embargo no fue sino hasta 1923 que Nelson y Dawson dieron a conocer su estructura como N-(4-hidroxi-3-metoxibencil)-8-metilon-8-enamida o ácido 8 metil-6-nonoico de vainillilamina (Suzuki e Iwai, 1984).

Posteriormente, en 1968 Bennett y Kirby mediante estudios de resonancia magnética y espectrometría de masas postularon que el extracto picante del chile estaba constituido por al menos cinco compuestos análogos, los cuales fueron luego estudiados por otros investigadores, quienes establecieron su estructura química y sus nombres correspondientes: Capsaicina (C), Dihidrocapsaicina (DHC), Nordihidrocapsaicina (NDC), Homocapsaicina (HC) y Hemodihidrocapsaicina (HDC). De estos compuestos, la Capsaicina y la Dihidrocapsaicina son los principales constituyentes de los frutos, llegando a constituir hasta el 90% del total de los capsaicinoides en las especies más

picantes, cambiando dicho porcentaje según la variedad y la maduración del fruto (Iwai y col., 1977a y b, 1979; Suzuki y col., 1981). En la Tabla II se presenta la estructura química y grado de picor del grupo de los capsaicinoides.

Respecto a la biosíntesis de los capsaicinoides se ha observado que ésta se encuentra determinada por el grado de madurez del fruto y por las condiciones ambientales, principalmente temperatura y luz. De hecho en los trabajos realizados por Iwai y col. en 1979 se demostró que el contenido de capsaicinoides en *S. annuum* var. *annuum* cv. Karayatsubusa se detecta a los 20 días después de la floración y aumenta gradualmente con el crecimiento del fruto hasta los 40 días, posteriormente esta concentración disminuye debido probablemente a que sufren degradación o descomposición química, mientras que la concentración de carotenoides aumentó. Estos mismos autores en 1977a observaron que la biosíntesis y acumulación de estos compuestos depende de las condiciones de cultivo, principalmente de la temperatura, el fotoperíodo y la fertilización. Sus resultados en *S. annuum* var. *grossum* (chile dulce) mostraron que la biosíntesis sólo se llevó a cabo bajo condiciones de luz continua durante la maduración post-cosecha, y que esto se realizó en la placenta de los frutos, mientras que en condiciones de obscuridad no se formó ningún capsaicinóide; los mismos resultados fueron obtenidos por estos autores (1977b), al incubar frutos inmaduros de esta especie carentes de pedúnculo en presencia de vainillilamina y ácido isocáprico (ambos precursores en la ruta biosintética de CAPS), tanto en condiciones de luz como de obscuridad.

En los estudios realizados por Balba y col. (1968), en chiles de Egipto, se demostró que existe un incremento



GRUPO R	NOMBRE	PICOR EN UNIDADES ORGANOLEPTICAS	
		SCOVILLE	MILLONES ml./g
		Toad y col.(1977)	Jerentich(1981)
	CAPSAICINA	16.1 ± 0.6	17.0
	DIHIDROCAPSAICINA	16.1 ± 0.6	10.8
	NORDIHIDROCAPSAICINA	0.3 ± 0.4	0.6
	HOMOCAPSAICINA	6.9 ± 0.5	----
	HOMODIHIDROCAPSAICINA	8.1 ± 0.7	8.3

TABLA II. ESTRUCTURA QUIMICA, NOMENCLATURA Y GRADO DE PICOR DE LA CAPSAICINA Y SUS ANALOGOS (ADAPTADO DE SUZUKI Y COL., 1981; GOVINDARAJAN, 1987).

gradual en los niveles de capsaicinoides con la madurez del fruto, ya que el picor sólo se logró detectar hasta que los frutos iniciaron el cambio de coloración de verde a verde amarillento, lo cual ocurrió cuatro semanas después de la floración en las plantas cultivadas en verano y a las cinco semanas en plantas cultivadas en otoño, de lo que se concluyó además, que la velocidad de biosíntesis y la acumulación de CAPS es mayor en verano que en otoño.

Otro de los estudios que demuestra la influencia de los factores ambientales en la biosíntesis de estos compuestos, es el realizado por Suzuki e Iwai (1984), quienes demostraron que las temperaturas menores a 20°C en los cultivos de *Capsicum* disminuyeron la velocidad de floración y el contenido de capsaicinoides, mientras que a temperaturas mayores la síntesis y acumulación de estos metabolitos se vio altamente favorecida.

El trabajo presentado por Bubicz (citado en Suzuki e Iwai, 1984), mostró el papel primordial que juegan los macronutrientes en la producción de CAPS, en él se estableció que la mayor síntesis de estos metabolitos en *S. annuum* se logró aplicando a los cultivos 120 kg/ha de potasio, 50 kg/ha de nitrógeno y 22 kg/ha de fósforo. A su vez, Novak (citado en Suzuki e Iwai, 1984) observó que en los cultivos hidropónicos de *S. annuum* la acumulación de capsaicinoides está influenciada por la cantidad de los micronutrientes cobre, boro y molibdeno.

En cuanto al sitio de biosíntesis de estos compuestos, los primeros estudios realizados por Furuya y Hashimoto en 1954 (citado en Suzuki e Iwai, 1984) determinaron que ésta se realiza específicamente en la placenta del fruto y especularon que eran secretados dentro de receptáculos a partir de células epidérmicas del surco longitudinal de la

placenta, como complejos lípidos-CAPS. Posteriormente, mediante técnicas de microscopía electrónica, Iwai y col. (1977a) comprobaron que los capsaicinoides son sintetizados y acumulados en las células epidérmicas de la placenta. A lo cual Suzuki y col. (1980) y Fujiwake y col. (1980), agregaron que la mayor acumulación dentro de estas células epidérmicas se encuentra en vesículas similares a vacuolas. Recientemente Zamsky y col. (1987), mostraron que los CAPS inician su biosíntesis dentro del compartimiento interno del retículo endoplásmico de estas células y además sugieren que las vesículas donde se acumulan los CAPS son formadas a partir de fragmentos del retículo endoplásmico que migran a través del citoplasma fusionándose con el plasmalema, agregan por otro lado que el plasmalema debe jugar un papel muy importante en la excreción de los CAPS a la zona subcuticular del tejido epidérmico donde se acumulan.

Investigaciones acerca de la ruta biosintética de los capsaicinoides fueron iniciadas por Bennett y Kirby (1968) en frutos de *S. annuum* y por Leete y Louden (1968) en frutos de *S. frutescens*. Sus resultados revelaron que tanto la fenilalanina como la L-valina y la L-leucina actúan como precursores en la biosíntesis de los capsaicinoides, donde la fenilalanina es precursora de la parte aromática o de la vainillilamida y la L-valina y L-leucina son precursoras de la cadena acil-grasa. Estos estudios fueron posteriormente comprobados por Iwai y col. (1977a y b, 1979), Suzuki y col. (1980 y 1981) y Fujiwake y col. (1980 y 1982), quienes usaron la especie *S. annuum* var. *annuum* cv. Karayatsubusa y propusieron la ruta biosintética mostrada en la Figura 1.

Aunque se han realizado un gran número de estudios sobre la ruta biosintética de los CAPS, no se puede considerar ésta como totalmente completa y dilucidada, debido a que aun

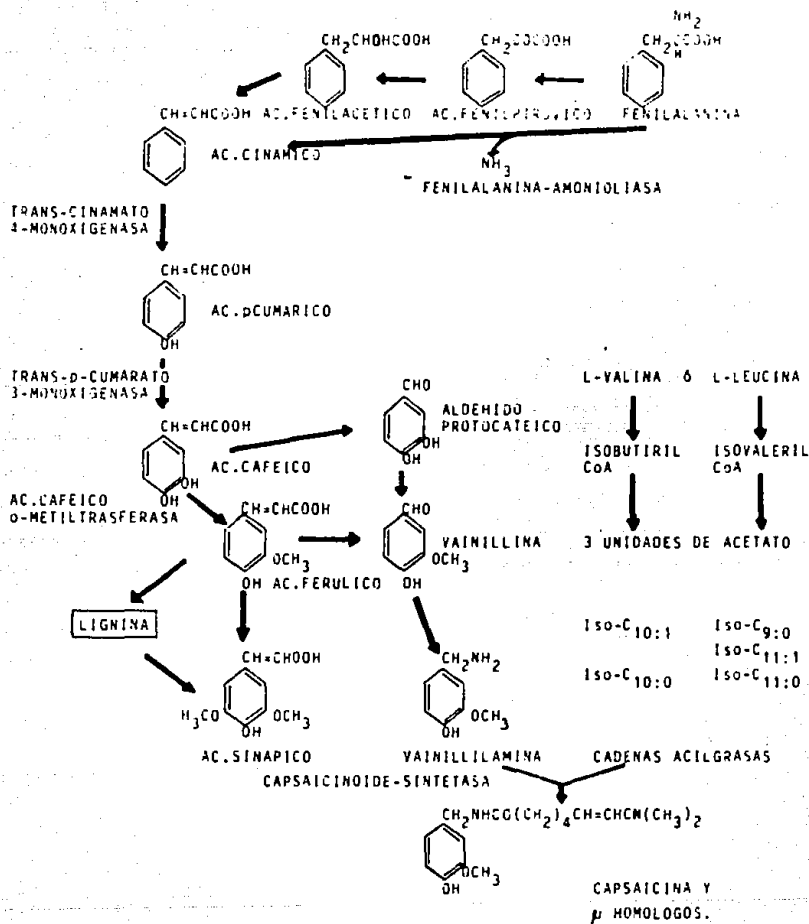


FIGURA 1. RUTA BIOSINTETICA DE LOS CAPSAICINOIDES
 (ADAPTAO POR BUZUKI y col., 1980).

faltan por determinar los pasos intermedios de un compuesto a otro, tal como la formación de vainillilamina a partir del ácido ferúlico, así como establecer que enzimas están involucradas y cuales son sus características (Fujiwake y col., 1980; Suzuki e Iwai, 1984). Hasta el momento lo que se ha llegado a demostrar es que algunas de las enzimas están distribuidas en diferentes organelos celulares ya que mientras la fenilalaninamonoliase que cataliza la conversión de fenilalanina a ácido cinámico se encuentra en el citosol, la trans-cinamato-4-monooxigenasa que cataliza la reacción de ácido cinámico a ácido cumárico y la capsaicinoide sintetasa la cual cataliza la reacción de condensación de la vainillilamina y la cadena acil-grasa han sido encontradas en el tonoplasma de la vacuola, factores que dificultan aun más el entendimiento del transporte de los intermediarios de la ruta (Fujiwake y col., 1982; Luckner, 1980).

Respecto a la formación intracelular de los capsaicinoides, Suzuki e Iwai (1984) propusieron que éstos eran sintetizados a partir de vainillilamina y diferentes ácidos grasos, en la forma de Acil-CoAs. con la intervención de la enzima capsaicinoide-sintetasa localizada cerca del tonoplasma (membrana de la vacuola) para luego depositarse en la vacuola, cuyo contenido es secretado posteriormente al exterior de la célula y acumulado en el receptáculo como una mezcla de lípidos-capsaicinoides.

Considerando ahora el aspecto de cuantificación, es necesario mencionar, que aun cuando se cuenta con una gran cantidad de métodos, la mayoría de ellos presentan grandes problemas en su aplicación, ya sea que tienen una sensibilidad inadecuada y/o dan una pobre resolución. Por un lado, se tienen los métodos colorimétricos y espectrofotométricos, algunos de los cuales presentan

inestabilidad en el color o turbidez, o son muy elaborados, costosos y consumidores de tiempo, otros en cambio sólo dan resultados semicuantitativos o su determinación es muy subjetiva. En los métodos cromatográficos, ya sea de gases o de alta eficiencia, la principal problemática es la falta de equipo ya que en general son los más confiables en las determinaciones cuantitativas de CAPS (Iwai y col., 1979; Bajaj, 1980; Rajpoot y Govindarajan, 1981).

3.3 EL CULTIVO DE CELULAS VEGETALES PARA LA PRODUCCION DE METABOLITOS SECUNDARIOS.

El Cultivo de Células Vegetales consiste en cultivar *in vitro* cualquier tejido, órgano o célula vegetal bajo condiciones asépticas y ambientales controladas, en medios nutritivos adecuados a la especie y al objetivo que se persiga, ya sea micropropagación, preservación, producción de metabolitos secundarios o estudios básicos. El uso de esta técnica para la producción de metabolitos secundarios se ha considerado una alternativa atractiva a los problemas de extracción, de síntesis química y de pureza de estos compuestos, de hecho existen una gran cantidad de metabolitos que han sido obtenidos mediante esta técnica, algunos de los cuales se muestran en la Tabla III (Fowler, 1983).

Tabata (1977) reconoce que las ventajas que ofrece el cultivo de células vegetales en suspensión (medios líquidos), para la producción de metabolitos secundarios de interés económico son: a) Se pueden conseguir velocidades de biosíntesis más rápidas que en la planta original; b) Se pueden originar compuestos químicos que no se producen por cultivo tradicional; c) Se puede elevar la productividad regulando los factores que inciden en la biosíntesis y acumulación del producto; d) Se dan buenos rendimientos en estructuras tanto organizadas como no organizadas, y e) Existe la posibilidad de realizar biotransformaciones con el fin de mejorar el producto (la biotransformación de digitoxina a digoxina).

Por su parte, Fowler (1983), desde un punto de vista biotecnológico añade las siguientes ventajas: a) Independencia a las condiciones ambientales tales como climas, plagas,

**TABLA III. SUSTANCIAS OBTENIDAS MEDIANTE
CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES
(FOWLER, 1963).**

ANTROQUINONAS	ALCALOIDES
AGENTES ANTI LEUCEMICOS	NAFTOQUINONAS
AGENTES ANTITUMORALES	ACIDOS NUCLEICOS
AGENTES ANTIVIRALES	NUCLEOTIDOS
AROMAS	ACEITES
BENZOQUINONAS	ACIDOS ORGANICOS
CARBOHIDRATOS	PEPTIDOS
GLICOSIDOS CARDIACOS	PERFUMES
DIANTRONAS	FENOLES
ENZIMAS	PIGMENTOS
INHIBIDORES ENZIMATICOS	REGULADORES DEL
FLAVONOIDES	CRECIMIENTO VEGETAL
SABORIZANTES	PROTEINAS
HORMONAS	ESTEROIDES
INSECTICIDAS	TANINOS
LATEX	TERPENOS
LIPIDOS	VITAMINAS

contrastes estacionales, etc.; b) Se generan sistemas de producción definidos, lo cual posibilita un control sobre el abastecimiento del mercado, c) Se tiene una mayor constancia en la producción, tanto en la cantidad como en la calidad, y d) Se requiere poco espacio y menores tiempos de producción.

Sin embargo, existen también múltiples factores (algunos controlables), que inciden en la producción de estos compuestos por cultivo *in vitro*, los cuales se resumen en la Tabla IV.

La posibilidad de usar cultivos celulares como sistemas de producción de metabolitos secundarios apareció alrededor de los años 30's, sin embargo, no fue sino hasta los 50's cuando Routier y Nickell presentaron un trabajo en detalle en una patente de Pfizer (USA), a partir de ese momento es cuando la aplicación de esta técnica comienza a ser mayor. No obstante que la iniciación de los cultivos celulares no fue un éxito general, estos fueron acompañados por un buen establecimiento de líneas celulares capaces de sintetizar los productos de interés comercial característicos de la planta madre; aun así, todavía las concentraciones eran muy bajas y a menudo escasamente existentes. A finales de los 70's, la situación cambió sustancialmente y comenzaron a aparecer un número cada vez mayor de reportes sobre cultivos en suspensión que biosintetizaban el producto deseado a niveles cercanos o aun más altos que en la planta. De esta manera, se inició la investigación en sistemas de células vegetales en una mayor escala tanto en células libres como en inmovilizadas, asimismo se profundizaron los estudios referentes al comportamiento bioquímico y fisiológico de la célula vegetal en condiciones *in vitro* y sobre las interrelaciones existentes entre el crecimiento y la biosíntesis del metabolito en cuestión.

TABLA IV. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA PRODUCCION DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN CULTIVOS DE CELULAS EN SUSPENSION (Adaptado de Zinher y Kurth, 1982).

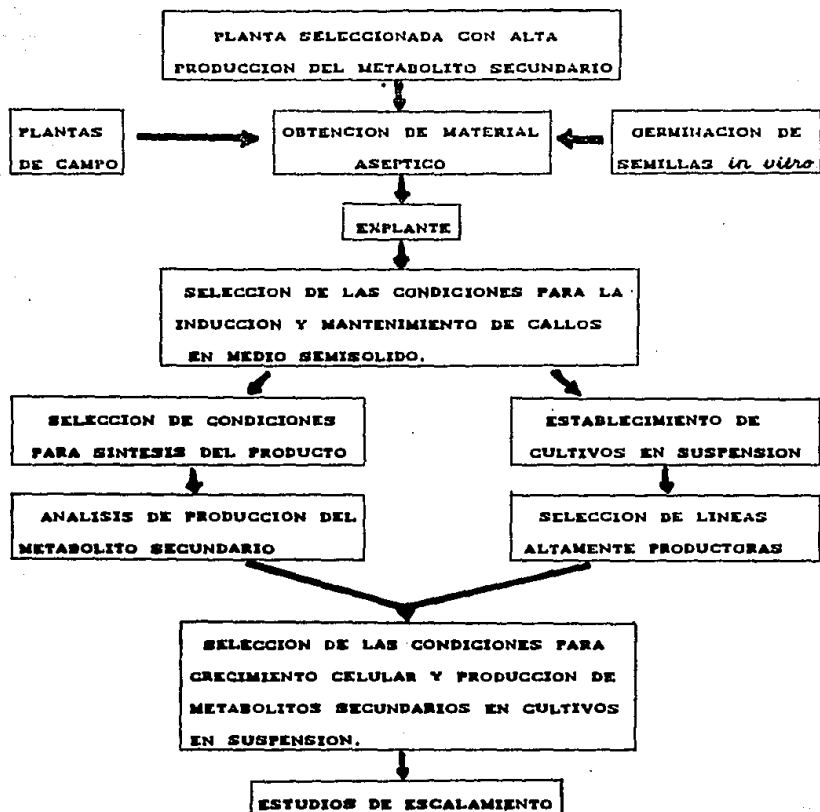
A. DE LA CELULA VEGETAL	
- MORFOLOGIA DE LA CELULA	- DIFERENCIACION
- DOSAJE GENICO	- TAMANO DE INOCULO
- SENSIBILIDAD A LAS FUERZAS DE CORTE	- VELOCIDAD DE CRECIMIENTO
- ESTABILIDAD GENETICA	- CINETICA DE PRODUCCION
B. COMPOSICION DEL MEDIO	
- PRECURSORES Y ANALOGOS	- FUENTE DE CARBONO
- ELEMENTOS TRAZA Y VITAMINAS	- FUENTE NITROGENO
- REGULADORES DE CRECIMIENTO	- FUENTE FOSFATOS
- ADICION DE MICROORGANISMOS	- COMPUESTOS ORGANICOS
C. CONDICIONES DE CULTIVO	
- DISEÑO DEL REACTOR	- pH
- TRANSFERENCIA DE OXIGENO	- LUZ
- TEMPERATURA	- TIPO AGITACION
D. PROPIEDADES DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS	
- ESTABILIDAD FISICO-QUIMICA	
- ESTABILIDAD DE LAS ENZIMAS QUE LO PRODUCEN	
E. EFECTO DE REGULADORES	
- ADICION PRECURSORES EN CINETICA DE PRODUCCION	- REPRESION O INHIBICION FOSFATO
- REPRESION CATABOLICA	INDUCCION
- EFECTOS DE RETROALIMENTACION	- EXCRECION

En base a estos estudios se ha llegado a establecer una estrategia general para el desarrollo de procesos biotecnológicos con células vegetales, la cual se representa en la Figura 2. Gracias a la aplicación de esta estrategia se ha logrado exitosamente la producción a nivel industrial y la comercialización del agente bactericida, antiinflamatorio y colorante shikonina a partir de cultivos en suspensión de *Lithospermum erythrorhizon*, por la compañía japonesa Mitsui Petrochemical (Fujita y col., 1981). Además de este proceso, existen actualmente otros que se encuentran en fase de planta piloto.

Aun cuando el potencial de esta técnica ha sido ampliamente reconocido y a que existe sólo un proceso comercial, es claro que se tienen problemas significantes que impiden la industrialización de estos sistemas. Entre éstos se presentan la lenta velocidad de crecimiento de las células vegetales, lo que hace la experimentación muy tediosa, se tiene además la necesidad de contar con biorreactores adecuados a estas células, las cuales son muy sensibles a la contaminación y a los esfuerzos de corte a que están sujetas, y a otros factores propios del crecimiento de estos sistemas en biorreactores. Sin embargo, el problema principal son los bajos rendimientos de los productos no asociados al crecimiento de la mayoría de los cultivos, con respecto a los obtenidos por las plantas *in vivo* (Shuler y col., 1984).

Es por esto que se han buscado diferentes alternativas, basadas todas ellas en la estrategia general representada en la Figura 2, que a su vez permitan mejorar y controlar la producción de estos compuestos en cultivos en suspensión, los cuales a diferencia de los cultivos semisólidos presentan mayores ventajas, ya que los primeros generan agregados celulares pequeños e inmersos en una fase acuosa en

FIGURA 2. ESTRATEGIA DE SELECCION PARA LA PRODUCCION DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN CULTIVO DE CELULAS VEGETALES (Stafford y col., 1988).



movimiento que facilita el intercambio gaseoso, la eliminación de los gradientes de polarización en el tejido y la homogenización en la distribución de los nutrientes, aumentando por lo tanto la velocidad específica de crecimiento (Yeoman y Macleod, 1977).

Entre las alternativas que se han propuesto y usado para elevar los rendimientos de producción se encuentran las siguientes:

1. La manipulación del medio de cultivo (ya sea en los reguladores de crecimiento, en las sales minerales o en la fuente de carbono, principalmente),

2. La adición de precursores,

3. La manipulación de las condiciones ambientales (luz, temperatura, aeración y pH),

4. La inmovilización celular,

5. La inducción de mutantes, y

6. El desarrollo de métodos de selección para aislar líneas celulares con altas productividades,

cuyo objetivo en común es provocar la expresión total de la información genética de la biosíntesis del metabolito de interés (Shuler y col., 1984).

Aun cuando todas estas estrategias han dado buenos resultados, siguen siendo en su mayor parte, acercamientos semiempíricos debido a la falta de conocimientos de las rutas biosintéticas de la mayoría de los metabolitos, así como de los mecanismos de regulación en estas rutas en los cultivos *in vitro*, aspectos que algunas veces difieren de los que se llevan a cabo en las plantas *in vivo* con diferentes grados de diferenciación.

3.3.1. MANIPULACION DEL MEDIO DE CULTIVO

La manipulación de los compuestos del medio de cultivo supone que bajo determinadas concentraciones las células son desreprimidas o desinhibidas favoreciendo con esto la expresión total de la vía y por lo tanto la síntesis del metabolito. La formulación del medio afecta no solo la iniciación del cultivo sino también la velocidad de crecimiento, la formación de biomasa y la síntesis del producto, de tal forma que se tiene que considerar que los metabolitos secundarios son productos que pueden o no estar asociados al crecimiento, en tal caso que las condiciones que favorecen el crecimiento no necesariamente aumentan la síntesis de estos compuestos (Fowler, 1984; Yeoman, 1986).

El efecto de los componentes del medio que más han sido estudiados son:

3.3.1.1. REGULADORES DEL CRECIMIENTO.

Estos son los compuestos que presentan los efectos más notorios tanto en el crecimiento celular como en la producción de metabolitos secundarios. En general, el incremento en los niveles de auxinas (como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético) estimula la desdiferenciación de las células y consecuentemente disminuye el nivel de los metabolitos secundarios; sin embargo, esto no siempre se presenta, tal es el caso de la producción de L-Dopa por *Aucuna pruriens*, de Ubiquinona 10 por *Nicotiana glauca* y de diosgenina por *Dioscorea deltoidea* (Misawa, 1985; Ikeda y col., 1976).

Se ha encontrado por otro lado que la eliminación de los reguladores de crecimiento ha incrementado el metabolismo

secundario, lo cual se observó en células inmovilizadas de *Tabacum frutescens*, donde la producción de CAPS se elevó al doble, pero se perdió la viabilidad durante los subcultivos posteriores (Lindsey y Yeoman, 1985; Morris, 1986).

3.3.1.2. FUENTE DE CARBONO.

Entre los factores nutricionales, los carbohidratos tienen especial significancia tanto en la síntesis de constituyentes celulares como en la producción de metabolitos secundarios (Misawa, 1985; Fowler, 1984; Stafford y col., 1986).

La fuente de carbono más usada es la sacarosa, sin embargo, también se han probado la glucosa, la galactosa, la lactosa, la maltosa, la fructosa y el sorbitol, entre otros; obteniéndose los mejores resultados para *Tabacum*, tanto en crecimiento como en producción de capsaicinoides, con la glucosa, la sacarosa y la fructosa. Se ha observado que el aumento en los niveles de sacarosa mejora la biosíntesis y acumulación del producto, mientras que la glucosa no la afecta e incluso algunas veces la inhibe (Fowler 1982, 1983; Mantell y Smith, 1983; Collin, 1987).

3.3.1.3. MACRONUTRIENTES.

En general, concentraciones bajas de los macronutrientes como fósforo y nitrógeno generan un incremento en la síntesis de metabolitos secundarios acompañado de una disminución en la velocidad de crecimiento (Fowler, 1984).

Knobloch y Berlin (1980, 1981 y 1983) trabajando con *Echinanthus roseus* y *Nicotiana tabacum* mostraron que bajos niveles de fosfatos en el medio de "inducción" provocaron el

incremento en la producción de metabolitos secundarios, aumentando sustancialmente las concentraciones de triptamina, alcaloides indólicos, nicotina y fenoles. Por su parte, Mantell y Smith (1983) han sugerido que el efecto de los bajos niveles de fosfatos sobre la biosíntesis de estos productos puede resultar del agotamiento de las pozas internas de acumulación de fosfatos, lo que genera la desrepresión de las enzimas del metabolismo secundario. A su vez estos mismos autores observaron que el fosfato regula la actividad de la enzima fenilalaninamonioliase, ya que conforme se incrementó la concentración de fosfato inicial, la actividad de esta enzima disminuyó.

En cuanto al nitrógeno, se han usado fuentes tanto inorgánicas (Nitratos y Amonio) como orgánicas (aminoácidos); y se ha observado que bajas concentraciones de nitrógeno limitan el crecimiento celular y disparan las rutas metabólicas secundarias (Mizukami y col., 1977); según Hahlbrock y col. (1974) esto se debe a que el nitrógeno, especialmente el nitrato, regula la actividad de enzimas importantes del metabolismo secundario, tal como la fenilamonioliase.

3.3.2. ADICION DE PRECURSORES.

La adición al medio de cultivo de precursores apropiados o compuestos relacionados estimula la capacidad de producción de metabolitos secundarios, sin embargo hay que tomar en cuenta que el uso de estos compuestos es difícil, ya que para su adición se tienen que considerar varios factores, entre los que destacan el estado fisiológico, la presencia y actividad del complejo enzimático que dispara la ruta biosintética a partir de ese precursor, además de que éste no

sea degradado una vez que ha sido adicionado, etc. Aunque es cierto que muchos aminoácidos son precursores de varios metabolitos, han surgido dudas en el sentido de que si todos ellos son incorporados dentro de la vía metabólica en cuestión, además de que se ha observado que algunos en determinadas concentraciones pueden resultar tóxicos para los cultivos (Misawa, 1985).

3.3.3. MANIPULACION DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES.

La manipulación de las condiciones del cultivo con el fin de incrementar la producción se ha realizado en factores como la luz, la temperatura, el pH y la aereación. Aunque se ha observado que estos parámetros tienen influencia directa sobre la biosíntesis de metabolitos secundarios, no se ha llegado a establecer en todos los casos de que manera se efectúa este efecto.

3.3.4. INDUCCION DE MUTANTES.

En biotecnología, la inducción de mutantes en microorganismos es ampliamente utilizada para inducir la producción de diferentes compuestos; sin embargo en células vegetales es mucho más difícil obtener estas mutantes, lo cual es debido a la complejidad genética de los eucariontes, a que las rutas metabólicas son más largas, a la presencia de un mayor número de enzimas y complejos enzimáticos y a la falta de conocimientos sobre las vías biosintéticas de la mayoría de los metabolitos secundarios, así como de sus mecanismos de regulación (Misawa, 1985). A pesar de este problema se han realizado varios estudios que hacen uso de esta estrategia. Por ejemplo, Berlin (1981) obtuvo líneas

celulares resistentes a p-fluorofenilalanina en *Nicotiana glauca* que presentaron altos niveles de fenoles. Por otro lado, Deus trató células de *Spathoglottis pterinea* con rayos X y obtuvo una línea celular con una producción del 2% de serpentina.

3.3.5. INMOVILIZACION CELULAR.

Una gran cantidad de estudios sugieren que el metabolismo de las células vegetales se presenta sólo si éstas son cultivadas bajo condiciones físicas y químicas muy semejantes a las que tiene dentro de la planta. Esto se puede lograr mediante la técnica de células inmobilizadas, donde las velocidades de crecimiento son lentas y se tiene la posibilidad de obtener células diferenciadas o parcialmente diferenciadas, factores clave en la producción de metabolitos secundarios (Yeoman y col., 1982; Lindsey y Yeoman, 1983).

3.3.6. SELECCION DE LINEAS CELULARES.

La producción de metabolitos secundarios mediante el Cultivo de Células Vegetales en suspensión es mucho más ventajosa que el aislamiento convencional de tales productos a partir de plantas derivadas de cultivos *in vivo*; sin embargo, sólo si el producto considerado puede ser producido en cantidades apreciables (es decir mayores que su producción convencional), estables y a un precio igual o aun menor a su costo por métodos tradicionales, se podrá hablar del desarrollo industrial del sistema (Deus y Zenk, 1982).

En la actualidad se ha incrementado el uso del Cultivo de Células Vegetales con el propósito de seleccionar en ellos

líneas celulares con una característica en particular, lo cual se debe a que estos sistemas presentan mayores ventajas que la selección a partir de plantas *in vivo*, entre las que destacan: a) Los ciclos de crecimiento en los cultivos *in vitro* son más cortos que los de las plantas *in vivo*, b) Bajo condiciones *in vitro* se tiene un control más preciso del sistema y por lo tanto estas son más homogéneas, c) Los cultivos *in vitro* presentan respuestas más rápidas a pequeños cambios en la composición del medio o en las condiciones nutricionales, d) la manipulación *in vitro* es más fácil y permite tanto estudios básicos como de ingeniería genética, e) los cultivos *in vitro* requieren de menos espacio y se pueden mantener por largos periodos de tiempo bajo condiciones adecuadas de preservación, f) se pueden llevar a cabo métodos de selección y mejoramiento en un menor tiempo que en cultivos *in vivo*, y g) las condiciones *in vitro* permiten hacer uso del fenómeno de Variación Somaclonal como fuente de variabilidad genética (Rhodes y col., 1987).

Considerando que dentro de una gran población celular se encuentran células que esencialmente producen el metabolito como resultado de mutaciones o cambios epigenéticos (los cuales serán analizados en el inciso 3.3.6.4), es posible que estas puedan ser identificadas, aisladas y cultivadas, generando con ello cultivos productores (Yeoman, 1986). De esta manera, la aplicación industrial del cultivo de células vegetales se ve favorecida por el uso de líneas celulares altamente productoras, las cuales son obtenidas explotando explotando la variabilidad genética de las células somáticas a través de programas de selección adecuados, preferentemente a nivel celular y eligiendo a los cultivos más estables (Worsuhm, 1988).

Aun cuando se han aislado líneas celulares altamente

productoras de metabolitos secundarios, que incluyen pigmentos, vitaminas, alcaloides y esteroides, la situación sigue presentándose poco satisfactoria, lo cual se debe a que aun éstas presentan variabilidad genética que redundando tanto en su morfología como en su productividad; esta variabilidad, conocida como Variación Somacional, se genera por las condiciones *in vitro*, donde los tiempos de duplicación y el número de duplicaciones resultan afectados.

3.3.6.1. METODOS DE SELECCION DE CELULAS PRODUCTORAS DE METABOLITOS SECUNDARIOS.

La selección se puede definir como una forma organizada de elegir en este caso un organismo, basándose en una o varias características deseables. Existen un gran número de métodos de selección, los cuales dependen tanto del producto de interés como de las características fisiológicas, anatómicas, genéticas y bioquímicas de las células vegetales.

Para que un programa de selección en cultivos *in vitro* pueda ser llevado a cabo eficientemente debe de cumplir con algunas condiciones tales como las que señalan Tabata y col., (1978) y Collin (1987):

i) La variabilidad en la población celular original debe ser lo suficientemente alta como para ofrecer una amplia gama de material a seleccionar,

ii) Debe ser posible obtener células aisladas con buenas respuestas a los métodos de plaqueo celular,

iii) Se debe disponer de métodos de selección sensitivos, rápidos, baratos y capaces de analizar un gran número de muestras en poco tiempo, y

iv) Se debe tomar en cuenta todo el conocimiento disponible sobre la vía biosintética del compuesto deseado.

Dentro de las características que dificultan los métodos de selección en los cultivos celulares de las plantas superiores, Wersuhm (1988) señala las siguientes: a) Las suspensiones celulares contienen en su mayoría agregados de hasta varios cientos de células; b) Como ya se dijo anteriormente, las células vegetales se caracterizan por su inestabilidad genética bajo condiciones *in vitro*; c) Algunos cultivos no presentan las características esperadas, sin embargo pueden exhibir otras o desarrollar algunas nuevas, lo que indica que bajo condiciones *in vitro* la información genética no presenta una expresión normal; d) Las eficiencias de plaqueo (relación porcentual del número de células en crecimiento que se obtienen a partir del número total de células plaqueadas) son muy reducidas, ya que se ha observado que existen varios factores, mostrados en la Tabla VI, que impiden la división celular en células aisladas y bajo condiciones *in vitro*; e) Los procesos de selección natural pueden llegar a disminuir o eliminar el número de características seleccionadas artificialmente.

Aun cuando los términos variantes y mutantes se usan indistintamente, es necesario especificar que una línea celular variante es aquella que difiere de la población normal en algún rasgo observable fenotípicamente, debido a cambios genéticos o epigenéticos no comprobados; mientras que el término mutante denota una línea donde la variación ha sido detectada a nivel del gen y ésta es transmitida meióticamente.

Las líneas celulares variantes en general han sido agrupadas en cuatro categorías, en base a las cuales se han generado los diferentes métodos de selección: Categoría 1) Líneas con alguna ventaja selectiva sobre las células tipo silvestre bajo ciertas condiciones, por ejemplo líneas

resistentes a algún compuesto; Categoría 2) Líneas visualmente distinguibles de las células silvestres generalmente por presentar un compuesto colorido; Categoría 3) Líneas con alguna desventaja selectiva con respecto a las células silvestres bajo ciertas condiciones, por ejemplo líneas sensitivas a la temperatura; Categoría 4) Líneas distinguibles de las células silvestres sólo mediante análisis químico, como es el caso de la mayoría de las líneas productoras de metabolitos secundarios (Yeoman, 1986).

Para la Categoría número 1 los procedimientos de selección se basan en la resistencia de algunas de las células del total de la población a crecer bajo condiciones de crecimiento inhibitorio, para lo cual se usan principalmente aminoácidos análogos. En este caso se tienen por ejemplo líneas celulares productoras de fenoles de *Nicotiana tabacum* que fueron seleccionadas por su resistencia a la p-fluorofenilalanina análogo de la fenilalanina y precursor de la vía de estos compuestos (Palmer y Widholm, 1978; Quesnel y Ellis, 1987), asimismo Ranch y cols. (1983) obtuvieron setenta y nueve líneas de *Datura innoxia* productoras de triptofano y seleccionadas por su resistencia a crecer en presencia de 5-metilriptofano.

En cuanto al grupo número 2, en donde la selección es en base a compuestos coloridos, el procedimiento general consiste en identificar visualmente las células productoras, removerlas e iniciar los cultivos a partir de ellas. Usando este método se han logrado establecer líneas celulares de *Daucus carota* productoras de β -carotenos, asimismo se cuenta con líneas productoras de antocianinas en *Zea mays* y *Raplanappus gracilis*, entre otras (Widholm, 1980).

Cuando se intentan obtener líneas que presentan alguna desventaja selectiva respecto a la célula silvestre, caso de

la Categoría 3, se hace uso de agentes selectivos contrarios que matan sólo a las células en división. Dentro de los agentes contraselectivos más conocidos se encuentra el 5-bromodeoxiuridina (BudR), el cual al ser análogo de la timidina es incorporado en lugar de ésta dentro de la molécula de DNA de las células en división, lo que las mata espontáneamente o cuando son expuestas a la luz, quedando sólo aquellas insensibles a este compuesto.

En cuanto a la selección de líneas productoras de metabolitos secundarios (Categoría número 4), los cuales en su mayoría son no coloridos, se requiere de métodos analíticos sensitivos y específicos al producto que se desea; lo cual implica llevar a cabo análisis individuales en cada clon que permitan detectar cuantitativamente la producción del compuesto.

De esta manera, en la elección del método de selección se debe determinar dentro de cual categoría se encuentra el compuesto para así diseñar el procedimiento experimental, además de que también es necesario considerar las características biológicas de la planta.

En el caso de la Categoría 4 se tienen los métodos de selección primaria y los de selección secundaria, los primeros permiten el análisis semicuantitativo de un gran número de muestras para determinar cual de ellas presenta la mayor producción; por su parte, con la selección secundaria, totalmente cuantitativa, se confirma cual de las muestras presenta la característica deseada.

Dentro de los métodos de selección primaria más simples utilizados para la obtención de líneas celulares altamente productoras de metabolitos secundarios se tiene el llamado "squash celular", el cual permite una estimación cualitativa de la cantidad de producto en un gran número de

muestras en poco tiempo. Este método, establecido por Ogino y col. en 1978 para *Nicotiana tabacum*, consiste en extraer el metabolito de las células mediante la presión de tejido calloso sobre papel filtro, el cual posteriormente es rociado con un agente específico para detectar el metabolito en estudio, tal es el caso del reactivo de Drangendorff específico para alcaloides; aunque este método tiene ya una amplia aplicación, presenta la desventaja de requerir el uso de grandes cantidades de tejido y de ser sólo una estimación cualitativa; sin embargo, a través de su aplicación, Ogino logró obtener una línea celular de tabaco con una producción de nicotina del 3.4% peso seco. Un método alternativo y mucho más sensible, capaz de detectar picogramos de un metabolito, es el radioinmunoensayo (RIA), primeramente desarrollado por Zenk y col. (1977) para seleccionar líneas celulares de *Catharanthus roseus* productoras de ajmalicina y serpentina. Otro método de selección aun más rápido que el RIA es el uso de las características fluorescentes del compuesto de interés; este método fue diseñado por Deus y Zenk en 1982, quienes aprovechando la fluorescencia de la serpentina producida por células de *C. roseus* lograron establecer líneas celulares altamente productoras. Actualmente esta técnica es ideal como selección primaria o cualitativa por ser rápida y muy sensible, aunque debe ser luego validada por un método cuantitativo.

Los métodos microespectrofotométricos también han sido usados para analizar y seleccionar líneas celulares productoras, tal es el caso de *Anchusa officinalis* y *Colerus blumei* productoras de ácido rosmarínico (Misawa, 1985).

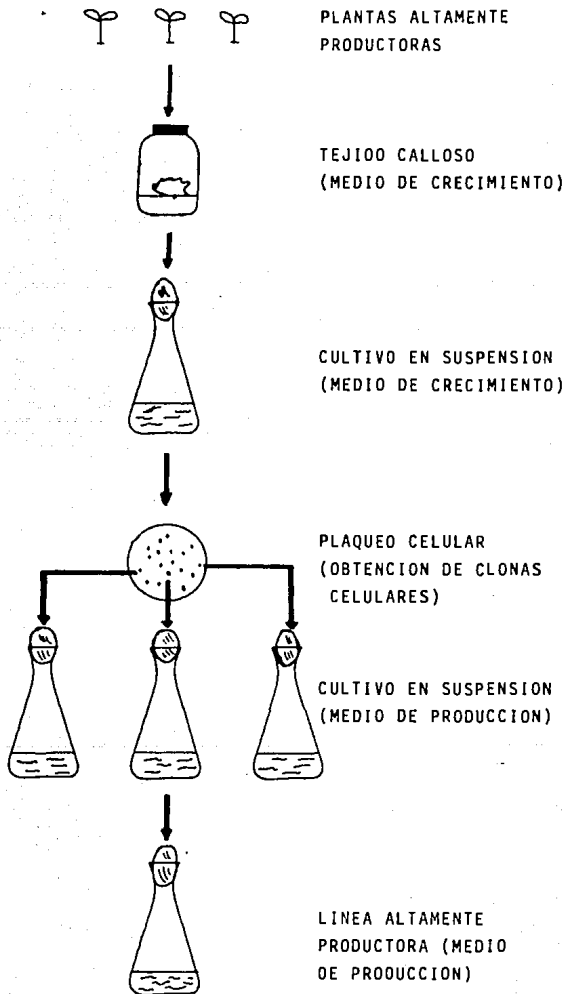
Por otro lado, el uso de métodos cromatográficos para la selección de líneas altamente productoras resultan muy adecuados por ser totalmente cuantitativos; sin embargo,

presentan la desventaja de requerir también de extractos puros por lo que se deben establecer metodologías previas de extracción y purificación del metabolito. Entre los métodos cromatográficos más usados se encuentran la cromatografía de capa fina, la cromatografía de gases y la cromatografía líquida de alta eficiencia, principalmente.

3.3.6.2. OBTENCIÓN DE LINEAS CELULARES (CLONACIÓN CELULAR).

Existen varias posibilidades de generar líneas celulares con altas producciones de metabolitos secundarios, especialmente son adecuadas las que envuelven el uso ya sea de cultivos haploides, de protoplastos o con el uso de agentes mutagénicos; sin embargo Zenk y col. (1977) lograron desarrollar un procedimiento para obtener líneas celulares altamente productoras de metabolitos secundarios explotando únicamente el potencial genético natural de la célula diploide. Este método se fundamenta primero en el conocimiento de que células derivadas de plantas de alta producción pueden producir callos con una mayor producción, y segundo, en que es posible seleccionar de estos cultivos líneas celulares estables y muy productivas. En la Figura 3 se presenta el esquema general para la obtención de líneas productoras de metabolitos secundarios propuesto por Zenk y col. en 1977., el cual se puede resumir de la siguiente manera: 1) Selección de plantas altamente productoras, 2) Establecimiento de cultivos celulares a partir de las plantas seleccionadas, 3) Obtención de líneas celulares mediante la técnica de clonación celular, 4) Selección de las líneas celulares variantes usando procedimientos analíticos sensitivos, 5) Establecimiento de una línea celular estable

FIGURA 3. PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA OBTENCION DE LINEAS CELULARES ALTAMENTE PRODUCTORAS DE METABOLITOS SECUNDARIOS (ZENK y col., 1977).



con alta capacidad de producción, y 8) Optimización del medio de producción para esa línea celular.

Aun cuando la validez de este procedimiento ha sido ampliamente establecida, actualmente existen dudas acerca de la necesidad de partir de plantas altamente productoras, lo cual se debe a que se tienen algunos trabajos recientes donde el factor de correspondencia de producción *in vivo* e *in vitro* no se cumplió, tal como sucedió al obtener dos líneas celulares de *S. roseus* productoras de triptofano y resistentes al 5-metilriptofano a partir de una planta de baja producción (Cresswell, 1980).

La técnica que generalmente se usa para obtener líneas celulares mediante clonación, es la de plaqueo celular, la cual consiste esencialmente en dispersar una suspensión de células aisladas o de pequeños agregados en un medio semisólido o en algún otro soporte que permita su desarrollo, para lo cual las suspensiones son primeramente llevadas a fraccionamiento físico, ya sea por tamizado basado en las diferencias de tamaño de los agregados y las células aisladas o por centrifugación en gradiente de densidad discontinua debido a las diferencias en gravedad específica de cada uno de ellos (Bergmann, 1977; Weber y Lark, 1979; Fujimura y Komamine, 1984).

La aplicación de este método ha permitido aislar clones celulares de un gran número de especies vegetales, tanto para fines de estudios básicos, como para generar líneas estables con altas producciones de productos naturales. Con el propósito de mantener la estabilidad de una línea es necesario someterla continuamente a programas de selección y mantenerla bajo condiciones óptimas de preservación; de esta manera se tienen líneas que se han mantenido estables por grandes periodos de tiempo, algunas de las cuales son

mostradas en la Tabla V.

El propósito principal del plaqueo celular es obtener altas eficiencias de plaqueo (relación porcentual del número de líneas celulares obtenidas por número de células plaqueadas) usando bajas densidades celulares con el fin de asegurar que la línea proviene de una sola célula. Sin embargo, se presentan serios problemas para inducir la división y la formación de agregados a partir de células aisladas, debido a que muchas veces estas células requieren mejores condiciones nutricionales, de reguladores de crecimiento y ambientales para estimular su crecimiento (Thomas y Davey, 1975).

En base a los estudios realizados por Muir en 1953 se ha establecido que los cultivos en suspensión o de callos que se encuentran en la fase exponencial de crecimiento, son capaces de promover la división de células aisladas mediante un fenómeno conocido como "efecto nodriza", lo cual indica la existencia de sustancias promotoras del crecimiento, sintetizadas por cultivos ya establecidos.

Actualmente, este efecto se aplica usando dos grandes alternativas, una de las cuales consiste en plaquear células aisladas en algún soporte (papel filtro, papel celofán, espuma de poliuretano, etc.), que descansa en tejido calloso o en suspensiones celulares en crecimiento activo (llamadas células alimentadoras). La otra alternativa se basa en el uso de medio condicionado, es decir medio de cultivo donde ya han crecido células y por lo tanto presenta sustancias promotoras del crecimiento (Thomas y Davey, 1975).

Como se observa en la Tabla VI, existen otros factores que incrementan la eficiencia de plaqueo, los cuales son determinados por las características propias de la célula, por las condiciones ambientales del cultivo, por los

TABLA V. EJEMPLOS DE LINEAS CELULARES ALTAMENTE PRODUCTORAS QUE SE HAN MANTENIDO ESTABLES A TRAVES DEL TIEMPO (Adaptado de Constabel y col., 1982; Dougall, 1985).

ESPECIE	PRODUCTO	ESTABILIDAD	REFERENCIA
<i>Ammi visnaga</i>	VISNAGINA	+	KAUL Y COL, 1987
<i>Dioscorea deltoidea</i>	DIOSGENINA	+	KAUL Y COL, 1988
<i>Panax ginseng</i>	GINSENGOSIDOS	+	FURUYA Y COL, 1972.
<i>Morinda citrifolia</i>	ANTROQUINONAS	7 AÑOS	ZENK Y COL, 1975
<i>Colus blumei</i>	AC. ROSMARINICO	8 AÑOS	ZENK Y COL, 1977
<i>Elettospermum erythrorhizon</i>	SHIKONINA	10 AÑOS	TABATA Y COL, 1978.
<i>Ipomea batatas</i>	ANTOCIANINAS	1 AÑO	NOZUE Y COL, 1987.
<i>Nicotiana tabacum</i>	NICOTINA	1 AÑO	OGINO Y COL, 1978.

+ ESTABLES POR MAS DE UN AÑO.

TABLA VI. FACTORES QUE INCREMENTAN LA EFICIENCIA DE PLAQUEO*

-
- 1. CARACTERISTICAS PROPIAS DE LAS CELULAS VEGETALES**
 - 1.1 NECESIDAD DE AGREGACION**
 - 1.2 METABOLISMO CELULAR**
 - 1.3 RESISTENCIA A LA PRESION DE SELECCION**
 - 1.4 DENSIDAD CELULAR**
 - 1.5 GRADO DE DIFERENCIACION**
 - 2. CONDICIONES DE CULTIVO**
 - 2.1 INTENSIDAD LUMINOSA**
 - 2.2 TEMPERATURA**
 - 2.3 HUMEDAD RELATIVA**
 - 3. COMPONENTES DEL MEDIO DE CULTIVO**
 - 3.1 CONCENTRACION DE REGULADORES DE CRECIMIENTO**
 - 3.2 CONCENTRACION DE SALES MINERALES**
 - 3.3 USO DE COMPLEMENTOS ORGANICOS**
 - 4. CONDICIONES QUE ESTIMULAN EL CRECIMIENTO CELULAR**
 - 4.1 USO DE MEDIO CONDICIONADO**
 - 4.2 USO DE CELULAS ALIMENTADORAS**

* **EFICIENCIA DE PLAQUEO: RELACION PORCENTUAL DEL NUMERO DE CELULAS EN CRECIMIENTO POR NUMERO DE CELULAS PLAQUEADAS.**

componentes del medio de cultivo y por condiciones especiales que promueven el crecimiento celular.

Basándose en el principio de las células alimentadoras, Smith y col. en 1984, lograron aumentar las eficiencias de plaqueo hasta un 50% en dos semanas usando suspensiones de *Zea mays* con una densidad celular de 40 células por mililitro, por otro lado encontraron que tanto la densidad celular en la capa alimentadora como el origen de las células que la constituyen juegan un papel decisivo en las eficiencias de plaqueo.

A su vez, Raveh y col. (1973) encontraron que el uso de células alimentadoras permitió aumentar las eficiencias de plaqueo y disminuir la densidad celular de 1×10^5 células por mililitro a 1×10^2 células por mililitro, evitando con esto la coalescencia de las células en división y crecimiento de *Nicotiana tabacum*. Asimismo, Brinberg y col. (1988), usando medio condicionado incrementaron diez veces la frecuencia de formación de agregados a partir de protoplastos de *Zea mays*, logrando además caracterizar parcialmente como un oligosacárido, el factor promotor de su crecimiento, sin determinar su estructura específica.

Además de los métodos que hacen uso del efecto nodriza, se han ideado otros cuyo propósito ha sido también aumentar las eficiencias de plaqueo con bajas densidades celulares; tal es el caso de los trabajos realizados por Conner y Meredith (1984) quienes probando diferentes soportes concluyeron que la espuma de poliuretano inmersa en medio líquido permitió velocidades de crecimiento mayores que en el agar, además de que permite el uso de células alimentadoras o de medio condicionado.

Una de las innovaciones más prometedoras de este método como herramienta para la selección de líneas productoras de

metabolitos secundarios, es el uso de adsorbentes que impiden la inhibición o la represión por autorregulación, ya que adsorben los metabolitos que han sido liberados por la célula al medio de cultivo; una vez que estos compuestos han sido adsorbidos pueden ser extraídos de este adsorbente sin dañar el tejido vegetal. El principio general de esta técnica se basa en la acumulación de estas sustancias en la capa adsorbente, su posterior elución y detección mediante diferentes métodos (Knoop y Beiderbeck, 1985).

Entre los adsorbentes más usados se encuentran el carbón activado sobre papel filtro y las resinas poliméricas con características lipofílicas (Knoop y Beiderbeck, 1985; Maisch y col., 1986; Thumann y col., 1987; Payne y col., 1988).

También se ha demostrado que las condiciones ambientales, principalmente la luz y la temperatura, juegan un papel muy importante en el incremento en la eficiencia de plaqueo (Nagata y Takebe, 1971; Bergmann, 1977).

Como se observa en la Tabla VI, aunado a los factores anteriores existen otros más que pueden incrementar marcadamente la eficiencia de plaqueo bajo determinadas condiciones.

Cabe mencionar que también se ha planteado la obtención de líneas partiendo no de células aisladas sino de pequeños agregados, lo cual evitaría todos los problemas concernientes a la eficiencia de plaqueo, pero provocaría mayor variabilidad en la producción debido a que se induce el desarrollo y crecimiento a partir de un gran número de células con diferente información genética. La selección de líneas a partir de pequeños agregados se realiza principalmente donde se pueda llevar a cabo una selección visual, tal como sucede con los compuestos coloridos. Como regla general se asegura que entre menor sea el tamaño del

agregado del cual se parte para la obtención de una línea, menor será la probabilidad de que en ella se presente el problema de variabilidad.

En el trabajo realizado por Watts y col. (citado en Misawa 1985) se estableció que la selección de líneas de Apio a partir de agregados de 0.5 centímetros de diámetro permitió la producción de los aceites esenciales de esta especie, mientras que ningún producto fue detectado cuando la selección se realizó a partir de pequeños agregados (0.2-0.3 centímetros de diámetro). Por su parte, Kinnersley y Dougall (1980), con este mismo procedimiento encontraron una respuesta totalmente contraria en cultivos de *Daucus carota* productores de antocianinas. A partir de la información anterior se puede concluir que es necesario conocer los mecanismos genéticos, bioquímicos, fisiológicos y regulatorios a través de los cuales la productividad se ve afectada (Dougall, 1985).

3.3.6.3 LINEAS ALTAMENTE PRODUCTORAS.

En los últimos años se han obtenido grandes progresos en el mejoramiento de la producción de metabolitos secundarios, mediante repetida selección clonal en cultivos *in vitro*. A través de este procedimiento se ha elevado la producción de ubiquinona 10, de 0.03% a cerca de 0.2% peso seco en *N. tabacum* (Matsumoto y col., 1981). Similarmemente, Ogino y (1978) col. logró mejorar dramáticamente el contenido de nicotina en callos de *N. tabacum* elevando la producción de 0.004% a 3.4%, mediante clonación celular. Por otro lado se han obtenido líneas con altas producciones de shikonina por simple selección de agregados de callo muy pigmentados, una de estas produjo 1.5 veces más que el cultivo del cual partió

(Mizukami y col., 1978; Fujita y Hara, 1985). Por su parte, Yamamoto y Yamada (1987) lograron obtener líneas de *Rauwolfia serpentina* productoras de reserpina con hasta 0.1% de producción/ peso seco, basándose únicamente en diferencias de fluorescencia.

Se han establecido además líneas celulares productoras de antocianinas en diferentes especies vegetales, para lo cual se empleó el método de selección visual seguido de la clonación celular (Kinnersley y Dougall, 1980); dentro de estas líneas se cuenta con una de *Ipomea batatas* que mediante 32 selecciones, llegó a presentar un incremento de producción de 40 veces más con respecto al callo original durante 35 subcultivos no selectivos (Nozue y col., 1987).

Yamakawa y col. (1983) lograron aislar una línea de *Vitis Hybrid*, mediante el plaqueo con células alimentadoras, la que produjo 3.4 % (peso seco) de antocianinas; a su vez, Yamamoto y col. (1982) obtuvieron una línea de *Euphorbia milli* con producciones hasta siete veces mayores que el cultivo original durante 24 selecciones.

Otra de las especies que ha sido sujeta a métodos de selección fue *Coptis japonica*, cuya importancia radica en su producción de berberina; esta línea se obtuvo a través de repetida clonación celular a partir de agregados celulares y llegó a producir 13% de berberina/ peso seco, lo que correspondió a 1.2 g/l de medio durante 27 subcultivos. Ya que este compuesto es potencialmente importante como antiséptico, su producción mediante cultivo *in vitro* ha sido estudiada por muchos investigadores, entre los que destacan los trabajos realizados por Fukui y col. (1982) y Sato y Yamada (1984).

La selección en *Lavendula vera* productora de biotina mediante el uso del ácido pimélico (precursor de esta

vitamina) como agente tóxico y por lo tanto selectivo de células con altas producciones de este compuesto, generó una línea a partir de cultivos de tallo con una producción 15 veces mayor que el cultivo del cual partió, lo que correspondió a 0.9 µg de biotina / g de células peso seco, a su vez, ésta fue 10 veces mayor que la encontrada en cultivos que partieron de hoja (Watanabe y col., 1982).

En 1983, Zieg y col., reportaron la selección de una línea productora de piretrinas a partir de *Chrysanthemum cinerariifolium* y recalcaron la importancia de usar el método de selección más adecuado, con el fin de evitar pérdidas de material y tiempo; de los resultados obtenidos en este trabajo se plantea además la posibilidad de la influencia del explante y del grado de diferenciación del cultivo sobre la producción de productos naturales, a través del Cultivo de Células Vegetales. Por su parte Cormier y Do (1988), obtuvieron líneas celulares de *Mentha piperita* productoras de monoterpenos ayudándose del uso de adsorbentes que incrementaron la capacidad biosintética de estas células, ya que su aplicación impidió la acumulación de estos compuestos en el medio nutritivo acuoso, evitando así que su actividad tóxica inhibiera la proliferación celular.

En cuanto al género *Tabacum*, la obtención de líneas productoras de capsaicinoides se ha realizado en varias especies y por diferentes autores. Entre ellos se tienen el trabajo realizado por Aitken y Yeoman (1986) en *T. frutescens* Mill, donde observaron que las líneas obtenidas por el uso de la reacción antígeno-anticuerpo entre la capsaicina y la albúmina de suero humano presentaban un alto grado de variabilidad durante los subcultivos, por lo cual propusieron para el futuro el uso de métodos de selección continua y de métodos de criopreservación para estos sistemas.

En un estudio presentado por Lindsey y Yeoman en 1985, para obtener y seleccionar líneas celulares con altas rendimientos de capsaicinoides, comprueban que la producción de estos metabolitos en *E. frutescens* varió significativamente aun en cultivos provenientes de un mismo antecesor y que no hubo ninguna correlación entre el índice de crecimiento y el contenido de clorofila, este último como indicador del grado de diferenciación celular, con la producción de capsaicinoides; de sus resultados destaca además, que la aparición de los callos de las líneas fue muy variable, sin embargo, los pálidos, compactos y friables que no presentaron clorofila en general produjeron capsaicinoides, mientras que los que presentaron clorofila podían o no biosintetizarlos.

Holden y col., en 1986, examinaron la variabilidad interclonal y la estabilidad intraclonal de líneas celulares de *E. frutescens*, con respecto a varios aspectos de crecimiento, estructura y actividad metabólica, tal como grado de friabilidad, contenido de clorofila, de proteína, índice de crecimiento, fenoles solubles y capsaicinoides presentes. Sus resultados mostraron que se presentó variabilidad en la morfología y en la capacidad biosintética, aun entre clones derivados de un mismo cultivo en suspensión, y que la inestabilidad se presentó en los subcultivos sucesivos; esto los llevó a concluir que se requiere de mayor investigación dirigida a conocer las causas de la variabilidad e inestabilidad de las líneas celulares.

Existen aun más trabajos donde se ha aplicado la técnica de clonación celular para generar líneas celulares con altas producciones de metabolitos secundarios, las cuales son resumidas en la Tabla VII. Esto resalta, la efectividad de este método para incrementar el nivel de producción basándose

exclusivamente en el potencial genético natural de las células vegetales. Sin embargo se tiene que tomar en cuenta la variación que sufren estas células, tanto en su morfología como en su metabolismo, cuando son mantenidas por largos periodos de tiempo bajo condiciones *in vitro* a través de un régimen de subcultivos, y es precisamente esta inestabilidad, entre otros factores, la que ha impedido en gran parte, el progreso en la producción comercial de compuestos de interés industrial mediante la técnica de cultivo de células vegetales.

TABLA VII. LINEAS CELULARES ALTAMENTE PRODUCTORAS DE METABOLITOS* OBTENIDAS POR PROCESOS SELECCION EN CULTIVOS *in vitro* (Adaptado de Constabel y col., 1982; Dougall, 1985).

ESPECIE	PRODUCTO	PRODUCCION DEL PRODUCTO ^{MM}	REFERENCIA
<i>Panax ginseng</i>	GINSENGOSIDOS	27/8	FURUYA Y COL., 1972.
<i>Morinda citrifolia</i>	ANTROQUINONAS	18/8	ZENK Y COL., 1975.
<i>Salvia blumei</i>	AC. ROSMARINICO	15/8	ZENK Y COL., 1977.
<i>Lithospermum erythrorhizon</i> 1978.	SHIKONINA	12/8	TABATA Y COL.,
<i>Cassia tora</i>	ANTROQUINONAS	8/10	TABATA Y COL., 1975.
<i>Dioscorea deltoidea</i>	DIOSGENINA	2/1	KAUL Y COL., 1968.
<i>Stephania cepharantha</i>	BISCOCLAURINA	2.3/3	AKASU Y COL., 1976.

* RESPECTO A LOS CULTIVOS *in vivo*.

** X PESO SECO/FACTOR DE INCREMENTO RESPECTO AL CULTIVO *in vivo*.

ESPECIE	PRODUCTO	PRODUCCION DEL PRODUCTO	REFERENCIA
<i>Coffea arabica</i>	CAFEINA	1.0/1	FRISCHKNECHT Y COL, 1977.
<i>Catharanthus roseus</i>	AJMALICINA	1/3	ZENK Y COL, 1977.
<i>Andropogon paniculate</i>	PANICULINA B	0.9	BUTCHER Y COL, 1971.
<i>C. roseus</i>	SERPENTINA	0.8/1.0	ZENK Y COL, 1977.
<i>C. roseus</i>	SERPENTINA	0.5/1	DOLLER Y COL, 1976.
<i>Nucleaya microcarpa</i>	PROTOPINA	0.4/1.3	KOBLITZ Y COL, 1975.
<i>Ammi visnaga</i>	VISNAGINA	0.3/3	KAUL Y COL, 1967.
<i>Nicotiana tabacum</i>	GLUTATINA	1/10	BERGMANN Y COL, 1978.
<i>N. tabacum</i>	UBIQUINONA 10	0.5/100	MATSUMOTO Y COL, 1982.
<i>N. tabacum</i>	NICOTINA	0.9	KINNERSLEY Y COL, 1980.
<i>Papaver somniferum</i>	CODEINA	0.15	TAM Y COL, 1980.

CONTINUACION TABLA VII.

ESPECIE	PRODUCTO	PRODUCCION DEL PRODUCTO	REFERENCIA
<i>Peganum harmala</i>	SEROTONINA	1-2	SASSE Y COL., 1982.
<i>S. roseus</i>	CATARANTINA	0.005	KUTNEY Y COL., 1980.
<i>Papaver somniferum</i>	ALCALOIDES	5.6	KHANNA Y COL., 1975.
<i>Nicotiana rustica</i>	NICOTINA	0.29	TABATA Y COL., 1976.
<i>Daucus carota</i>	CAROTENOIDES	0.07	TOWNSLEY, 1977.
<i>N. tabacum</i>	NICOTINA	3.4	OGINO Y COL., 1978.
<i>Hyoscyamus niger</i>	ESCOPOLAMINA	0.002	YAMADA Y COL., 1982.
	HIOSCIAMINA	0.02	
<i>Galium mollugo</i>	AC. SHIKIMICO	10.0	AMRHEIN Y COL., 1980.
<i>N. tabacum</i>	PUTRESCINAS DE CINAMOL	10.0	BERLIN Y COL., 1982.
<i>Coptis japonica</i>	BERBERINA	9.2	SATO Y COL., 1984.
<i>Thalictrum minus</i>	BERBERINA	12.1	NAKAGAWA Y COL., 1984.
<i>Salvia officinalis</i>	AC. ROSMARINICO	5.75	DEEKHAMKUL Y COL., 1984.

CONTINUACION TABLA VII.

ESPECIE	PRODUCTO	PRODUCCION DEL PRODUCTO	REFERENCIA
<i>Yucca hybrid</i>	ANTOCIANINAS	18.0	YAMAKAWA Y COL, 1982.
<i>Schinus molle</i>	HAFTOQUINONAS	12.3	FUKUI Y COL, 1982.
<i>Pistia stratiotes</i>	ANTROQUINONAS	22.18	SCHULTE Y COL, 1984.
<i>Yucca major</i>	LACTATO DE ESTRICTOSIDINA	0.1	EILERT Y COL, 1987.
<i>Chenopodium rubrum</i>	BETALANINAS	0.4	BERLIN Y COL, 1986.
<i>Rauwolfia serpentina</i>	RESERPINA	0.1	YAMADA Y COL, 1987.
<i>Chrysanthemum cinerariifolium</i>	PIRETRINAS	0.11	ZIEG Y COL, 1982.
<i>Digitalis lanata</i>	DIGOXINA	0.8	WEILER Y COL, 1970.

CONTINUACION TABLA VII.

3.3.6.4. VARIACION SOMACLONAL.

La inducción de mutaciones por medios físicos y químicos ha sido usada como herramienta adjunta a los procesos convencionales para el mejoramiento de las plantas, de esta manera y con el establecimiento de las consideraciones teóricas del tipo, dosis del mutágeno y tipo de herencia de los cambios genéticos resultantes por su uso, la mutagénesis ha pasado de ser una rama científica a un método convencional de mejoramiento vegetal. Sin embargo, el éxito total de estos métodos ha sido impedido por varios factores, entre los que sobresalen la alta frecuencia de mutaciones recesivas, la presencia de mosaicos y la gran ocurrencia de cambios cromosómicos gruesos, que en conjunto han dificultado el establecimiento de líneas estables. Por otro lado, tanto los métodos de mejoramiento convencionales como la mutagénesis, son procesos que requieren una gran cantidad de tiempo y disponibilidad de material vegetal, de tal manera que la Variación Somaclonal de los cultivos *in vitro* se ha considerado como una alternativa a los métodos anteriores, ya que es esta una fuente nueva de variabilidad genética dentro del mejoramiento vegetal (Clarkin y Scowcroft, 1981; Evans, 1980).

El concepto original de Variación Somaclonal fue establecido por Larkin y Scowcroft en 1981, quienes lo definieron como aquellos cambios genéticos o epigenéticos que surgen como consecuencia del uso de Cultivo de Tejidos y que son reflejados tanto en las células *in vitro* como en las plantas regeneradas a partir de ellas. Esta variabilidad genética es resultado tanto de diferencias somáticas preexistentes en las células somáticas, así como de cambios

inducidos por los componentes del medio de cultivo, sobretodo de los reguladores de crecimiento (Lorz y Scowcroft, 1982).

Las bases genéticas de este fenómeno no han sido totalmente dilucidadas, sin embargo se ha observado que la variación se da por cambios genéticos y epigenéticos. Los cambios epigenéticos son de hecho inducidos por las condiciones del cultivo *in vitro* sobre el tejido vegetal y por lo tanto son únicos de la Variación Somacional, estos cambios son el resultado de modificaciones en la expresión de los genes ya sea a nivel de transcripción, traducción y/o post-traducción, los cuales se manifiestan de manera pasajera y son potencialmente reversibles, por lo que no son útiles dentro de los fines del mejoramiento vegetal (Meins, 1983; Mantell, 1986; Evans, 1980).

En cuanto a los cambios genéticos, la poliploidía es la anomalía cromosómica más frecuente dentro de la Variación Somacional (Partonen, 1983); además se presentan rearrreglos cromosómicos, cambios en genes citoplasmáticos, intercruzamiento mitótico, activación de elementos transposones, cambios inducidos por los diferentes tipos celulares del explante y cambios en la expresión de ciertas familias de multigenes, todos ellos a continuación serán brevemente resumidos.

3.3.6.4.1. CAMBIOS EN EL NUMERO DE CROMOSOMAS.

El cultivo *in vitro* de células vegetales puede originar células o plantas aneuploides, llamadas somaclones. Estos incluyen monosomias ($2n - 1$) y trisomias ($2n + 1$); se ha observado además que su frecuencia aumenta con el tiempo y que generalmente están asociadas con fertilidad reducida y

con proporciones genéticas modificadas en la progenie de plantas autofertilizadas (D'Amato, 1979; Bayliss, 1980).

Se han detectado similares cambios genéticos en un solo gen (dominante, semidominante o recesivo) en somaciones de numerosas especies vegetales tales como el arroz, trigo, maíz, lechuga, tabaco, tomate, etc., de las cuales resalta la variante somacional para el gen de la alcoholdehidrogenasa en maíz (Dennis y col., 1987).

3.3.6.4.2. REARREGLOS CROMOSOMICOS

Existen un gran número de reportes donde se han comprobado estructuras cromosómicas modificadas en células *in vitro* (Bayliss, 1980).

Estos rearreglos incluyen translocaciones, deleciones, inversiones, fusiones y amplificación de algunos segmentos. Estos cambios, por pequeños que sean, pueden alterar la expresión y la transmisión genética de genes específicos para la producción de un compuesto particular. Lee y Phillips (1987) han sugerido dos mecanismos que intervienen en la aparición de estos cambios genéticos: a) La replicación tardía de la heterocromatina, y b) Desbalances en los nucleótidos como consecuencia de la composición del medio de cultivo.

3.3.6.4.3. CAMBIOS EN GENES CITOPASMATICOS.

Los cambios en genes de cloroplastos y mitocondrias de células vegetales ocurren en una muy alta frecuencia bajo condiciones *in vitro*. El trabajo más detallado sobre este aspecto ha sido el realizado por Earle y col. (1987), quienes observaron que la esterilidad y la resistencia a la toxina T

en *Zea mays* se encontraban controladas por DNA mitocondrial.

3.3.6.4.4. INTERCRUZAMIENTO MITOTICO.

La aparición de mutantes homocigotas recesivas en plantas regeneradas a partir de cultivos *in vitro*, puede deberse a procesos de intercruzamiento mitótico (MCO). El MCO es una fuente de variación única a la Variación Somaclonal. Con el propósito de documentar el MCO, Leh y cols. (citado en Evans 1989) regeneraron plantas de tomate a partir de 9 líneas con 8 genes en condición heterocigota y observaron que 19 de las 81 plantas regeneradas sufrieron el fenómeno de intercruzamiento mitótico.

3.3.6.4.5. ACTIVACION DE TRANSPOSONES.

Existe ya bastante evidencia de que la actividad de elementos transposones aumenta en una gran proporción durante el cultivo *in vitro*. En maíz la actividad del componente activador del transposón Ac-Ds fue detectada en 3 de 94 plantas derivadas independientemente, sugiriendo una alta frecuencia de procesos de recombinación (Benzion y col., 1986). La activación de elementos silenciosos no caracterizados ha sido también sugerida por Larkin (1987) en tabaco y alfalfa.

3.3.6.4.6. CAMBIOS INDUCIDOS POR EL EXPLANTE.

Un aspecto interesante de la Variación Somaclonal que no ha sido totalmente explorado, es el potencial para obtener una variante específica a alta frecuencia dependiendo del tejido donador. A medida de que más reportes aparecen, se

acentúa la idea de que el cambio del gen deseado es probablemente propiciada por los tipos celulares del explante usado, al iniciar el cultivo celular (Evans, 1989).

3.3.6.4.7. EXPRESION ALTERADA EN FAMILIAS DE MULTIGENES

En base a los análisis genéticos a nivel molecular que se han llevado a cabo, más evidencia se acumula de la presencia de familias de multigenes y de su diferente regulación inducida por las condiciones *in vitro*. De hecho, Larkin y col. (1985), han postulado que estos rearrreglos alteran la regulación de la expresión de la familia, de tal manera que un gen que se expresaba pasa a ser reprimido y otro que era silencioso pasa a ser expresado.

El estudio de este fenómeno es una herramienta valiosa si se considera que algunos genes importantes agrónomicamente son codificados por familias de multigenes, por ejemplo genes que codifican para gliadinas, gluteninas, α -amilasas, entre otros.

3.3.6.5. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA VARIACION SOMACLONAL.

El uso de la Variación Somaclonal como fuente de variabilidad genética presenta un gran número de ventajas y desventajas. Entre las ventajas más sobresalientes se tienen: a) Se puede inducir a una velocidad mayor, la aparición de variabilidad que permita llevar a cabo la selección en especies de importancia agrónómica o industrial con el propósito de mejorarlas en una determinada característica; b) Se pueden obtener plantas o cultivos *in vitro* a partir de una sola célula, mediante la técnica de clonación celular,

evitando con esto la aparición de mosaicos típicos de la mutagénesis y la posibilidad de obtener líneas celulares variantes con características diferentes a las esporadas, por consiguiente, se tiene la ventaja de obtener líneas más estables en un periodo de tiempo más corto; c) Se favorece la aparición de nuevas variantes o mutantes, ya sea por la activación de transposones o por el fenómeno de intercambio mitótico, principalmente, los cuales no aparecen por mutagénesis o métodos convencionales de mejoramiento; d) Mediante el uso del Cultivo de Tejidos Vegetales es posible acoplar la inducción de variación, con la selección a nivel celular. Por la aplicación de esta técnica se han aislado mutantes resistentes a herbicidas, a fitotoxinas y a diferentes enfermedades (Chaleff, 1983).

Como consecuencia de las ventajas anteriores, parece ser que muchos de los cambios genéticos inducidos por el cultivo *in vitro* alteran el metabolismo secundario. Basándose en este aspecto, la Variación Somaclonal se ha aplicado como técnica para establecer líneas celulares con elevada producción de estos compuestos; de hecho, actualmente se tienen varios cultivos *in vitro* que se han generado gracias a la Variación Somaclonal, entre los que destacan aquellos que producen shikonina (*Lithospermum erythrorhizon*), ajmalicina (*Catharanthus roseus*), berberina (*Coptis japonica*), y antocianinas (*Vitis hybrid*).

Aun cuando la Variación Somaclonal presenta grandes ventajas en su aplicación, también se tienen desventajas, entre las que se encuentran las siguientes: a) La variación generada por este fenómeno es muy azarosa, ya que pueden obtenerse un gran número de variantes, por lo que es necesario analizar un gran número de clones hasta obtener el que presenta el rasgo de interés; sin embargo, una vez que

esta variante ha sido elegida se tiene la posibilidad de que su rango de variación sea muy pequeño si se compara con alguna otra obtenida mediante mutagénesis; b) La variación se ve influenciada por un gran número de factores, entre los que destacan el material genético de la célula, la composición del medio de cultivo y las condiciones del cultivo, por lo que dentro de un proceso de selección basado en la Variación Somaclonal se debe de plantear y delimitar perfectamente bajo que condiciones ambientales y nutricionales se mantendrá ese cultivo; c) La Variación Somaclonal es debida a cambios genéticos y epigenéticos inducidos por las condiciones *in vitro*, por lo que es factible que las líneas obtenidas sufran cambios a través de una generación a otra, lo que redundará en el grado de estabilidad del cultivo en el rasgo deseado (Kibler y Neumann, 1980; Ellis, 1982; Mantell, 1988; Scowcroft y Larkin, 1988; Holden y col., 1988; Evans, 1989).

Con estos antecedentes es posible plantear la explotación de la Variación Somaclonal resulta una alternativa muy llamativa para obtener líneas celulares productoras de metabolitos secundarios, ya que a pesar de ser una estrategia semiempírica requiere de menos tiempo que los métodos convencionales y la mutagénesis. Este fenómeno da la posibilidad de reselectionar una línea pre-establecida con el fin de aumentar su rendimiento, pero sobretodo de mantener su estabilidad, se debe de tomar en cuenta que aun cuando una línea ha sido establecida es posible que sufra cambios genéticos o epigenéticos que redunden en su producción, lo cual es factible considerando el fenómeno de Variación Somaclonal.

4. MATERIALES Y METODOS.

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO.

Para la realización del presente trabajo se usaron semillas de las siguientes especies de *Xanthoxylum*:

X. annuum var. *annuum* (Jalapeño cultivar Jarcocho): Originario de Veracruz, Oaxaca y Chihuahua. Clasificado como picante; las semillas de esta especie fueron proporcionadas por la Promotora Nacional de Semillas (PRONASE) de la SARH obtenidas a su vez de cultivares mejorados.

X. annuum var. *glabrescens* (Chiltepín): Originario de Sonora, de origen silvestre y clasificado como extremadamente picante. Para esta especie las semillas fueron colectadas manualmente de frutos de plantas silvestres obtenidos en el mercado de La Merced.

X. chinense (Habanero): Originario de Yucatán. Considerado como extremadamente picante. En este caso las semillas fueron proporcionadas por PRONASE (SARH).

4.2 MEDIOS DE CULTIVO.

Los medios de cultivo empleados en este estudio fueron seleccionados de acuerdo a los resultados obtenidos previamente por el grupo de trabajo (Rodríguez y Ramos, 1986; Velázquez, 1988; Rodríguez, 1989), los cuales fueron los siguientes:

MS. Medio mineral de Murashige y Skoog, 1962.

SH. Medio mineral de Schenk y Hildebrandt, 1972.
cuyas composiciones se muestran en la Tabla VIII.

Para la obtención de plántulas se indujo la germinación

TABLA VIII. COMPOSICION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO DE MURASHIGE Y SKOOG (1962) Y SCHENK Y HILDEBRANDT (1972).

COMPUESTO	CONCENTRACION EN EL MEDIO (M)	
	MS	SH
NH_4NO_3	2.06×10^{-2}	-----
KNO_3	1.68×10^{-2}	2.50×10^{-2}
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.00×10^{-3}	1.50×10^{-3}
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.50×10^{-3}	1.50×10^{-3}
KH_2PO_4	1.25×10^{-3}	-----
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	-----	2.50×10^{-3}
SACAROSA	8.80×10^{-2}	8.80×10^{-2}
KI	5.00×10^{-6}	6.00×10^{-6}
H_3BO_3	1.00×10^{-4}	1.30×10^{-4}
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.99×10^{-5}	5.00×10^{-5}
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.00×10^{-6}	4.10×10^{-7}
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.00×10^{-7}	8.00×10^{-7}
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.00×10^{-7}	4.20×10^{-7}
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.99×10^{-5}	3.50×10^{-5}
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.00×10^{-4}	5.40×10^{-5}
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.00×10^{-4}	5.40×10^{-5}
MIO-INOSITOL	4.00×10^{-4}	5.80×10^{-3}
ACIDO NICOTINICO	4.00×10^{-6}	4.10×10^{-5}
PIRIDOXINA HCl	2.40×10^{-6}	2.40×10^{-6}
TIAMINA HCl	3.00×10^{-7}	1.50×10^{-5}
GLICINA	3.00×10^{-5}	-----

in vitro de las semillas de *Epilobium* en los siguientes medios de cultivo:

MS1. Sales minerales del medio MS suplementado con 30 g/l de sacarosa y 1.5 g/l de gelrite (Kelco Division of Merck & Co., Inc.) como soporte.

SH1. Sales minerales del medio SH suplementado con 30 g/l de sacarosa y 1.5 g/l de gelrite.

Para la inducción de tejido calloso se inculcó el hipocotilo de cada plántula en los medios de cultivo:

MS2. Sales minerales del medio MS suplementado con 30 g/l de sacarosa, 1.5 g/l de gelrite y la auxina ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en una concentración 9.75 μ M

SH2. Sales minerales del medio SH suplementado con 30 g/l de sacarosa, 1.5 g/l de gelrite y diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento específicos para cada especie de chile, las cuales se muestran en la Tabla IX.

Los cultivos en suspensión se hicieron en matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad y con 50 ml de los siguientes medios de cultivo:

MS3. Sales minerales del medio MS suplementado con 30 g/l de sacarosa y la auxina 2,4-D en una concentración 9.75 μ M.

SH3. Sales minerales del medio SH suplementado con 30 g/l de sacarosa y las mismas concentraciones de reguladores de crecimiento que se usaron durante la inducción de callo en cada especie de chile (Tabla IX).

En la preparación de los medios de cultivo se empleó agua desionizada obtenida en una columna mixta Barnstead (Sargent-Welch Scientific Co.); el pH se ajustó a 5.7 para los medios MS y a 5.8 para los SH, en un potenciómetro Fischer Accument Modelo 525, usando soluciones de KOH y HCl

TABLA IX. CONCENTRACION DE LOS REGULADORES DE
 CRECIMIENTO UTILIZADOS EN LOS CULTIVOS
 DE CALLO, SUSPENSION E INDUCCION DE
 CLONES DE LAS ESPECIES DE *Eupatium*.

ESPECIE	MEDIO DE CULTIVO	REGULADOR DE CRECIMIENTO	CONCENTRACION (μ M)
<i>E. annuum</i> var. <i>annuum</i>	SH ^a	CINETINA	0.093
		2,4-D	9.300
<i>E. annuum</i> var. <i>glaberrimum</i>	MS ^b	2,4-D	8.750
		CINETINA	0.485
		2,4-D	2.260
<i>E. chinense</i>	SH	pCPA	10.700
		MS	2,4-D
<i>E. chinense</i>	SH	CINETINA	0.093
		2,4-D	9.300
		MS	2,4-D

a) MEDIO MINERAL DE SCHENK & HILDEBRANDT(1972).

b) MEDIO MINERAL DE MURASHIGE & SKOOG (1962).

2,4-D: AC. 2,4 DICLOROFENOXIACETICO.

pCPA: p CLOROFENOXIACETICO.

ambas a 0.1 N según se requirieran.

Todos los medios de cultivo fueron esterilizados en una autoclave a 15 lb/pulg² durante 15 minutos, manipulándolos posteriormente bajo condiciones de asepsia en una campana de flujo laminar (Marca Veco), de aire filtrado.

4.3 ACONDICIONAMIENTO Y DESINFESTACION DE LAS SEMILLAS.

Para la germinación *in vitro* las semillas fueron sometidas a diferentes métodos de acondicionamiento y desinfestación, con el propósito de acondicionarlas para aumentar este porcentaje. Para *S. annuum* var. *annuum* consistió en remojar las semillas en agua destilada durante 48 horas, posteriormente se desinfestaron con etanol absoluto durante un minuto seguido por su inmersión en hipoclorito de sodio comercial (cloralex) al 2.5% v/v (Cloro activo) durante 10 minutos y finalmente 3 enjuagues con agua destilada estéril.

Para *S. annuum* var. *glabriusculum* el acondicionamiento consistió en escarificarlas en ácido sulfúrico 0.5 M durante 5 minutos seguido de su inmersión en etanol absoluto un minuto y luego en hipoclorito de sodio al 1.0% v/v durante 20 minutos, y por último 3 enjuagues con agua destilada estéril.

En el caso de *S. chinense* las semillas se remojaron en agua destilada durante 24 horas, luego se sumergieron un minuto en etanol absoluto y 20 minutos en hipoclorito de sodio al 1.0% v/v, para terminar con 3 enjuagues con agua destilada estéril.

El procedimiento general para el acondicionamiento y desinfestación en cada especie se describe en la Tabla X.

TABLA X. METODOS DE ACONDICIONAMIENTO Y DESINFESTACION DE LAS SEMILLAS DE *Capsicum*.

ESPECIE	H ₂ SO ₄		ACONDICIONAMIENTO		DESINFESTACION*		
	C	T	REMOJO EN H ₂ O DEST.	REMOJO EN ELOH 100%	HIPOCLORITO DE SODIO C.Cl	T	AGUA DEST. ESTERIL
<i>C. annuum</i>	-----		48 HRS.	1 MIN.	2.5%	10'	3 VECES
var. <i>annuum</i>							
<i>C. annuum</i>	0.5M	5'	-----	1 MIN.	1.0%	20'	3 VECES
var. <i>glaberrimum</i>							
<i>C. chinense</i>	-----		24 HRS.	1 MIN.	1.0%	20'	3 VECES

* BAJO CONDICIONES DE ASEPSIA.

C= CONCENTRACION.

T= TIEMPO.

C.Cl= CONCENTRACION DE CLORO ACTIVO.

4.4 GERMINACION Y OBTENCION DE PLANTULAS.

Una vez que las semillas fueron acondicionadas y desinfectadas se procedió a inducir su germinación, para lo cual fueron inoculadas en frascos gerber con 25 mililitros de los medios de cultivo MS1 y SH1 y mantenidas a $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y a una intensidad luminosa continua de 2800 lux proporcionada por lámparas de luz fluorescente (blanco frío) de 32 watts.

Ya obtenidas las plántulas se procedió a separarlas y rotularlas de manera individual con el fin de llevar a cabo su seguimiento a través de todos los pasos experimentales hasta la obtención de líneas celulares.

4.5 INDUCCION Y DESARROLLO DE TEJIDO CALLOSO.

Para la inducción de tejido calloso se utilizaron fragmentos de hipocotilo de aproximadamente un centímetro de longitud y que provenían de cada plántula germinada *in vitro* con 3 a 4 semanas de edad; estos fueron inoculados en los medios de cultivo MS2 o SH2, dependiendo del medio donde habían germinado.

En la inducción de callo se emplearon frascos de vidrio (Gerber) con 25 mililitros de medio de cultivo y mantenidos a una temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y a una intensidad luminosa continua de 2800 lux (Velázquez, 1988; Rodríguez, 1989).

4.6. ESTABLECIMIENTO DE LOS CULTIVOS EN SUSPENSION.

Los cultivos en suspensión se establecieron mediante la inoculación de 20 a 40 g/L (peso fresco) de tejido calloso en matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad y con 50 ml de los

medios de cultivo MS3 o SH3.

Estos cultivos se incubaron en una agitadora rotatoria (New Brunswick Scientific Co., Inc. modelo 853), a una velocidad de 80 rpm y con una amplitud de giro de 2 pulgadas. La temperatura se mantuvo en $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ a través de un sistema de aire acondicionado, y una iluminación continua de 2800 lux. Los cultivos fueron resemebrados quincenalmente.

Cabe aclarar que para la obtención de las líneas celulares se usaron suspensiones con menos de cinco subcultivos, y que para la obtención de células alimentadoras se tomaron cultivos en suspensión que se encontraban en la fase exponencial de crecimiento (aproximadamente de 6 a 8 días después de la última resiembra).

4.7 OBTENCIÓN DE CELULAS AISLADAS.

Para la obtención de células aisladas se emplearon células en suspensión que se encontraban en la fase de crecimiento exponencial (cultivos con 6 a 8 días después de su última resiembra); estos cultivos fueron filtrados y lavados con medio de cultivo nuevo a través de una serie de mallas de acero inoxidable cuyo diámetro menor fue de 50 μm , con el fin de obtener suspensiones con células aisladas y/o pequeños agregados de no más de cinco células. Una vez que se tuvieron, se dejaron sedimentar durante 45 minutos para luego eliminar el medio de cultivo sobrenadante hasta llegar a un volumen de 30 a 50 mililitros, a partir del cual se llevo a cabo el plaquero celular.

Para obtener las eficiencias de plaquero (relación porcentual del número de células en crecimiento activo que se obtienen por número de células que se plaquean), las suspensiones conteniendo las células aisladas, fueron

divididas en seis volúmenes de 0.5 a 3.0 mililitros en intervalos de 0.5 mililitros cada uno y por triplicado, de manera que el número de clones obtenidos fue un promedio de los tres volúmenes correspondientes.

La concentración celular, considerada como número de células por mililitro, fue determinada en cada suspensión mediante el conteo de la misma, en la cámara de Newbawer, donde además se estableció si estaba formada por células aisladas o por agregados celulares. En caso de que más del 10% de las células contadas fueran agregados de más de cinco células se decidió eliminar esa suspensión para con esto evitar que las líneas provinieran de grandes agregados celulares, y con ello evitar la variabilidad celular.

4.8 PLAQUEO CELULAR.

Una vez que se tuvieron los diferentes volúmenes de la suspensión celular filtrada, se procedió a realizar el plaqueo de los mismos, para lo que se usaron los siguientes métodos (Figura 4):

a) Método de Incorporación: en el cual cada uno de los volúmenes se mezcló con 20 ml de medio de cultivo MS2 o SH2, dependiendo del medio donde provenía la suspensión, a punto de gelificar (35-37°C) y se vertieron en cajas petri (Figura 4a).

b) Método de Weber y Lark modificado: esta segunda alternativa se fundamentó en el método de Weber y Lark (1970), para lo cual se usaron cilindros de espuma de poliuretano de un centímetro de grosor y 8.5 cms. de diámetro, previamente sometidos a un tratamiento con HCl 0.1 N durante 12 horas y enjuagados abundantemente con agua destilada (Conner y Meredith, 1984). Estos cilindros sirvieron como soporte de un

sistema, que consistió en colocar dentro de una caja petri (de 9x2 cms.) esta base de poliuretano, embebida en 30 ml de medio con células alimentadoras (medio de cultivo fresco con células que se encuentran en la fase logarítmica de crecimiento), o medio condicionado (medio de cultivo donde ya hubo crecimiento celular), para luego sobreponer una hoja de papel filtro (de 8.5 cms. de diámetro), una vez construido este sistema, se procedió a vertir sobre el papel cada uno de los volúmenes de la suspensión a plaquear, posteriormente las cajas de sellaron con parafilm (Figura 4b).

c) Metodo Weber y Lark modificado*: este método no fue sino variante del anterior, donde en lugar de usar cajas petri de 9 x 2 cms. se usaron cajas de 5 x 1.5 cms. y cilindros de poliuretano de 0.5 cms. de grosor y 4.5 cms. de diámetro (Figura 4c).

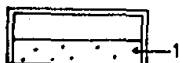
d) Metodo Horsch modificado: en esta opción se usó el principio establecido por Horsch y Jones (1980), donde las células fueron plaqueadas sobre círculos de papel filtro de 5.5 cms. de diámetro, el cual a su vez se colocó sobre medio semisólido MS2 o SH2 en frascos de vidrio (Gerber) (Figura 4d).

e) Metodo de Horsch modificado*: esta última alternativa consistió de un sistema formado por el medio semisólido MS2 o SH2 en frascos gerber sobre el cual se colocó una base de poliuretano de 0.5 cms. de grosor y 5.5 cms. de diámetro, previamente tratada con HCl 0.1 N (Conner y Meredith, 1984), y embebida en 10 ml de suspensión con células alimentadoras; sobre la espuma se colocó además una hoja de papel filtro del mismo diámetro, donde se vertieron los diferentes volúmenes a plaquear (Figura 4e).

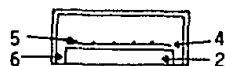
Todos estos sistemas fueron incubados a una temperatura de $26^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ y a una intensidad luminosa continua de 50 lux.

FIGURA 4. ESQUEMATIZACION DE LOS METODOS DE PLAQUEO CELULAR.

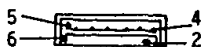
a) INCORPORACION



b) WEBER Y LARK MODIFICADO



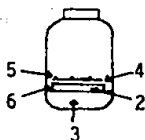
c) WEBER Y LARK MODIFICADO*



d) HORSCH MODIFICADO



e) HORSCH MODIFICADO*



1. MEDIO SEMISOLIDO
MAS CELULAS AISLADAS
2. SOPORTE DE POLIURETANO
3. MEDIO SEMISOLIDO

4. PAPEL FILTRO
5. CELULAS AISLADAS
6. CELULAS ALIMENTADORAS
EN MEDIO LIQUIDO

Es necesario mencionar que todos los instrumentos y materiales usados en cada método fueron previamente esterilizados en una autoclave a 15 lb/pulg² durante 15 minutos y posteriormente, manejados bajo condiciones de asepsia en una campana de flujo laminar.

Una vez obtenidas los clones, pequeños callos de aproximadamente 3 a 4 milímetros de diámetro, se indujo su proliferación celular mediante su resiembra individuales cada 30 días en los medios semisólidos MS2 o SH2.

Como ya se mencionó en el inciso 4.7, la suspensión a plaquear se dividió en seis diferentes volúmenes, cada uno por triplicado, con el propósito de calcular las eficiencias de plaqueo, de tal forma que los clones por volumen fueron un promedio de los encontrados en los tres frascos o cajas petri.

Por otro lado, las células alimentadoras fueron colectadas de suspensiones en la fase exponencial de crecimiento (6 a 8 días después de la última resiembra) y fueron resuspendidas en medios frescos MS3 o SH3 en una concentración de 20 a 40 g/l. Cabe aclarar que las células alimentadoras siempre correspondieron a las mismas suspensiones de las células a plaquear.

4.9 SELECCION PRIMARIA DE CLONES PRODUCTORES DE CAPS

Para llevar a cabo la selección primaria de las líneas productoras de capsaicinoides se adaptó el método cualitativo establecido por Ogino en 1978. En esta modificación se usó el reactivo de Gibbs (2,6-dicloro-p-benzoquinona-4-cloroimina), el cual al reaccionar con los alcoholes p-hidroxibencilicos presentes en la molécula de los capsaicinoides genera un coloración azul (Gierer, 1954), de la siguiente manera:

Los clones que fueron separados y sembrados de manera individual se colocaron sobre hojas de papel filtro de 5.5 cms. de diámetro que a su vez descansaban en el medio semisólido MS2 o SH2 en frascos gerber. Estos callos se dejaron crecer 30 días y luego se resembraron directamente en el medio de cultivo. Los papeles filtro donde crecieron los clones se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 horas para luego determinar cualitativamente su contenido de capsaicinoides con el reactivo de Gibbs, de acuerdo a la metodología establecida por Rajpoot y Govindarajan (1981): una vez secos, los papeles se rociaron hasta su saturación con el reactivo de Gibbs al 0.1% en acetato de etilo, se dejaron secar y se embebieron en una solución búffer de boratos a pH 9.8, se mantuvieron 24 horas bajo condiciones de obscuridad para que se secaran y generarán una coloración azul en caso de haber capsaicinoides.

Los papeles que presentaron color azul fueron comparados con papeles con concentraciones definidas de soluciones estandar de capsaicinoides (Sigma 98%), de tal manera que fueron clasificados según la intensidad del color con las siguientes marcas:

MARCA	COLOR (AZUL)	CANTIDA DE CAPSAICINA (µg/s)
1	MUY LEVE	3.6 A 50
2	LEVE	50.0 A 100
3	REGULAR	100.0 A 150
4	BUENA	> 150

Los clones cuyos papeles fueron clasificados como 4. Buenos y 3. Regulares, fueron tomados para establecer sus cultivos en suspensión donde se llevó a cabo la selección

secundaria. Cabe aclarar que aun cuando los clones que interesaban eran los productores, también se realizó selección secundaria en clones catalogadas como 1. Muy leves y 2. Leves, con el propósito de validar la selección primaria, además de que se estudió su estabilidad.

Para descartar la posible interferencia de otros compuestos propios de la ruta metabólica de los capsaicinoides, se hicieron pruebas preliminares tanto en cromatografía en papel, como de manera puntual usando estos precursores y el reactivo de Gibbs como detector, de acuerdo a los métodos establecidos por Joint Comm of the Pharm. Soc. and the Soc. for Anal. Chem. on Met. of Assay of Crude Drugs (1964), Pankar y Magar, (1977) y Rajpoot y Govindarajan, (1981).

4.10 SELECCION SECUNDARIA DE CLONES PRODUCTORES DE CAPS.

Los clones ya seleccionados fueron llevados a cultivos en suspensión en los medios MS3 o SH3 de acuerdo al cultivo de donde provenían.

Ya establecidos los cultivos se procedió a extraer y a cuantificar a los capsaicinoides del medio de cultivo sobrenadante mediante la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), según el inciso 4.13, refiriéndolos como cantidad de capsaicina por gramo de peso seco de biomasa. De esta manera se determinaron las líneas con mayor producción y se relacionó este método cuantitativo con el método cualitativo de Gibbs. En la Figura 8 se resume la metodología para la obtención de líneas celulares productoras de capsaicinoides.

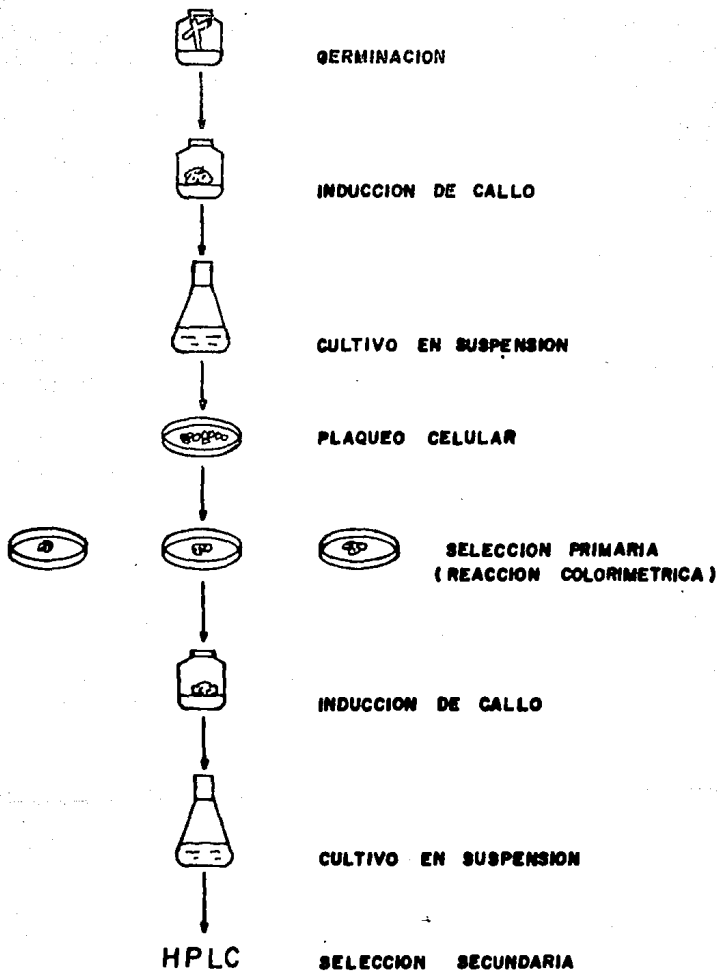


DIAGRAMA DE LA METODOLOGIA PARA LA OBTENCION DE CLONAS DE Capsicum PRODUCTORAS DE CAPSAICINOIDES.

4.11 INDICE DE CRECIMIENTO.

Con el objetivo de determinar si existía una posible relación entre capacidad biosintética y crecimiento celular se obtuvieron los índices de crecimiento de cada uno de los cultivos en suspensión seleccionados, para lo cual se evaluó el peso seco de la siguiente manera: el contenido de cada matraz se filtró en un embudo Büchner con papel filtro Whatman No. 1 de peso conocido. Las células colectadas se lavaron con agua desionizada y se colocaron en una estufa de vacío (Lab-Line Duo-vac oven, Lab-Line Instruments, Inc.) a una temperatura de 70°C hasta que alcanzaron peso constante. Este procedimiento se llevó a cabo tanto al inicio y término del cultivo, para de esta forma obtener el peso seco final y el peso seco inicial de cada uno. Estos resultados se relacionaron en la siguiente fórmula para obtener el índice de crecimiento:

$$\text{INDICE DE CRECIMIENTO} = \frac{\text{PESO SECO FINAL} - \text{PESO SECO INICIAL}}{\text{PESO SECO INICIAL}}$$

4.12 EXTRACCION DE LOS CAPSAICINOIDES.

La extracción de los capsaicinoides se realizó tanto en el medio líquido de los cultivos en suspensión de las líneas seleccionadas como de aquellos de los cuales se originaron, con el propósito de determinar la influencia de las características biosintéticas del cultivo de origen sobre la capacidad productiva de las líneas obtenidas.

Tomando en cuenta que los capsaicinoides son metabolitos secundarios que son liberados al medio de cultivo (Lindsey y

Yeoman, 1983; Tapia, 1987; Rodriguez y Ramos, 1986), la extracción se realizó en 10 ml del medio de cultivo libre de células con 2 volúmenes de 10 ml de cloroformo. Los extractos así obtenidos fueron llevados a sequedad bajo presión reducida a una temperatura entre 50° y 60°C. Posteriormente la muestra fue resuspendida en un mililitro de metanol para su cuantificación (Tapia, 1987).

4.13 CUANTIFICACION DE CAPSAICINOIDES.

En los extractos metanólicos obtenidos, mantenidos bajo condiciones de obscuridad, se cuantificó el contenido de capsaicinoides mediante la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia, establecida por Tapia (1987). Para lo cual se empleó un cromatógrafo (Marca Tracor) con una columna Supelcosil-C18 fase reversa, fase móvil metanol/agua (60:40 v/v) con 0.05M de nitrato de plata a un pH de 2.5 y un flujo de 1.0 ml/min, así como un detector de luz ultravioleta a 280 nm e inyectando un volumen de muestra de 10 µl, usando un estándar externo de Capsaicina.

4.14 ESTUDIO PARCIAL DE LA ESTABILIDAD.

Una vez seleccionadas las líneas productoras en las 2 especies, se procedió a determinar parcialmente su estabilidad, por lo que se hicieron determinaciones quincenales durante 2 meses del contenido de CAPS en los cultivos en suspensión ya establecidos.

5. RESULTADOS Y DISCUSION.

5.1 MATERIAL VEGETAL.

Para la realización del presente trabajo se eligieron en base a su contenido de capsaicinoides a las especies de *Sapissium annuum* var. *annuum* (chile Jalapeño), *S. annuum* var. *glabrusculum* (chile Chiltepin) y *S. chinense* (chile Habanero), de acuerdo a los resultados obtenidos por Tapia (1987), mediante la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), los cuales se muestran en la Tabla XI, se comprobó que tanto los frutos del chile Habanero como los de Chiltepin eran los que presentaban mayor contenido de estos compuestos, siendo de 25.8 mg Capsaicinoides/g fruto seco para el primero y de 7.75 mg Capsaicinoides/g fruto seco para el segundo, además de las mejores características en cultivos *in vitro*. En cuanto al chile Jalapeño, su elección no se basó únicamente en su picor, ya que este es bajo (0.81 mgCapsaicinoides/g fruto seco), sino también en la posibilidad de generar una línea estable considerando que se partió de un cultivar mejorado.

Por otro lado, resulta importante observar que para las tres variedades, el capsaicinoide que se presentó en mayor cantidad fue la Capsaicina y que según Iwai y col. (1977a, 1977b y 1978), Suzuki y col. (1981) y los análisis realizados por Tapia (1987), éste al igual que la Dihidrocapsaicina son los principales constituyentes en las especies más picantes. Una vez elegidas las especies con las que se iba a trabajar se prosiguió a la obtención del material vegetal; con el propósito de generar plántulas libres de microorganismos que servirían como fuente de

TABLA XI. CONTENIDO DE CAPSAICINOIDES EN
 EXTRACTOS DE FRUTO DE DIFERENTES
 ESPECIES DE *Sapotecum* POR HPLC.
 (Adaptado de Tapia, 1987).

MUESTRA	C ^M	NDC ^M	HC ^M	DHC ^M	HDC ^M	TOTAL
<i>S. annuum</i> var. <i>glaberrimum</i> (PARADITO)	9.148 ⁺	1.1	Δ	1.7	Δ	11.94
<i>S. annuum</i> var. <i>glaberrimum</i> (CHILTEPIN)	7.64	0.06	0.023	0.028	Δ	7.73
<i>S. chinense</i> (HABANERO)	18.8	Δ	1.02	5.77	Δ	25.6
<i>S. pubescens</i> (PERON)	1.9	---	---	Δ	---	1.9
<i>S. annuum</i> (TUSTA)	2.83	---	0.67	1.92	---	3.42
<i>S. annuum</i> var. <i>annuum</i> (JALAPEÑO)	0.61	---	---	---	---	0.61
<i>S. annuum</i> var. <i>lampicaria</i> (SERRANO)	0.85	---	---	---	---	0.85
<i>S. annuum</i> var. <i>glaberrimum</i> (PIQUIN MERCED)	8.82	0.318	Δ	2.42	Δ	11.55

EXTRACCION CON MeOH EN FRIO + AGITACION

+ MG/O PESO SECO; Δ=PRESENTE

* C=CAPSAICINA; NDC=NORDIHIIDROCAPSAICINA; HC=HOMOCAPSAICINA;

DHC=DIHIIDROCAPSAICINA; HDC=HOMODIHIIDROCAPSAICINA.

materia! biológico, para el establecimiento de tejido caloso *in vitro*, y debido a que se iba a llevar a cabo el seguimiento de cada uno de los cultivos, era necesario partir de la germinación *in vitro* de las semillas de estas especies y manejar las plantas como individuos separados.

En el caso del chile Jalapeño, las semillas provenían del cultivar mejorado genéticamente llamado Jarocho, el cual había sido también acondicionado para tener un alto porcentaje de germinación.

Las semillas del chile Habanero no recibieron ningún tipo de acondicionamiento, y las semillas de Chiltepin fueron colectadas directamente de frutos secos. La importancia de la fuente del material vegetal radica en el hecho de que todas sus características son definitivamente influenciadas por su origen y/o tratamiento y las condiciones de cultivo *in vivo*, lo cual fue demostrado en los resultados obtenidos en la germinación bajo condiciones asepticas en los medios MS1 y SH1.

Como se observa en la Tabla XII el mayor porcentaje fue para las semillas acondicionadas del chile Jalapeño, lo cual era lo esperado; estos valores fueron del 93% en el medio de cultivo MS1 y del 100% en el SH1. Para las semillas no acondicionadas del chile Habanero este porcentaje fue del 22% en el medio MS1 y del 17% en el SH1, mientras que para el chile Chiltepin se obtuvo 87% de germinación tanto en el medio MS1 como en el SH1.

El bajo porcentaje de germinación correspondiente al chile Habanero, en comparación al obtenido por Rodríguez y Ramos 1986 (85%), fue probablemente debido a que las semillas utilizadas habían sido conservadas por un periodo de dos años en condiciones inadecuadas, aspecto que tuvo marcada

TABLA XII. PORCENTAJE DE GERMINACION* DE SEMILLAS DE *Capsicum* EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO.

ESPECIE	MEDIO DE CULTIVO	
	MS ^a	SH ^b
<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i> (JALAPEÑO)	93%	100%
<i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i> (CHILTEPIN)	57%	57%
<i>C. chinense</i> (HABANERO)	22%	17%

* PREACONDICIONAMIENTO Y DESINFESTACION SEGUN LA TABLA X.

TEMPERATURA $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, INTENSIDAD LUMINOSA 2800 LUX.

- a) MEDIO MURASHIGE & SKOOG (1962) SIN REGULADORES DE CRECIMIENTO.
- b) MEDIO SHENK & HILDEBRANDT (1972) SIN REGULADORES DE CRECIMIENTO.

influencia en la contaminación de las mismas bajo condiciones *in vitro*, ya que fueron estas semillas las que presentaron el mayor porcentaje de contaminación (51%), con respecto al de Jalapeño (20%) y al de Chiltepin (25%), lo cual también se debió a que las semillas del chile Habanero no recibieron ningún tipo de acondicionamiento químico.

En cuanto al chile Chiltepin, es característico que las semillas de estos chiles presenten un bajo porcentaje de germinación (0%), sin embargo como se comprobó en este trabajo y en el de Velázquez (1988), éste puede ser incrementado en gran proporción (57% Tabla XII) cuando las semillas son sujetas a remojo con agua por uno o dos días o en solución ácida con H_2SO_4 0.5M, tratamientos basados en la escarificación de cubiertas protectoras, que les sucede de manera natural a las semillas, ya sea por acción enzimática dentro del tracto digestivo de los pájaros que las consumen; por la inducción de la germinación causada por los diferentes regímenes de sequía-humedad-sequía o por la escarificación mecánica de sus cubiertas protectoras (Pickersgill, 1980; Hartman, 1980).

En el caso del chile Chiltepin el método de acondicionamiento aplicado fue la escarificación con ácido, cuyo fin fue el de permeabilizar el tegumento de la semilla de tal manera que permitiera el paso del agua al embrión y estimulara su germinación. Otro aspecto que comprueba aun más el efecto del acondicionamiento sobre la germinación, es el hecho de que aun cuando las semillas de Chiltepin fueron totalmente silvestres comparadas con las de Habanero, las primeras presentaron un mayor porcentaje debido a la escarificación a que estuvieron sujetas, mientras que las segundas al no recibir ningún tipo de acondicionamiento químico presentaron los más bajos resultados de germinación.

(22% y 17%). Por otro lado, aun cuando no se realizaron pruebas químicas para determinar la viabilidad de las semillas, se observó que las de Habanero presentaron un alto número de semillas vanas, las cuales se caracterizaron por su aspecto físico rugoso y por su coloración muy tenue e muy oscura con respecto al resto de las semillas.

Para cumplir el objetivo de obtención de líneas celulares fue necesario partir de células aisladas, lo cual implicó establecer las condiciones nutricionales y de reguladores de crecimiento donde se obtuvieran las mejores características de crecimiento, de esta forma se indujo la germinación de las semillas de las tres especies tanto en el medio de cultivo MSI como en el SH1 y proseguir el establecimiento de cultivos *in vitro*, de tejido caloso y en suspensión en estos medios de cultivo para finalmente elegir en cual de ellos, se presentaban las suspensiones más adecuadas para la obtención de células aisladas. Es preciso señalar que los medios de cultivo y la concentración de los reguladores de crecimiento usados en este trabajo fueron elegidos en base a estudios realizados previamente por el grupo de trabajo (Velázquez, 1988; Rodríguez, 1989; Rodríguez y Ramos, 1986), donde se probó la eficiencia de los mismos en la inducción de crecimiento de tejido caloso y células en suspensión en estas especies, con lo que a su vez se cumplió uno de los primeros requisitos establecidos en la estrategia para la obtención de líneas productoras de metabolitos secundarios desarrollada por Zenk y col. en 1977 (Figura 3 del punto 3.3.6.2.).

5.2 INDUCCION DE TEJIDO CALOSO.

Una vez obtenidas las plántulas se procedió a inducir

tejido calloso a partir de explantes de hipocotilo, para lo cual cada plántula fue marcada individualmente con el fin de llevar a cabo su seguimiento.

Como ya se dijo, cada cultivo provenia de un único individuo, los cuales se indujeron a partir de hipocotilo debido a que en experimentos anteriores se comprobó que los callos formados de esta parte de la plántula generaron tejidos más friables, en menor tiempo y con actividad biosintética de capsaicinoides (Volázquez, 1988), por lo cual estos callos presentaban las características más adecuadas para establecer los cultivos en suspensión. Estos fragmentos fueron sembrados en los medios de cultivo MS2 o SH2 dependiendo del medio de donde provenían con el propósito de establecer, cual de ellos era el apropiado para el establecimiento de los cultivos en suspensión y la inducción de crecimiento en células aisladas.

En los dos medios probados hubo desarrollo de tejido calloso en el transcurso de los primeros 15 días en las tres variedades, sin embargo cada uno presentó características particulares de crecimiento, color y friabilidad.

En la Tabla XIII se presenta en forma cualitativa el efecto del medio de cultivo, MS2 o SH2 (cuyas composiciones se especifican dentro de Materiales y Métodos), sobre las características morfológicas de los callos; de estos resultados se puede concluir que para el chile Jalapeño ambos medios fueron adecuados tanto para la obtención de callos friables como de buen crecimiento; en cuanto al chile Habanero, se observa que presentó sus mejores características tanto de crecimiento como de friabilidad en el medio MS2; por su parte el chile Chiltepin tuvo un crecimiento muy lento en ambos medios y presentó el mejor grado de friabilidad en el medio SH2.

TABLA XIII. INDUCCION Y CRECIMIENTO CUALITATIVO DE TEJIDO CALOSO* A PARTIR DE EXPLANTES DE HIPOCOTILO DE LAS ESPECIES DE *Capsicum*.

MEDIO DE CULTIVO	ESPECIE	<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i> (JALAPEÑO)	<i>C. annuum</i> var. <i>glabrescens</i> (CHILTEPINO)	<i>C. chinense</i> (CHABANERO)
MS2 ^a	CRECIMIENTO	+++	+	++
	COLOR	BLANQUECINO	CAFE CLARO	CAFE
	FRIABILIDAD	++	++	+++
	INDUCCION ^c	15	15	15
SH2 ^b	CRECIMIENTO	+++	+	+
	COLOR	BLANQUECINO	CAFE CLARO	CAFE
	FRIABILIDAD	++	+++	++
	INDUCCION ^c	15	15	15

* TEMPERATURA 26° ± 2°C; INTENSIDAD LUMINOSA 2800 LUX (EVALUADOS 3 SEMANAS DESPUES DE LA RESIEMBRA).

a) MEDIO MURASHIGE & SKOOG (1962) (TABLA IX).

b) MEDIO SHENK & HILDEBRANDT (1972) (TABLA IX).

c) TIEMPO DE INDUCCION EN DIAS.

+, ++, +++, GRADO DE CRECIMIENTO O FRIABILIDAD DEL CALLO.

Como mencionan Yeoman y Macleod en 1977, la formación de tejido calloso depende principalmente de las condiciones nutricionales, de reguladores de crecimiento, ambientales y de la fuente del explante, por esta razón dentro del presente trabajo se tomaron en cuenta como primera aproximación las condiciones de cultivo con el propósito de discernir cuales serian las más adecuadas para la inducción de clones, ya que tanto el callo como éste coinciden en gran parte en sus requerimientos. Además se determinó el tiempo de inducción del tejido calloso para así considerar en que lapso se podrian generar los clones celulares.

Aun cuando existen trabajos donde la obtención de líneas celulares productoras de metabolitos secundarios, se ha hecho mediante la separación de pequeñas porciones de callo y su posterior análisis cuantitativo de la producción en cada una de ellas, resulta ser un método muy ineficiente, sobretodo cuando se trata de metabolitos no coloridos, debido a que dentro de los cultivos de callos se presentan diferentes tipos celulares que difieren tanto en sus características genéticas como en su fase de crecimiento, lo cual es causado a los gradientes de concentración tanto de nutrientes como de reguladores del crecimiento y de la luz incidente (Yeoman y Macleod, 1977). De esta manera es de esperar que un cultivo generado de pequeñas porciones de tejido calloso muestre una gran variabilidad morfológica pero sobretodo productora, complicándose más la situación por la incompleta difusión del metabolito secundario al medio de cultivo en caso de ser liberado al medio. En base a estos antecedentes se optó por partir de cultivos en suspensión donde las células al estar totalmente dispersas permiten obtener líneas celulares a partir de células aisladas mediante su clonación, disminuyendo con ello la variabilidad en la capacidad

biosintética del cultivo.

5.3 ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS EN SUSPENSIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE CELULAS AISLADAS.

5.3.1. SELECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO.

El establecimiento de los cultivos en suspensión se realizó tanto en el medio MS3 como en el SH3 para las tres variedades de *Capsicum*, de esta manera se generaron cultivos con células totalmente libres o pequeños agregados celulares dispersos que permitieron posteriormente obtener células aisladas. Para la elección del medio de cultivo con el cual se continuaría trabajando para el desarrollo de clones celulares se tomaron como factores importantes el grado de disgregabilidad que tuviera el cultivo y el tamaño de los grumos que presentaba después del crecimiento (los cuales fueron determinados cualitativamente), ya que ambas variables fueron determinantes para contar con suspensiones con un alto porcentaje de células aisladas.

Es importante señalar que otro de los factores tomados en cuenta fue la velocidad de crecimiento celular, y aun cuando ninguno de ellos fue determinado cuantitativamente, se pudo establecer mediante evaluación visual que para el chile Jalapeño las mejores características tanto de disgregabilidad, tamaño de grumo y velocidad de crecimiento se apreciaron tanto en el medio de cultivo MS3 como en el SH3, sin embargo durante la obtención de los clones no se presentó respuesta en el medio MS3, aun cuando se usaron células alimentadoras durante la inducción, por lo que se optó por eliminarlo y continuar el resto de los experimentos

con el medio SH3.

En el chile Chiltepin se observó que el medio de cultivo donde se obtuvieron las suspensiones más adecuadas para la inducción de clones fue el SH3, ya que con éste se tuvieron cultivos con un tamaño de grumo más pequeño comparado con el que se tuvo en el MS3, por otro lado, en este último medio se presentó el problema de que los callos fueron más compactos y que tanto los cultivos en medio semisólido como los de suspensión se tornaron café obscuro al final de su fase de crecimiento, resultados que concuerdan con los obtenidos por Velázquez (1988) y por Ramos (1988) en esta misma especie. La presencia de esta coloración parece ser debida a la síntesis y oxidación de fenoles durante esta fase de crecimiento y no tanto al envejecimiento del mismo, ya que por un lado los autores anteriores reportan que la viabilidad durante esta fase no disminuyó, y por otro, al resembrarlos volvían a tomar su color café-amarillento y su crecimiento no se veía afectado.

En cuanto al chile Habanero se determinó que el mejor medio era el MS3, donde se obtuvieron suspensiones muy finas en cuanto al tamaño de grumo y con un buen grado de crecimiento, lo cual lo posibilitaba la obtención de células aisladas.

5.3.2. SELECCION DEL ESTADO FISIOLÓGICO DEL CULTIVO PARA LA OBTENCIÓN DE CÉLULAS AISLADAS.

Aun cuando dentro de este trabajo no se realizaron cinéticas de crecimiento en ninguna variedad, se tomaron en cuenta datos preestablecidos y que fueron obtenidos bajo las mismas condiciones de cultivo (Ramos, 1988; Velázquez, 1988). En promedio los cultivos en suspensión del chile Habanero y

del Jalapeño alcanzaban la fase estacionaria entre los 14 y 18 días después de la resiembra, mientras que los del Chile Chiltepin la alcanzaban hasta los 25 a 30 días. Estos valores resultaron importantes porque para la obtención de células aisladas se usaron cultivos que se encontraban en la fase exponencial de crecimiento, ya que como recalcan Conner y Meredith (1984), es durante esta fase cuando las células pueden soportar ciertas condiciones de stress, debido a que tienen todo su potencial metabólico dirigido a la división celular. De esta manera y en base a los datos reportados anteriormente, se estableció el rango dentro del cual se iban a tomar los cultivos para la obtención de células aisladas, correspondiendo éste a los 6 a 8 días después de la última resiembra para las especies Jalapeño y Habanero, y a los 8 a 10 días para los cultivos de Chiltepin.

Una vez establecido el medio de cultivo para cada variedad y el período dentro del cual se iban a obtener las células a plaquear, se procedió a llevar a cabo diferentes alternativas de plaqueo celular para de esta manera determinar en cual de ellas se obtenían las mejores eficiencias de plaqueo.

5.4 PLAQUEO CELULAR Y OBTENCION DE CLONES CELULARES.

Para el plaqueo celular se usaron como inóculos aquellas suspensiones cuyo número de resiembra fuera menor que cinco, es decir, que tuvieran menos de dos meses y medio bajo condiciones *in vitro*, ya que como recalcan varios autores, entre los que sobresalen Bayliss (1973, 1980) y Meins (1983), las células bajo condiciones *in vitro* sufren de un gran número de variaciones genéticas y/o epigenéticas

durante el transcurso del tiempo, las cuales redundan en la variabilidad de su capacidad biosintética y por lo tanto en su estabilidad.

Por otro lado, como ya se dijo anteriormente, las suspensiones que se plaquearon fueron aquellas que se encontraban dentro de la fase logarítmica de crecimiento, ya que como ha sido señalado por varios autores entre los que destacan Reynolds y Murashige (1979) y Connor y Meredith (1984), es en esta fase cuando las células tienen su mejor respuesta de crecimiento ya que todos sus mecanismos bioquímicos están dirigidos a la proliferación celular; sin embargo esto no siempre se cumple, se ha encontrado que aun cuando las células están preparadas para dividirse se tiene la problemática en la célula vegetal de que cuando están aisladas necesitan mayores requerimientos nutricionales, de reguladores del crecimiento y ambientales para responder a la proliferación de tal forma que es necesario considerar además todos estos factores cuando el propósito final es la obtención de clones celulares.

De hecho no existen sistemas vegetales en los que no se haya necesitado la aplicación de factores externos para lograr inducir la división celular en células aisladas; entre los cuales se han investigado factores referidos a las condiciones ambientales (luz, temperatura, humedad), a las características propias de las células (metabolismo celular, necesidad de agregación, grado de diferenciación, entre otros), a las características del medio de cultivo (concentración de los reguladores de crecimiento, de las sales minerales, uso de compuestos orgánicos) y a determinadas condiciones que estimulan el crecimiento celular (medio condicionado y células alimentadoras), un breve resumen de ellas se presenta en la Tabla VI.

Para la obtención de una suspensión compuesta principalmente de células aisladas fue necesario tamizar los cultivos, ya que generalmente estaban constituidos por una mezcla de diferentes tipos celulares, los cuales varían tanto en sus dimensiones como en sus características fisiológicas y genéticas. De esta forma, al tamizar se aumentaba la probabilidad de que los clones obtenidos provenían de una sola célula.

En base a la literatura, el método de plaqueo celular que se realizó primeramente fue el de Incorporación (Figura 4a dentro de materiales y métodos), sin embargo como se muestra en la Tabla XIV, no se obtuvieron resultados en ninguna de las tres variedades, lo cual se debió posiblemente al stress causado por la temperatura a la que estuvieron sujetas las células cuando se mezclaron con medio de cultivo a 35-37°C. Posteriormente y en base al método establecido por Weber y Lark en 1979, se llevó a cabo el plaqueo en cajas petri de 9x2 cms. (Figura 4b dentro de materiales y métodos), donde se aplicó el principio de las células alimentadoras atrapadas en espuma de poliuretano, sin embargo en esta alternativa tampoco se obtuvieron clones en ninguna variedad, lo cual se pudo deber a que en estos sistemas el medio de cultivo líquido donde se encontraban las células alimentadoras tuvo una desecación drástica en un periodo de tiempo muy corto (7 días), a una temperatura de incubación de 26^o ± 2^oC y a pesar de que las cajas petri se sellaron con parafilm. Cabe aclarar que este método tiene una amplia aplicación con buenos resultados, sin embargo, en este trabajo no se pudo apreciar respuesta debido posiblemente a las condiciones ambientales en las cuales se incubaron estos sistemas (alta temperatura y baja humedad relativa), lo cual se vio reflejado en el hecho de que presentó una alta

TABLA XIV. NUMERO DE CLONES OBTENIDOS^{MM} Y TIEMPO DE INDUCCION EN CADA UNO DE LOS METODOS DE PLAQUEO CELULAR USADOS EN LAS ESPECIES DE *Capsicum*.

METODO DE PLAQUEO ^f	RESPUESTA (No. CLONES/t. INDUCCION ^g)		
	<i>C. annum</i> var. <i>annuum</i> (JALAPEÑO)	<i>C. annum</i> var. <i>glabriusculum</i> (CHILTEPIN)	<i>C. chinense</i> (CHABANERO)
a. INCORPORACION	----	----	---
b. WEBER Y LARK MODIFICADO	----	----	---
c. WEBER Y LARK MODIFICADO ^h	55/9	----	355/15
d. HORSCH MODIFICADO	164/60	----	27/75
e. HORSCH MODIFICADO ^h	137/7	405/7	4

^{MM} TEMPERATURA DE 26° ± 20° C; INTENSIDAD LUMINOSA 50 LUX.

f) LOS METODOS SON ESQUEMATIZADOS EN LA FIGURA 4.

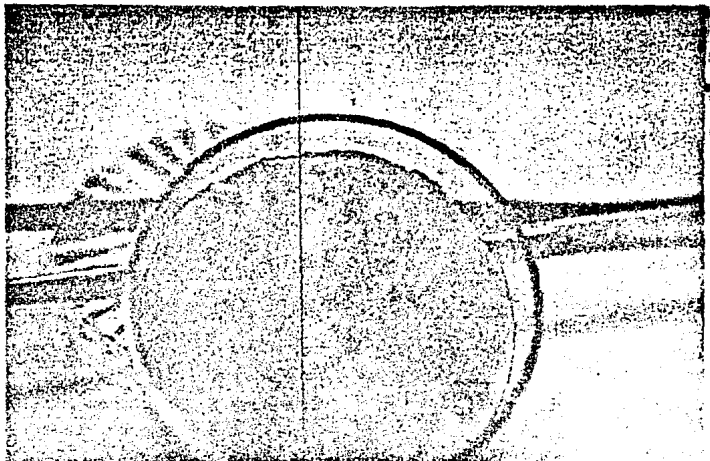
g) TIEMPO DE INDUCCION EN DIAS

h) NO SE PROBÓ.

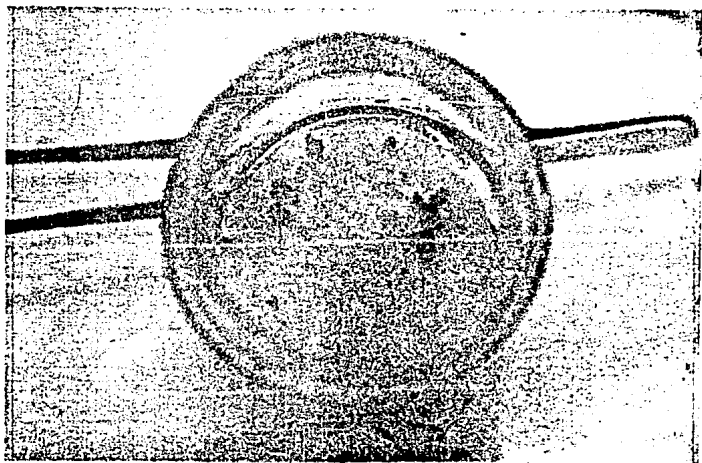
evaporación del medio de cultivo.

El tercer método de plaqueo consistió en una modificación más del anterior, en la cual se adaptaron cajas petri más pequeñas, de 5 x 1.5 cm. (Figura 4c dentro de Materiales y Métodos), que no permitieran una rápida evaporación del medio de cultivo líquido, lo que a su vez posibilitaba que las células plaqueadas tuvieran disponibilidad de nutrientes y reguladores del crecimiento durante todo el tiempo que necesitaban para su inducción de desarrollo; fue en este método donde se empezaron a obtener resultados positivos, ya que, como se puede observar en la Tabla XIV, se generaron 55 clones para el chile Jalapeño y 355 para el Habanero, en un periodo de 9 días para el primero y de 15 días para el segundo.

En el cuarto método de plaqueo (Figura 4d), que no fue más que una modificación del establecido por Horsch y Jones (1980), se lograron obtener mayor número de clones que en el método anterior, 164 para Jalapeño pero en un lapso de 60 días y 27 para Habanero en un periodo de 75 días, cabe aclarar que en este método no se usaron células alimentadoras, sino únicamente medio de cultivo semisólido. Estos resultados nos llevaron a concluir, por un lado que la especie Chiltepin necesitaba de mayores requerimientos nutricionales, ya que no se había logrado en los métodos anteriores obtener clones, los que podrían ser dados por las células alimentadoras, lo cual a su vez era de esperarse si se toma en cuenta que los cultivos *in vitro* de esta especie tenían una velocidad específica de crecimiento muy baja; y por el otro, se comprobó el efecto del uso de las células alimentadoras, ya que se disminuyó drásticamente el tiempo de inducción de los clones (de 60 a 9 días para Jalapeño y de 75 a 15 días para Habanero).



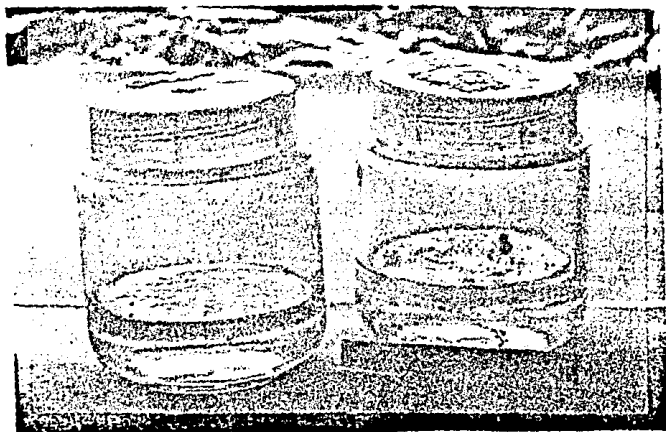
METODO DE WEBER Y LARK MODIFICADO* (CLONES DE
Capsicum annum var. annuum JALAPEÑO).



METODO DE HORSCH MODIFICADO* (CLONES DE
Capsicum annum var. glabriusculum (CHILTEPIN)).



METODO DE HORSCH MODIFICADO* Y DE HORSCH MODIFICADO
(CLONES DE Capsicum annuum var. glabriusculum y
C. chinense).



METODO DE HORSCH MODIFICADO* (CLONES DE
C. annuum var. glabriusculum)
107

Tomando en cuenta la característica propia de los chiles piquines, en cuanto a sus requerimientos para que una célula aislada creciera, se implementó un quinto método (Figura 5c), donde se combinó tanto la idea original de Horsch y Jones (1980) de usar medio de cultivo semisólido, como la de Weber y Lark (1979) de aplicar el efecto positivo de las células alimentadoras en soporte de poliuretano, de esta manera se lograron obtener 137 clones para Jalapeño en 7 días y 405 para Chiltepin en 7 días, respuesta que comprobó la influencia que tiene el origen de la planta en las características de los cultivos que de ella se desarrollen y la eficiencia del uso de células alimentadoras como promotoras del crecimiento en células aisladas o con mayores necesidades en sus condiciones de cultivo.

Como se ha venido mencionando a lo largo de este trabajo, existen varios factores cuya aplicación induce la proliferación celular en células aisladas, las cuales siempre tienen requerimientos más estrictos que los agregados celulares, este efecto ha permitido obtener un mayor número de clones a menor densidad celular en *Zea mays* (Smith y col., 1984) y *Nicotiana tabacum* (Raveh y col., 1973). En las especies de *Capsicum* aquí estudiadas se demostró la eficiencia del uso de células alimentadoras tanto para la inducción de división en células aisladas como para disminuir el tiempo de su obtención. En el caso del chile Jalapeño y el Habanero se puede observar en la Tabla XIV que fueron las especies que respondieron más rápidamente al plaqueo celular y sobretodo que fueron las que presentaron menores requerimientos, mientras que el chile Chiltepin necesitó de más factores externos para poder desarrollarse.

Para el chile Habanero se puede apreciar en la misma Tabla, que fue la especie donde el efecto de las células

alimentadoras se hizo totalmente visible, ya que fue con su uso donde se obtuvo el mayor número de clones en el menor tiempo, lo cual correspondió a 355 clones en un lapso de inducción de 15 días, mientras que con sólo la capa de medio de cultivo semisólido se generaron 27 clones en 75 días, lo que vino a ser aproximadamente 13 veces menos que con el uso de la células alimentadoras; por otro lado se observó que durante los 75 días de tiempo de inducción se tuvo la problemática de desecación del medio semisólido, lo que originó la necesidad de llevar a cabo resiembras quincenales en estos sistemas.

En cuanto a la especie Jalapeño, como se observa en la Tabla XIV, no se encontraron diferencias significativas con y sin el uso de células alimentadoras en la obtención de clones, ya que el número de clones en cada método fue muy semejante (55 clones en el método de Weber y Lark modificado^M, 104 en el método de Horsch modificado y 137 por el método de Horsch modificado^M), sin embargo sí se aprecian diferencias en cuanto al tiempo de inducción, ya que en el caso del uso de células alimentadoras (métodos de Weber y Lark modificado^M y de Horsch modificado^M) éste correspondió a 7-9 días, mientras que cuando no se usaron (método de Horsch modificado) el tiempo de obtención de clones llegó a ser de 60 días, parámetro que comprobó el efecto positivo que tienen las células alimentadoras en la inducción de crecimiento celular en células aisladas.

Pasando ahora al chile Chiltepin se comprobó claramente la necesidad del uso de factores externos que ayudaran a la proliferación celular, ya que como se observa en la Tabla XIV, esta especie sólo respondió al método de Horsch modificado^M, donde por un lado se tuvieron los efectos nutricionales del medio de cultivo semisólido (ya sea MS2 o SH2) y por el otro

el efecto positivo de las células alimentadoras atrapadas en la espuma de poliuretano; cabe aclarar que en este método se encontró que el uso de la capa semisólida que se encontraba en la parte más inferior del sistema sirvió como alimento a las células alimentadoras, ya que se observó que estas proliferaban después de aproximadamente 15 días, lo cual no representó ninguna problemática porque el tiempo de inducción de clones de 2 a 3 mm en este método fue de 7 días, periodo en el cual no había contacto entre las células alimentadoras y el papel donde se encontraban las células plaquedadas, por lo que se determinó resembrar este papel cada 8 días en un nuevo sistema.

Resumiendo, en este trabajo se lograron obtener un total de 356 clones para el chile Jalapeño mediante los métodos de Weber y Lark modificado^M, de Horsch modificado y de Horsch modificado^M (los cuales son especificados dentro de materiales y métodos), 405 para el chile Chiltepin generadas por el método de Horsch modificado^M, y 382 para la especie Habanero resultantes de los métodos de Weber y Lark modificado^M y Horsch modificado.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo en cuanto a número de clones obtenidos por cada método de plaqueo y en cada variedad, se puede concluir que los métodos más adecuados de manera global para las tres variedades de *Capsicum* estudiadas, son aquellos donde se hace uso del efecto de las células alimentadoras en medio de cultivo líquido, lo que a su vez correspondió a los métodos donde se usó espuma de poliuretano como soporte de las mismas. Estos resultados concordaron a su vez con los obtenidos por Conner y Meredith (1984), quienes trabajando con diferentes especies del género *Nicotiana* observaron que las células plaqueadas sobre soporte de poliuretano conteniendo células

alimentadoras presentaron mayores velocidades de crecimiento que aquellas que se encontraban sobre medio de cultivo semisólido. Esta respuesta pudo haber sido causada a que en estos sistemas las células alimentadoras fueron atrapadas dentro de la espuma de poliuretano, factor que de acuerdo a Lindsey y Yeoman (1983) provoca que las células se mantengan durante más tiempo en el estado fisiológico en el cual se encontraban cuando fueron atrapadas, de esta manera es factible atribuir la mayor respuesta de estos métodos al hecho de que al haber atrapado las células durante su fase exponencial de crecimiento se provocó que permanecieran mayor tiempo en este periodo y por lo tanto hubiera una mayor biosíntesis de sustancias promotoras del crecimiento, las cuales al estar dentro de un medio de cultivo se difundieron e indujeron una respuesta más rápida en las células aisladas, ya que fue en estos métodos (Weber y Lark modificado^m y Horsch modificado^m) donde se encontró una mayor velocidad de crecimiento comparado con las obtenidas en células creciendo sobre medio semisólido. Por otro lado, existen otros factores que pudieron haber causado la respuesta anterior, tales como: a) existe una difusión de nutrientes y otros elementos propios de las células alimentadoras mucho más rápida a través del medio líquido donde estaba la espuma de poliuretano que dentro del medio semisólido; b) es posible que sustancias tóxicas o inhibitorias del crecimiento producidas por las células vegetales sean difundidas en sentido contrario a las células plaqueadas a una velocidad mayor dentro del soporte de poliuretano que a través del medio semisólido; c) existe la posibilidad de que el gel (en este caso gelítico) presente compuestos que inhiban el crecimiento, e incluso impurezas que influyan en la obtención de células variantes, donde el

control nutricional es muy importante; d) el gel presenta el problema de generar stress osmótico; e) es posible que los nutrientes sean adsorbidos sobre las superficies coloidales del gel, lo cual dificulta la toma de los mismos por parte de las células vegetales, además de que se tiene que considerar que el papel filtro sobre el cual se plaquearon las células representó una barrera más en la obtención de los nutrientes, y f) el problema de poca humedad disponible para las células en los sistemas con medio semisólido y papel filtro, ya que se observó que conforme pasaba el tiempo se presentaba más desecación en estos cultivos.

De esta forma, los sistemas que hacen uso de soportes de poliuretano permiten además el empleo de medio condicionado, de células alimentadoras o de realizar estudios de selección de variantes bajo condiciones nutricionales específicas (Meredith, 1983), además de que su manejo es mucho menos problemático si se compara con otros soportes donde se presentan las desventajas de solubilización de microelementos o del manejo de equipo especializado (Conner y Meredith, 1984).

Cabe mencionar que en el caso del chilo Chiltepin si se obtuvieron clones en los métodos de Weber y Lark modificado* y de Horsch modificado, las cuales fueron 7 para el primero y 3 para el segundo, sin embargo estos sólo se tomaron en cuenta para obtener las eficiencias de plaqueo.

Otro aspecto que resulta importante destacar en este punto de respuesta a los métodos de plaqueo, es el hecho de la influencia del origen del material vegetal. Como ya se ha mencionado anteriormente, existe una marcada relación entre el origen y/o condiciones de cultivo de una especie con la respuesta de la misma a las condiciones *in vitro*, lo cual fue demostrado durante el plaqueo celular. De manera global se

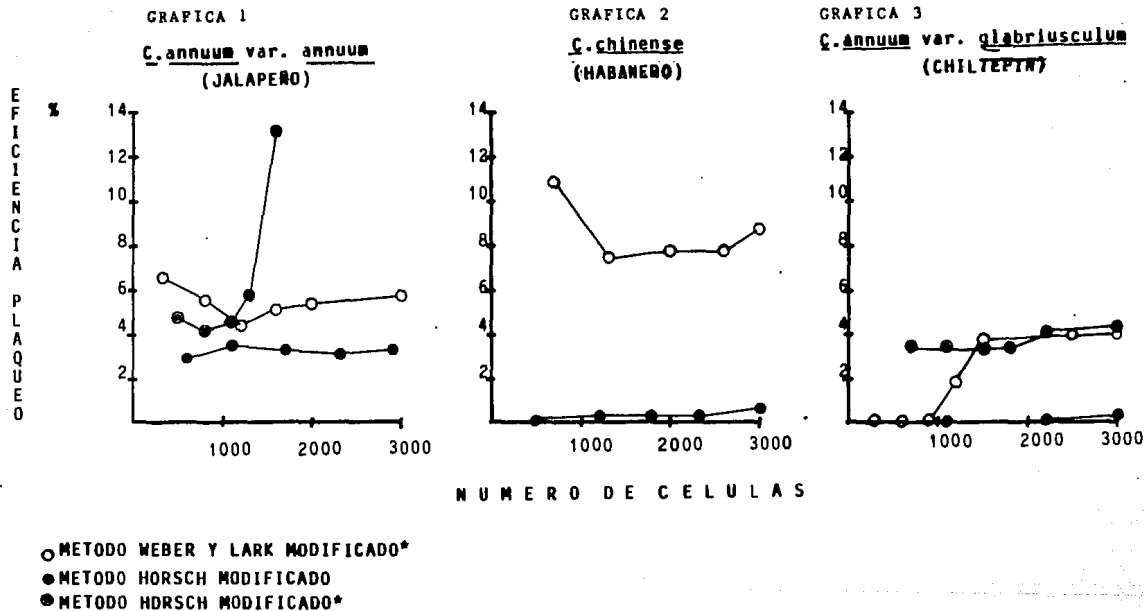
puede concluir que los resultados estuvieron de acuerdo a lo esperado, ya que como se observa en la Tabla XIV, la especie que presentó mejor respuesta en cuanto a tiempo de inducción y tipo de plaqueo fue Jalapeño, cuya semillas provenían de un cultivar mejorado, el cual había tenido un buen desarrollo en cultivo *in vitro* y una alta velocidad de crecimiento (Ramos, 1988); la especie que le siguió fue Habanero, que aun cuando generó más clones también requirió de más tiempo y, por último el chile Chiltepin que fue el que presentó más problemas para la obtención de clones, fue a su vez obtenido de cultivos silvestres que no habían tenido ningún tipo de acondicionamiento artificial en sus semillas.

5.4.1. ANALISIS COMPARATIVO DE LA EFICIENCIA DE PLAQUEO OBTENIDA EN CADA UNO DE LOS METODOS DE PLAQUEO CELULAR EN LAS ESPECIES DE *Capsicum*.

En la Figura 8 se presentan los resultados de eficiencia de plaqueo obtenidos en cada una de las variedades de *Capsicum* y en cada uno de los métodos de plaqueo usados.

Como se puede observar para la especie Jalapeño (Gráfica 1, Figura 8) con el método de Weber y Lark modificado* las eficiencias de plaqueo sólo variaron en un rango de 4.22% a 6.46% sin presentarse diferencias significativas a lo largo de las concentraciones probadas, sin embargo se puede observar que con el menor número de células (350) se tuvo la mayor eficiencia de plaqueo, lo que remarca el efecto de las células alimentadoras ya que como menciona Bergmann (1980), su uso permite reducir la densidad celular necesitada para la inducción de división celular en células aisladas y por lo tanto se reduce el problema de coalición celular. Con

FIGURA 6. EFICIENCIAS DE PLAQUEO OBTENIDAS EN TRES ESPECIES DE *Capsicum* USANDO DIFERENTES METODOS DE PLAQUEO CELULAR.



respecto al método de Horsch modificado, donde no hubo células alimentadoras, se observa que las eficiencias de plaqueo fueron menores que las anteriores, variando de 2.96% a 3.55%, comportándose de igual manera en todas las concentraciones probadas. Para el método de Horsch modificado^M las eficiencias de plaqueo presentaron diferencias significativas en el punto de mayor concentración celular (1600 células), ya que como se puede apreciar en la Figura 6 (Gráfica 1), los resultados variaron de 4.17% a 13.04%, correspondiendo este último a la mayor concentración celular probada (1600 células). De estos resultados y en base a los fines perseguidos, es decir a la obtención de clones, se puede particularizar que para esta especie el mejor método de plaqueo fue el de Weber y Lark modificado^M (Figura 4c dentro de materiales y métodos), ya que permitió obtener un mayor número de clones a una menor concentración celular, lo que aumentó la probabilidad de partir de células aisladas. Aun cuando en el método de Horsch modificado^M se obtuvo una alta eficiencia de plaqueo, esto no resulta del todo adecuado debido a que corresponde a la mayor densidad celular, lo cual causa la gran dificultad técnica de la separación de las mismas y por ende, no se asegura el aislamiento de clones.

Para Habanero, como ya se mencionó, los métodos donde se obtuvieron clones fueron en el de Weber y Lark modificado^M y en el de Horsch modificado^M; como se puede apreciar en la Figura 6 (Gráfica 2), en el primero de ellos fue donde se lograron obtener las eficiencias de plaqueo más altas, variando entre 7.40% a 10.80%, en esta especie y al igual que en Jalapeño el valor más alto en este método correspondió a la menor concentración celular (700 células), lo cual resultó favorecedor para el objetivo planteado; en el segundo de

estos métodos las eficiencias estuvieron dentro del rango de 0.15% a 0.81%, valores que aumentaban conforme se aumentaba el número de células plaqueadas. Con estos resultados se puede concluir que para esta especie el método más adecuado para la obtención de clones fue el de Weber y Lark modificado^M, donde el uso de células alimentadoras favoreció la obtención de clones a partir de bajas densidades celulares.

Para Chile Chiltepin (Figura 8, Gráfica 3), los métodos donde se obtuvieron clones fueron en el de Weber y Lark modificado^M, en el de Horsch modificado y en el de Horsch modificado^M; en el primero de ellos el número total de clones obtenidos fue de 7, y las eficiencias de plaqueo correspondientes variaron de 0.0% a 3.98%, siendo del 0.0% para las primeras concentraciones celulares y del 3.98% para las más altas, lo cual provocó la eliminación de este método para la obtención de clones; en el caso del método de Horsch modificado se obtuvieron sólo 3 clones y las eficiencias de plaqueo fueron muy pequeñas (del 0.0% al 0.34%), por lo que no sirvió para los fines perseguidos. En el último método, el de Horsch modificado^M, fue donde se consiguió el mayor número de clones y las mayores eficiencias de plaqueo (del 3.21% al 4.03%), las cuales no variaron a lo largo de las concentraciones celulares trabajadas, lo que implica que se pueden usar bajas densidades celulares con buenos resultados en el número de clones obtenido.

De estos resultados se puede concluir que el método de Weber y Lark modificado^M para las especies Jalapeño y Habanero, y el de Horsch modificado^M para Chiltepin, fueron los más adecuados en la obtención de clones, ya que permitieron obtener las más altas eficiencias de plaqueo a las menores concentraciones celulares, evitando con esto la posibilidad de coalición entre células adyacentes durante el

crecimiento de las mismas.

Es necesario aclarar que las eficiencias de plaqueo fueron determinadas después de un mes de haberse realizado el plaqueo celular, debido a que pasado este lapso de tiempo ya no se observó la formación de clones nuevos.

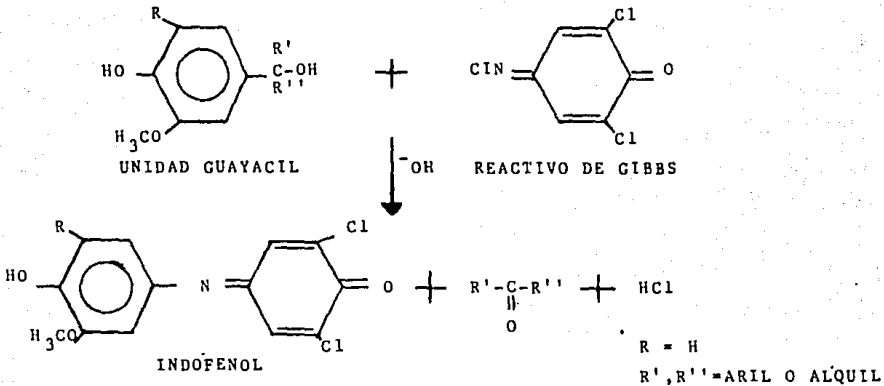
En general, células vegetales aisladas o pequeños agregados celulares no crecen abajo de densidades celulares de 10^3 o 10^4 células por mililitro, concentración que es muy alta si se intenta obtener clones celulares con alguna característica en particular (Horsch, 1984); sin embargo se han logrado obtener eficiencias de plaqueo muy altas usando bajas densidades celulares mediante el uso de células alimentadoras, de esta manera se han obtenido eficiencias del orden del 50 al 100% tanto en protoplastos como en células aisladas de *Nicotiana tabacum* (Nagata y Takebe, 1971; Ravch y col., 1973; Logemann y Bergmann, 1974; Cella y Galun, 1980; Thumann y col., 1987; Erinberg y col., 1988), del 56% para células de *Zea mays* (Smith y col., 1984) y del 55 al 88% para células de *Karstenappus gracilis* (Horsch y Jones, 1980), porcentajes que variaron de acuerdo a las condiciones de inoculación, de incubación y de la densidad celular; en cuanto al género *Capsicum*, Díaz y col. (1989) obtuvieron eficiencias de plaqueo del orden del 19.0% al 26.0% en protoplastos de *C. annuum* y *C. chinense* mediante el método de Incorporación en medio de cultivo Kao y Michayluk, 1975; analizando los resultados obtenidos en las variedades estudiadas dentro de este trabajo se puede observar que el valor más alto correspondió al 13.04% para Jalapeño, al 10.80% para Habanero y al 4.03% para Chiltepín, lo cual resalta la necesidad de realizar estudios que permitan aumentar estos valores, los cuales deberían encaminarse principalmente al origen del cultivo, a las condiciones tanto

nutricionales como hormonales del medio de cultivo y a las condiciones ambientales, ya que como mencionan Díaz y col (1988), existen marcadas evidencias de que las especies y aun las variedades de una misma especie difieren en sus requerimientos para la obtención de clones. Por otro lado, Salgado-Garciglia (comunicación personal) concluyó en su trabajo para la obtención de células de *C. annuum* cv. Serrano Tampiqueño 74 resistentes a la p-fluorofenilalanina que aun cuando encontró altas eficiencias de plaqueo (95%) también observó el problema de que las células no crecían a bajas densidades celulares.

5.5 SELECCION PRIMARIA DE CLONES PRODUCTORES DE CAPS.

Una de las principales dificultades al intentar mejorar la capacidad biosintética de las células mediante la selección de cultivos celulares *in vitro* es la necesidad de llevar a cabo una estimación cuantitativa de la productividad en cada uno de los clones a probar, que en la mayoría de los casos representan un gran número; es por esta razón que la mayor parte de los experimentos de selección se han realizado con metabolitos secundarios fácilmente detectables, tal como sucede con los pigmentos (antocianinas, carotenoides y naftoquinonas, principalmente); sin embargo, actualmente se ha intentado la selección en metabolitos incoloros, para lo que se han tenido que idear métodos rápidos que permitan la cuantificación en un gran número de clones y en el menor tiempo posible. De esta manera, Zenk y col. (1977) aplicaron radioinmunoensayo para la determinación cuantitativa de serpentina y ajmalicina en clones de *C. roseus*; aun cuando este método permitió un análisis eficiente de pequeñas cantidades de estos compuestos, también requirió de la

preparación de las muestras y del uso de anticuerpos específicos, los cuales muchas veces son difíciles de obtener para un compuesto determinado; de lo anterior resalta la necesidad de contar con métodos de cuantificación que sean de fácil ejecución, rápidos y confiables. Tomando en cuenta lo anterior, Ogino y col. idearon en 1979 el método del "aplastado celular", el cual les permitió hacer una estimación gruesa del contenido de nicotina en clones obtenidos de suspensiones de *Nicotiana tabacum*, y por lo tanto sirvió como un método de selección primaria para clones con altas producciones. Tomando en cuenta el principio medular de esta técnica, se estableció en el presente trabajo una metodología para llevar a cabo la selección primaria de los clones obtenidos en las especies de Jalapeño, Chiltepín y Habanero, de acuerdo a su capacidad biosintética de capsaicinoides. Dentro de esta metodología se aprovechó por un lado la característica propia de los CAPS de ser metabolitos que son liberados al medio de cultivo, y por el otro de que reaccionan con el reactivo de Gibbs con una sensibilidad del 0.1% (Govindarajan, 1987). La reacción del reactivo de Gibbs (2,6-dicloro-p-benzoquinona-4-cloroimína) es específica para todos los alcoholes p-hidroxibencilicos, cuya fórmula general esta constituida por un grupo hidroxílico fenólico libre y por un grupo hidróxilo bencilico libre en posición para (unidad guayacil), de tal forma que en presencia de una solución alcalina de pH 9.8 se provoca el rompimiento de la cadena lateral con la consiguiente formación de un Indofenol colorido (azul):



En el planteamiento de esta metodología se estableció inducir el crecimiento de tejido calloso de los clones obtenidos incubándolos en medio semisólido y sobre papel filtro, de tal forma que estuvieran en contacto con él durante un periodo de 30 días, pasado el cual se procedió a determinar de manera cualitativa el contenido de CAPS adsorbido en el papel filtro, donde el tamaño de poro se vio disminuido al estar en contacto con el agar. La técnica que se usó para la determinación de CAPS en el papel filtro fue una adaptación de la establecida por Rajpoot y Govindarajan (1981).

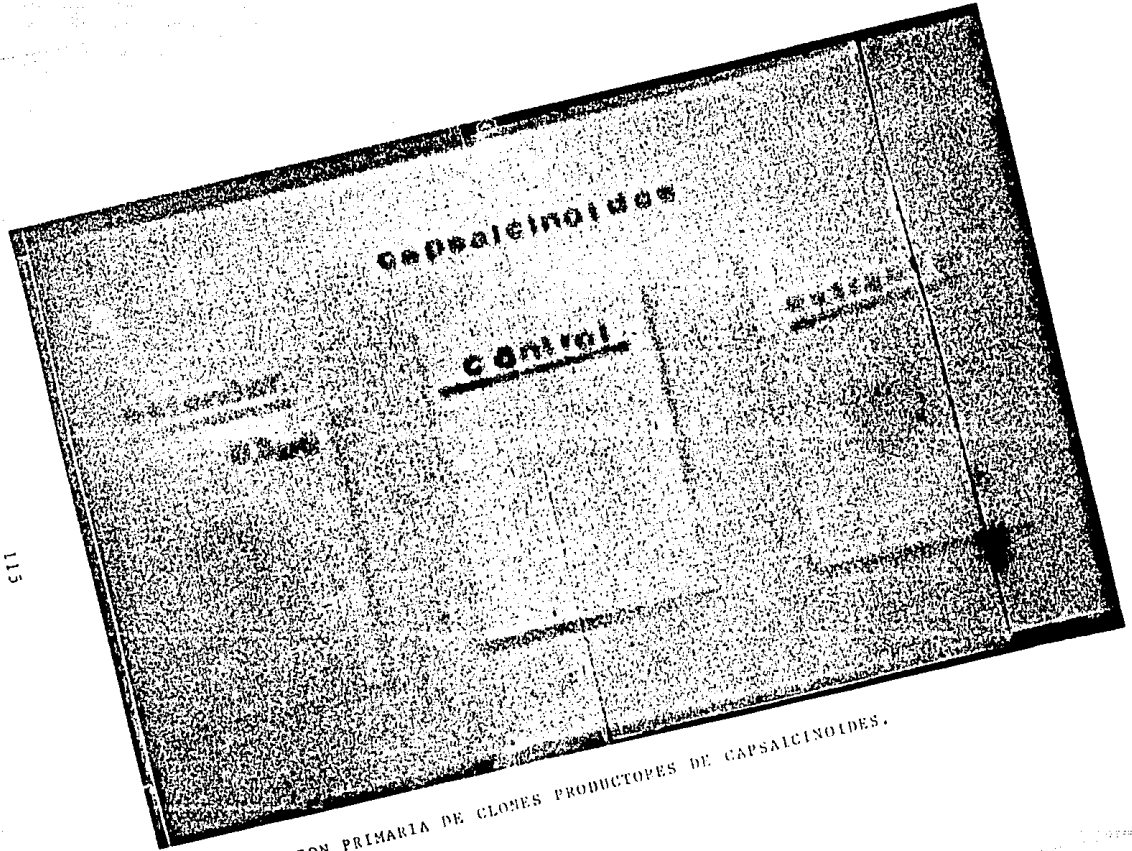
Es necesario mencionar que para determinar que técnica se iba a utilizar para cuantificar los CAPS presentes en el papel, se hicieron adaptaciones a los métodos de Gibbs establecidos por Joint Committees of the Pharmaceutical Society and the Society for Analytical Chemistry on Methods of Assay of Crude Drugs (1964), al establecido por Pankar y Magar (1977) y por Rajpoot y Govindarajan (1981) usando como standars soluciones de Capsaicina (Sigma 98%); de los resultados obtenidos se concluyó que el que presentó las mejores características fue el de Rajpoot y Govindarajan (1981), ya que los otros resultaron ser muy laboriosos, con una pobre reproducibilidad y sobretodo con una muy baja

sensibilidad, debido principalmente a la interferencia de los solventes usados (metanol, cloroformo y acetona) durante la reacción de los CAPS con el reactivo de Gibbs.

Una vez establecida la metodología de determinación cualitativa y en punto de los CAPS, se procedió a definir cuatro marcas cualitativas de acuerdo a la intensidad de color azul desarrollado por diferentes concentraciones de una solución standard de capsaicina (Sigma 98%), estableciéndose las siguientes:

MARCA	COLOR (AZUL)	CANTIDAD DE CAPSAICINA (μ gs)
1	MUY LEVE	2.5 A 50
2	LEVE	50 A 100
3	REGULAR	100 A 150
4	BUENA	> 150

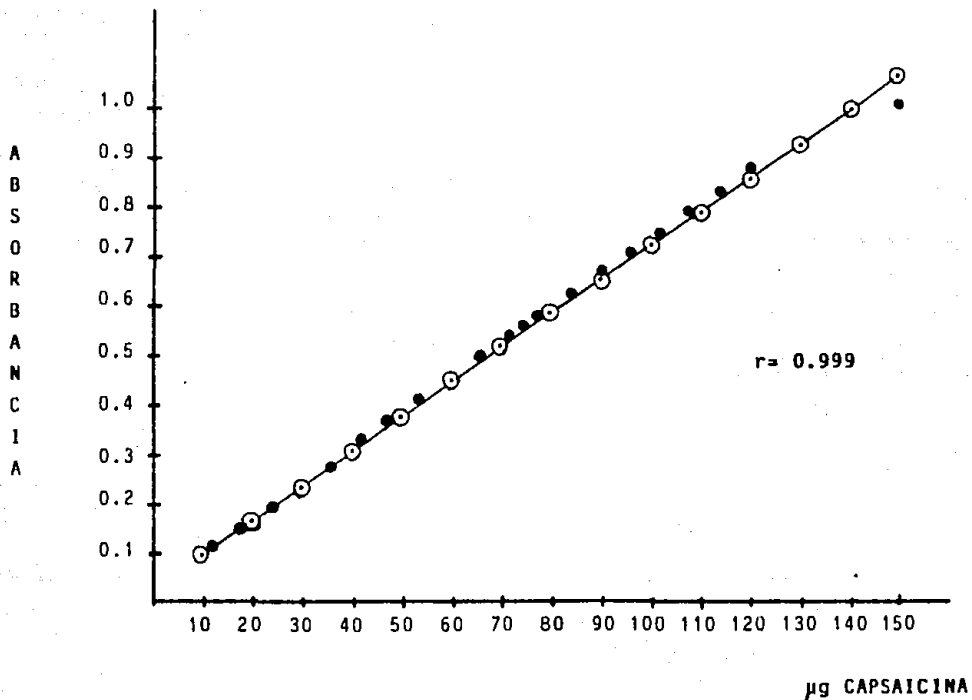
Con el propósito de validar que a mayor cantidad de CAPS mayor intensidad de color, se determinó encontrar el grado de correlación entre estos dos parámetros, para lo cual se estudió el efecto de diferentes concentraciones de solución standard de capsaicina sobre la transmitancia obtenida a 615 nm, cabe aclarar que la determinación de capsaicina se realizó en papel filtro y de manera puntual debido a que era así como se iba a determinar en los clones, y resultaba necesario observar si existía algún tipo de interferencia por parte de los mismos, del papel o de los reactivos. En la Figura 7 se presenta la gráfica resultante, donde se observa que se obtuvo un alto factor de correlación ($r=0.999$) entre la cantidad de capsaicina y la intensidad de color obtenido.



SELECCION PRIMARIA DE CLORES PRODUCTOPES DE CAPSAICINOIDES.

FIGURA 7. CORRELACION ENTRE CONCENTRACION DE CAPSAICINA Y ABSORBANCIA (615nm).

116



- DATOS EXPERIMENTALES
- DATOS CORRELACION.

Por otro lado, y también para confirmar la eficacia de este método para determinar CAPS se llevaron a cabo pruebas con otros compuestos intermedios de la ruta de biosíntesis de estos metabolitos, las cuales se hicieron tanto de manera puntual como en cromatografía en papel y en capa fina, donde se correlacionaron los Rf's de cada compuesto con el del standard de capsaicina y se observó la coloración que presentaron al reaccionar con el reactivo de Gibbs. Respecto a este último punto (datos no reportados), se observó que de los compuestos probados el único que desarrollo un color azul fue la capsaicina, ya que el ácido cumárico, el ácido cafeico y la vainillina presentaron un color café, mientras que el ácido ferúlico mostró primero un color azul pero que posteriormente se tornó café, estos resultados nos permiten concluir que la reacción entre el reactivo de Gibbs y los CAPS no presentó problemas de interferencia respecto a los precursores aquí probados, sin embargo no hay que olvidar que dentro de la ruta biosintética de los CAPS existen secuencias que no han sido dilucidadas, tal como el paso de vainillina a vainillilamina, que en un momento dado podrían interferir en la reacción. En cuanto a las pruebas cromatográficas, se observó que por un lado, tanto los precursores como la capsaicina tuvieron diferentes Rf's, y por el otro que en las pruebas donde se usaron extractos de cultivos en suspensión de las tres especies estudiadas, no se presentaron compuestos intermedios en las placas cromatográficas. De todos estos resultados se estableció que el reactivo de Gibbs fue muy sensible para la detección de los CAPS, pero que hay que tomar en cuenta que estas pruebas correspondieron en su mayoría a soluciones standard y que por lo tanto cuando se usaron cultivos es posible que se presentaran interferencias por presencia de sustancias grasas o colorantes.

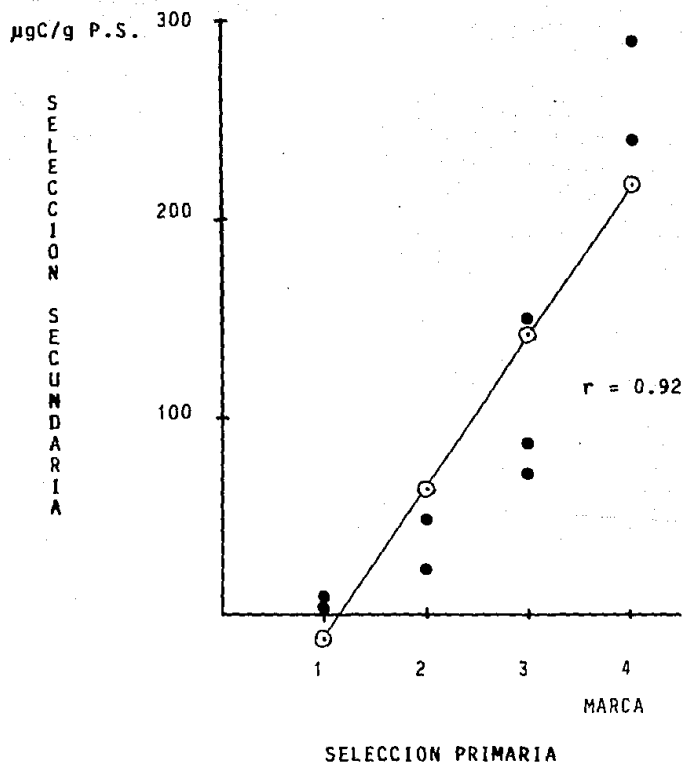
5.6 SELECCION SECUNDARIA DE CLONES PRODUCTORES DE CAPS.

Cabe aclarar que se determinó llevar a cabo la selección secundaria por varias razones: a) ya se dijo anteriormente que aun cuando el reactivo de Gibbs es sensible a la detección de los CAPS, también presenta problemas de interferencia, b) la selección primaria fue unicamente cualitativa y de descarte de un gran número de clones, y c) en el caso del uso industrial de líneas celulares altamente productoras resulta mucho más adecuado, desde un punto de vista biotecnológico, usar cultivos en suspensión.

En las Figuras 8, 9 y 10 se presentan las gráficas que relacionan el contenido de CAPS obtenido en las diferentes líneas celulares tanto por el método cualitativo del reactivo de Gibbs como por el método cuantitativo de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Aun cuando los cultivos que más interesaron fueron aquellos que produjeron más, se optó por elegir cultivos tanto productores como de baja producción, es decir que se tomaron líneas de todas las marcas establecidas en la selección primaria, con el propósito de establecer la correlación entre la determinación cualitativa y la cuantitativa, lo que a su vez validaría el método modificado de Rajpoot y Govindarajan (1981) como método grueso o primario de cuantificación de CAPS.

Como se puede apreciar en la Figura 8, donde se relaciona el contenido de CAPS de los clones de Jalapeño seleccionados obtenido por HPLC y la marca correspondiente según la selección primaria, se presentó un factor de correlación muy alto ($r=0.92$) entre estos dos métodos, lo cual sugiere que en esta especie no se presentaron interferencias que impidieran la reacción de los CAPS con el reactivo de Gibbs, resultado que estuvo de acuerdo a lo

FIGURA B. CORRELACION ENTRE SELECCION PRIMARIA Y SELECCION SECUNDARIA EN C.annuum var. annum (JALAPEÑO).



● DATOS EXPERIMENTALES

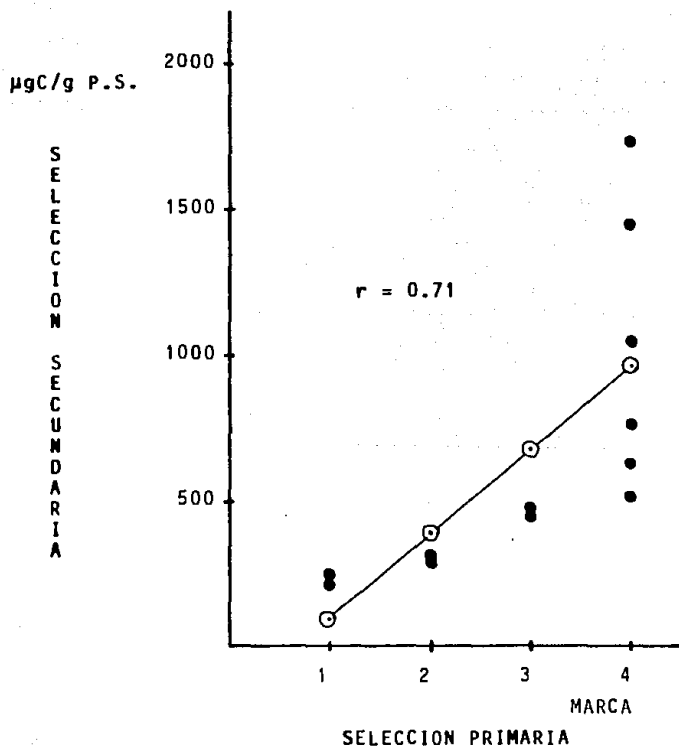
○ DATOS CORRELACION

esperado, ya que tanto los callos como las suspensiones de esta especie presentaron un color blanquecino, lo que a su vez comprobó la nula o baja oxidación de compuestos fenólicos con la estructura p-hidroxibencílica que actuaran como interferencia en la reacción (Gierer, 1954), ya que como señala Díaz y col. (1988) las especies de *Capsicum* se caracterizan por liberar grandes concentraciones de fenoles en cultivos *in vitro*.

En esta Figura se puede observar que los clones que tuvieron la marca 4, según el método de selección primaria, y que correspondieron al J122 y al J172, presentaron una producción de 239.12 μg Capsaicina/g peso seco de biomasa y 280.29 μg Capsaicina/g peso seco de biomasa respectivamente, lo que a su vez significó 0.023% y 0.020% (g de Capsaicina/100 peso seco de biomasa).

Para el chile Habanero (Figura 9) el factor de correlación conseguido fue de 0.71, lo que fue provocado por un lado a que dentro de la marca 4 de la selección primaria se tuvo un rango de producción muy amplio de acuerdo a la selección secundaria, el cual fue de 515.48 a 1717.13 μg Capsaicina/g peso seco de biomasa, y por el otro a que las líneas de esta especie tuvieron la particularidad de presentar un color café, que a su vez fue indicativo de que en ellos hubo síntesis y oxidación de compuestos fenólicos que interfirieron en la determinación cualitativa del reactivo de Gibbs. En este sentido, Hrubcová y col. (1989) trabajando con callos de *Medicago sativa* concluyeron que la edad del cultivo tiene marcada influencia en la proporción de derivados del ácido benzoico y del ácido cinámico, ya que observaron que la proporción de derivados del ácido benzoico dentro del total de los ácidos fenólicos aumentó del 15% al 21% a través del cultivo *in vitro* en cuatro semanas, lo que probablemente se

FIGURA 9. CORRELACION ENTRE SELECCION PRIMARIA Y SELECCION SECUNDARIA EN C. chinense (HABANERO).



● DATOS EXPERIMENTALES

○ DATOS CORRELACION

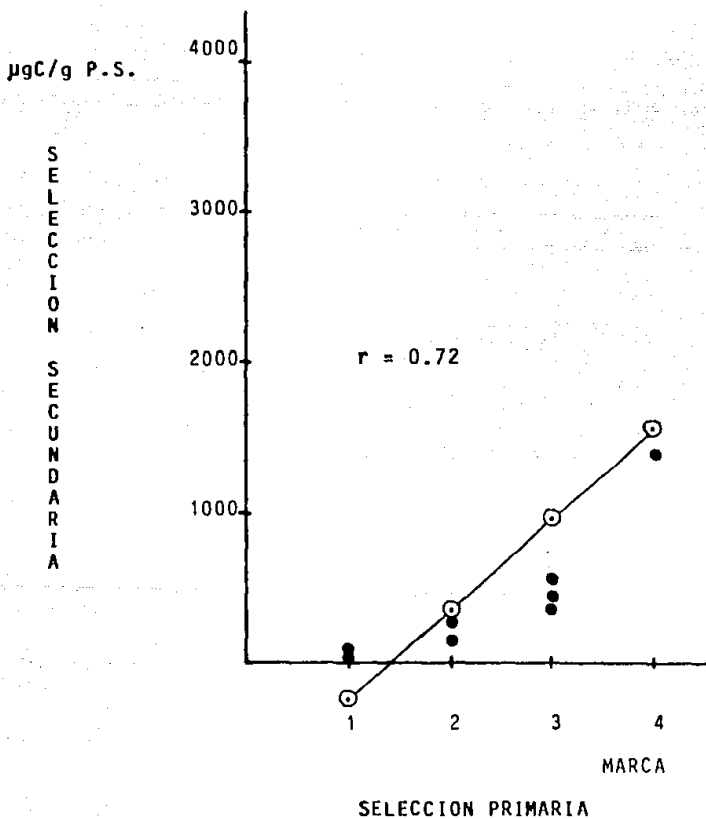
debió a la conversión de derivados fenilpropanoides a lignina insoluble, misma conclusión a la que llegó Ochoa (1989) al trabajar con *Capsicum annuum* var. *annuum* (Tampiqueño Serrano 74).

Sin embargo, aun cuando el factor de correlación en Habanero no fue muy alto se puede concluir que la estimación del contenido de CAPS mediante el reactivo de Gibbs es lo suficientemente aceptable cuando se usa como método de selección primaria, ya que permitió realizar la selección a partir de un gran número de muestras (382 clones) y obtener resultados confiables. Como se puede observar en la Figura 9, en Habanero se obtuvieron un mayor número de clones celulares que presentaron la reacción de Gibbs según la marca 4 (un total de 6), sin embargo de estos se eligieron como productores sólo a los H40, H79, H48 y H64, cuyas producciones fueron 515.46, 766.48, 1717.13 y 1445.78 μg Capsaicina/g peso seco de biomasa, respectivamente, lo cual a su vez correspondió a 0.05%, 0.08%, 0.17% y 0.14% (g de Capsaicina/100 g peso seco de biomasa).

En cuanto al chile Chiltepín (Figura 10), el factor de correlación obtenido fue de 0.72, y al igual que en Habanero se vio altamente influenciado tanto por el amplio rango de producciones que cayeron en la marca 4, de 1392.86 a 3189.00 μg Capsaicina/g peso seco de biomasa, como por la presencia de compuestos que pudieron haber actuado como interferencias en la reacción Gibbs-CAPS, ya que sus líneas fueron caracterizadas por un color café claro. En esta especie se obtuvieron dos líneas celulares con altas producciones, la C29 y la C34, las cuales tuvieron 1392.86 (0.14%) y 3189.00 (0.32%) μg Capsaicina/g peso seco de biomasa, respectivamente.

De los resultados obtenidos en estas tres variedades se puede concluir que el uso del reactivo de Gibbs como método

FIGURA 10. CORRELACION ENTRE SELECCION PRIMARIA Y SELECCION SECUNDARIA EN *C.annuum* var. *glabriusculum* (CHILTEPIN).



- DATOS EXPERIMENTALES
- DATOS CORRELACION

de selección primaria y cualitativo fue adecuado, ya que fue rápido y confiable para determinar dentro de un gran número de clones en tejido calloso cual presentó una mayor producción de CAPS en general; resultado que fue muy prometedor si se toma en cuenta la problemática que representa el uso de métodos más sofisticados, caros y laboriosos, como el radioinmunoensayo y la prueba de ELISA.

Se puede concluir además que este método fue muy sensitivo a las sustancias interferentes, ya que donde estas no se presentaron se tuvo el factor de correlación más alto. Por otro lado, hay que considerar que otro factor que provocó la disminución entre la correlación de estos dos métodos fue el que ambos se hicieron bajo condiciones muy diferentes. Como se puede ver en los resultados se presentó correspondencia desde el punto de vista cualitativo de menor a mayor producción entre la selección primaria y la secundaria, pero no desde el punto de vista cuantitativo, ya que mientras con el método de Gibbs se establecieron rangos en microgramos, en la selección secundaria los datos llegaron a ser de miligramos. Esta diferencia fue debida en parte a que cada uno de los métodos y condiciones para la selección primaria y secundaria fueron totalmente diferentes. En la selección primaria sólo se detectó la concentración de CAPS totales en la región o punto donde fueron difundidos desde el tejido calloso mediante el uso del reactivo de Gibbs en el papel filtro; en cambio en la selección secundaria se determinaron estos compuestos mediante HPLC y a partir de extractos de cultivos en suspensión establecidos del callo correspondiente. Tomando en cuenta estos factores se puede decir que este comportamiento era de esperarse, ya que mientras en la selección primaria sólo se detectaron los CAPS sintetizados por las células que se encontraban en contacto

directo con el papel filtro, en la selección secundaria se detectaron los CAPS biosintetizados por todas las células, debido a las características propias de los cultivos en suspensión donde las células se encuentran totalmente disgregadas y en contacto directo con el medio de cultivo.

Es necesario mencionar que en la determinación cuantitativa con HPLC sólo se detectó en cantidades apreciables la capsaicina, mientras que la determinación cualitativa con el reactivo de Gibbs reaccionaron todos aquellos compuestos con la estructura p-hidroxibencílica, aspecto que pudo haber sido otro factor de diferencia entre los dos métodos de selección.

5.7 RELACION DE LA CAPACIDAD DE BIOSINTESIS DE CAPS ENTRE EL CULTIVO INICIAL Y LAS LINEAS CELULARES OBTENIDAS.

Con el objetivo de determinar la influencia de la capacidad biosintética del cultivo de origen sobre esta misma característica en las líneas celulares obtenidas, se cuantificó el contenido de CAPS en los cultivos en suspensión a plaquar, mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

Como ha sido establecido por varios autores, entre los que destacan Holden y col. (1987) por su trabajo realizado en *Bapsicum frutescens*, existen marcadas diferencias tanto morfológicas como biosintéticas entre cultivos derivados de diferentes individuos y aun entre aquellos que derivan de uno mismo. Por otro lado, se ha sugerido que la capacidad biosintética observada en los cultivos *in vitro* es determinada por la capacidad biosintética del cultivo del cual proviene, de lo que resulta que los cultivos derivados de aquellos con

altas producciones producen a su vez mayores niveles de metabolitos secundarios que los que provienen de cultivos con bajas producciones (Zenk y col., 1977; Kinnersley y Dougall, 1980; Holden y col., 1988), comportamiento que sería de esperarse si se considera que la capacidad biosintética sólo fuera regulada genéticamente. Sin embargo, existen otros factores que intervienen en la producción de los metabolitos secundarios, tales como las condiciones de cultivo (nutrientes, reguladores de crecimiento y características ambientales) y los fenómenos de regulación metabólica; de tal forma que existen varios ejemplos donde se han generado líneas celulares altamente productoras a partir de cultivos con baja capacidad biosintética, entre los que destacan el de Cresswell (1986), quien obtuvo una línea de *Callitriche* productora de triptofano y el de Fujita y Hara (1985), quienes encontraron líneas celulares altamente productoras de shikonina a partir de cultivos de *Lithospermum erythrorhizon* tanto con altas como con bajas producciones.

Los resultados que se obtuvieron en este trabajo, los cuales se muestran en las Tablas XV, XVI y XVII para las tres variedades de *Capsicum*, muestran claramente que no se presentó ninguna correlación entre la capacidad biosintética del cultivo en suspensión de origen y la de las líneas celulares obtenidas a partir de él.

En el caso del chile Jalapeño (Tabla XV) se observa que aunque las líneas de mayor producción (J122 y J172) se obtuvieron de los cultivos más productores (4.300 μ gCapsaicina/g peso seco de biomasa), también se aprecia que hubo líneas celulares de baja producción (J120, J138, J194, J210) que se originaron de cultivos con alta capacidad biosintética (4.309 μ gCapsaicina/g peso seco de biomasa), presentándose incluso un caso de disminución de la actividad

TABLA XV. INDICE DE CRECIMIENTO Y CONTENIDO DE CAPSAICINA
 EN CULTIVOS EN SUSPENSION DE LAS LINEAS CELULARES
 Y LOS CULTIVOS DE LOS QUE SE ORIGINARON EN
C. annuum var. *annuum* (JALAPEÑO).

LINEA CELULAR	I. C. *	CONTENIDO DE CAPSAICINA ($\mu\text{g.C/g}$ peso seco biomasa)	
		LINEA	CULTIVO ORIGEN **
J172 ^Δ	0.72	289.29	4.399
J122 ^Δ	0.40	239.12	4.399
J41	0.42	148.0	2.006
J173	1.09	85.19	4.399
J195	3.80	72.00	2.006
J126	0.65	47.83	2.006
J184	0.13	24.12	4.399
J210	0.04	8.20	4.399
J130	2.55	0.24	4.399
J77	0.06	3.91	2.006
J120	0.82	1.94	4.399
J18	1.56	1.7	2.006

* I. C. = INDICE DE CRECIMIENTO.

** NO SE DETERMINO I. C. EN LOS CULTIVOS EN SUSPENSION DE ORIGEN.

Δ LINEAS DE MAYOR PRODUCCION.

C = CAPSAICINA.

biosintética del 56% en la línea J120.

Como se observa en la Tabla XVI, en el chile Chiltepin tampoco se observó correspondencia directa entre la capacidad biosintética del cultivo de origen y la de las líneas celulares que se obtuvieron de él, incluso puede decirse que el comportamiento fue contrario a lo esperado, ya que en el caso de las líneas productoras (C34 y C29) se observa que fueron generadas de cultivos con baja producción (0.012 $\mu\text{gCapsaicina/g}$ peso seco de biomasa), mientras que algunas líneas de baja producción (C8, C10, C37, C65) se obtuvieron de cultivos con mayor producción (0.054 $\mu\text{gCapsaicina/g}$ peso seco de biomasa).

Para el chile Habanero (Tabla XVII), al igual que para Jalapeño y Chiltepin, no se logró establecer alguna relación entre la producción de las líneas celulares y la de los cultivos de los cuales se originaron. En este caso se obtuvieron 6 líneas con altas producciones, de las cuales la H48, la H80 y la H78 partieron de los cultivos con mayor actividad biosintética (0.1216 $\mu\text{gCapsaicina/g}$ peso seco de biomasa), mientras que la H64, la H39 y la H40 se originaron de aquellos con menores producciones (0.0397 y 0.0594 $\mu\text{gCapsaicina/g}$ peso seco de biomasa).

Estos resultados concuerdan con los de Holden y col. (1987), ya que en ambos trabajos del género *Capsicum* no se pudo determinar una correlación directa en cuanto a la capacidad biosintética del cultivo *in vitro* de origen y de las líneas celulares que de él se obtuvieron. Como ya se mencionó anteriormente, estos resultados se han observado en otras especies por lo que Dougall (1985) ha sugerido que durante la obtención de líneas celulares altamente productoras no se debe limitar a la selección en cultivos con mayor actividad biosintética como lo señala Zenk y col.

TABLA XVI. INDICE DE CRECIMIENTO Y CONTENIDO DE CAPSAICINA EN CULTIVOS EN SUSPENSION DE LAS LINEAS CELULARES Y LOS CULTIVOS DE LOS QUE SE ORIGINARON EN *E. annuum* var. *glaberrimum* (CHILTEPINO).

LINEA CELULAR	I. C. ^{**}	CONTENIDO DE CAPSAICINA	
		LINEA	CULTIVO ORIGEN ^{**}
		(µgC/g peso seco biomasa)	
C34 ^Δ	1.75	3189.29	0.012
C29 ^Δ	0.60	1322.86	0.012
C16	0.47	539.03	0.012
C25	0.58	441.38	0.012
C57	1.10	412.29	0.054
C2	1.29	341.18	0.012
C8	0.49	271.03	0.054
C37	1.01	266.66	0.054
C47	0.60	144.49	0.012
C24	0.07	86.96	0.012
C65	0.56	62.03	0.054
C10	0.72	57.19	0.054
C48	0.56	18.15	0.012

* I. C. = INDICE DE CRECIMIENTO.

** NO SE DETERMINO I. C. EN LOS CULTIVOS EN SUSPENSION DE ORIGEN.

Δ LINEAS DE MAYOR PRODUCCION.

C= CAPSAICINA.

TABLA XVII INDICE DE CRECIMIENTO Y CONTENIDO DE CAPSAICINA
 EN CULTIVOS EN SUSPENSION DE LAS LINEAS
 CELULARES Y LOS CULTIVOS DE LOS QUE SE
 ORIGINARON EN *C. chinense* (HABANERO).

LINEA CELULAR	I. C. [*]	CONTENIDO DE CAPSAICINA ($\mu\text{gC/g}$ peso seco biomasa)	
		LINEA	CULTIVO ORIGEN ^{**}
H40 [§]	0.47	1717.13	0.1216
H64 [§]	1.58	1445.78	0.0594
H80 [§]	1.21	1090.06	0.1216
H78 [§]	0.61	766.40	0.1216
H39 [§]	0.21	610.96	0.0397
H40 [§]	4.79	515.46	0.0397
H95	5.58	470.13	0.0397
H42	1.02	441.58	0.0397
H89	5.39	312.66	0.0636
H33	0.56	200.58	0.1216
H79	1.69	244.16	0.1216
H93	0.60	214.49	0.0636

^{*} I. C. = INDICE DE CRECIMIENTO.

^{**} NO SE DETERMINO I. C. EN LOS CULTIVOS EN SUSPENSION DE ORIGEN.

[§] LINEAS DE MAYOR PRODUCCION.

C = CAPSAICINA.

(1977), sino que es recomendable partir también de cultivos con bajas producciones, ya que hasta el momento no se tiene la seguridad de que la relación entre producción de un cultivo y de las líneas que se obtienen de él sea directa. Además hay que considerar que de acuerdo al principio de la totipotencialidad y al fenómeno de la Variación Somaclonal, es posible obtener líneas altamente productoras a partir de cultivos *in vitro* con baja actividad biosintética.

Un aspecto que es importante señalar es que como se puede observar en los resultados en cuanto a la cantidad absoluta de Capsaicina ($\mu\text{g/g}$ peso seco) referidos a Jalapeño, y Habanero, es que no se encontraron líneas celulares de la primera especie cuya producción sobrepasara la obtenida por las de la segunda, de lo cual se puede concluir que la capacidad biosintética de cada especie esta regulada genéticamente de tal manera que no es posible, por el método aquí usado, sobrepasar los niveles ya establecidos dentro de su genoma, y que debido a la correspondencia de producción de los cultivos y las líneas celulares es necesario tomar en cuenta la especie que se va a manejar cuando se intenta obtener líneas celulares altamente productoras.

5.8 RELACION ENTRE CRECIMIENTO Y CAPACIDAD BIOSINTETICA EN LAS LINEAS CELULARES OBTENIDAS PARA CADA ESPECIE.

En las Tablas XV, XVI y XVII se presentan los resultados obtenidos tanto del índice de crecimiento:

$$\text{I.C.} = \frac{\text{PESO SECO FINAL} - \text{PESO SECO INICIAL}}{\text{PESO SECO INICIAL}}$$

como del contenido de Capsaicina, de las líneas celulares obtenidas en las variedades de *Capsicum* en cultivos en suspensión.

Como se puede apreciar en la Tabla XV, la línea de Jalapeño de menor producción (1.7 $\mu\text{gC/g}$ peso seco de biomasa) tuvo a su vez un alto índice de crecimiento (1.56) comparado con el obtenido (0.72) en la de mayor producción (289.29 $\mu\text{gC/g}$ peso seco de biomasa), respuesta que debía ser la esperada considerando la aseveración de varios autores en el sentido de que la producción de los metabolitos secundarios se encuentra inversamente relacionada con el crecimiento celular (Lindsey y Yeoman 1983,1985); sin embargo, si se observan los resultados entre estos dos parámetros en el resto de las líneas se puede asegurar que en el caso de Jalapeño esta aseveración no se cumple, ya que no se presentó ninguna relación definida entre producción e índice de crecimiento.

Con el chile Chiltepin (Tabla XVI) tampoco se observa algún tipo de relación entre estas dos variables, ya que por ejemplo las líneas marcadas como productoras (Δ), la C34 y la C29, presentaron producciones de 3189.99 y 1392.86 $\mu\text{gC/g}$ peso seco de biomasa e índices de crecimiento de 1.78 y 0.60, respectivamente, correspondiendo a la línea de mayor producción el más alto crecimiento; sin embargo estos resultados no nos permiten generalizar ningún tipo de comportamiento.

Esta relación inversa tampoco se presentó en el chile Habanero (Tabla XVII), donde además no se pudo establecer algún tipo de relación entre crecimiento y producción de CAPS, ya que las líneas consideradas como productoras (Δ) presentaron un amplio rango de índices de crecimiento, los cuales reflejan diferentes velocidades de crecimiento.

Los resultados anteriores fueron totalmente opuestos a los encontrados por Lindsey y Yeoman (1985), cuyo trabajo realizado con células inmobilizadas de *Capsicum frutescens* les confirmó la idea de que a mayor crecimiento menor capacidad biosintética, ya que encontraron que mientras la línea de mayor producción tuvo un índice de crecimiento de 0.57 y una producción de 2.37 $\mu\text{gC/g}$ de biomasa peso fresco, la línea de mayor crecimiento presentó un índice de 3.95 y una producción de 0.17 $\mu\text{gC/g}$ de biomasa peso fresco. Sin embargo, Rodríguez (1989) también estableció que para *C. annum* var *glabrusculum/aviculare* no fue posible dar una relación clara entre crecimiento y producción de CAPS.

Con estos antecedentes, y como ha sido señalado por Holden y col. (1987), se puede afirmar que en el caso de las especies del género *Capsicum* no se ha logrado determinar claramente todos los factores que intervienen en la biosíntesis de los CAPS y que se ha encontrado mucha variabilidad en las respuestas de las células en cultivos *in vitro* (Aitken, y Yeoman 1986; Holden y col. 1986).

La afirmación anterior también fue comprobada por nosotros cuando se analizó la apariencia morfológica de los cultivos, tanto de tejido calloso como de células en suspensión, en ellos se observó una apariencia variable en cuanto a color, friabilidad y crecimiento con respecto a la producción de CAPS, de tal forma que no se pudo establecer alguna relación estricta entre ellos. En el trabajo realizado por Lindsey y Yeoman en 1985, se demostró que de manera general los callos pálidos, compactos y friables de *C. frutescens* que no tuvieron clorofila produjeron CAPS, y los que presentaron clorofila pudieron o no biosintetizar estos metabolitos. Cabe aclarar que a nivel de fruto, la mayor producción de CAPS se da cuando disminuye la síntesis de

clorofila (Iwai y col. 1979).

5.9 LINEAS ALTAMENTE PRODUCTORAS DE CAPSAICINOIDES.

En la Tabla XVIII se presentan los resultados de producción obtenidos en las líneas celulares seleccionadas por su mayor contenido de capsaicinoides en las tres variedades de *Capsicum*.

Como se puede apreciar en estos resultados, el número de líneas celulares con mayores producciones fue muy pequeño comparado con el número total de líneas que se obtuvieron en cada especie, de tal forma que en Jalapeño se obtuvieron dos líneas altamente productoras a partir de 356 lo que representa el 0.56%; en Chiltepin se seleccionaron dos líneas con mayor producción partiendo de un total de 408 (0.49%), y en Habanero se generaron 8 líneas de un total 382 (1.31%). Estos resultados resaltan la necesidad de contar con un gran número de clones celulares para poder obtener a su vez un mayor número de cultivos productores.

Otro aspecto que resalta en los resultados obtenidos es que la producción en las líneas celulares catalogadas como de mayor producción sobrepasó drásticamente a la de los cultivos a partir de los cuales se originaron. En el caso de Jalapeño (Tabla XV) se puede ver que para las líneas marcadas como productoras (8), el aumento de producción entre ellas y el cultivo original fue del 6576% para la línea J172 y del 5435% para la J122.

Para el chile Chiltepin (Tabla XVI) se observa que el aumento de producción fue del $2.6 \times 10^7\%$ para la línea C34 y del $1.1 \times 10^7\%$ para la línea C20.

En cuanto al chile Habanero (Tabla XVII) se presenta un

TABLA XVIII. PRODUCCION DE CAPSAICINOIDES EN LAS LINEAS CELULARES SELECCIONADAS COMO ALTAMENTE PRODUCTORAS EN LAS ESPECIES DE *Capsicum*.

ESPECIE	LINEA CELULAR	PRODUCCION DE CAPSAICINA [*]	
		µgC/g P. S.	% P. S. ^{**}
<i>C. annuum</i>			
var. <i>annuum</i>	J122	239. 12	0. 023
(JALAPEÑO)	J172	289. 29	0. 029
<i>C. annuum</i>			
var. <i>glabriusculum</i>	C29	1392. 86	0. 14
(CHILTEPIN)	C34	3189. 99	0. 32
	H40	515. 46	0. 05
	H39	618. 78	0. 06
<i>C. chinense</i>	H78	765. 48	0. 08
(HABANERO)	H80	1038. 06	0. 10
	H64	1445. 78	0. 14
	H48	1717. 13	0. 17

* DETERMINACION EN CULTIVOS EN SUSPENSION.

** NP. S. = g CAPSAICINA/100 g PESO SECO.

aumento de producción del 1.4×10^7 % para la línea H49, del 2.4×10^7 % para la línea H64, del 8.5×10^6 % para la línea H80, del 6.3×10^6 % para la línea H78, del 1.5×10^7 % para la línea H39 y del 1.2×10^7 % para la línea H40.

De estos resultados se puede concluir que la técnica de clonación celular para la obtención de líneas con altas producciones de metabolitos secundarios es muy favorecedora, ya que permite seleccionar células cuya capacidad biosintética supera a la del cultivo en general.

Ahora bien, comparando los resultados de producción de CAPS obtenidos en las líneas celulares seleccionadas en este trabajo y los obtenidos previamente en cultivos no seleccionados, se puede concluir que para el chile Chiltepin presentó un incremento de producción de estos metabolitos, ya que en el trabajo realizado por Velázquez (1988) se tuvo una producción máxima de $471.95 \mu\text{gC/g}$ peso seco/l en cultivos en suspensión, mientras que en las líneas obtenidas este valor correspondió a $1392.86 \mu\text{gC/g}$ peso seco para la línea C29 y a $3199.99 \mu\text{gC/g}$ peso seco para la C34, lo que representa un incremento del 295% y 676% respectivamente.

En cuanto al chile Jalapeño, se tuvo un incremento de producción entre el 500% y el 700%, ya que en los estudios realizados por Calva (1988) en esta misma especie pero en el cultivar Papaloapan, se obtuvo una producción de $40 \mu\text{gCAPS/g}$ peso seco en cultivos en suspensión.

Para el chile Habanero, que ha sido una de las especies más estudiadas, se tienen rangos de producción de hasta 0.1 mg de CAPS/g peso seco, lo cual representa el 0.01%, sin embargo, como se puede observar en la Tabla XVIII, se llegaron a obtener líneas celulares cuyas producciones sobrepasaron este rango (hasta un 0.17%).

En base a los resultados anteriores se puede concluir

que las líneas celulares obtenidas en este trabajo sobrepasaron los niveles de producción encontrados en otras especies de *Sapotum* bajo condiciones *in vitro*, lo cual era de esperarse si se toma en cuenta el origen unicelular de las líneas y el fenómeno de Variación Somaclonal; sin embargo, al compararlas con las producciones obtenidas en los frutos (Tabla XI) se observa que todavía se está muy por abajo de esos valores en cada especie; no obstante, se plantea la posibilidad, como ha sido señalado por Holden y col., (1988) de generar líneas celulares con mayores producciones que las hasta aquí obtenidas, partiendo ahora de estas nuevas líneas donde por un lado la heterogeneidad celular se ha disminuido, y por el otro, las células que la conforman tienen la información genética de mayor actividad biosintética.

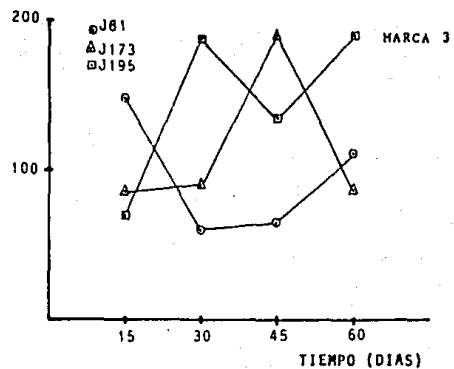
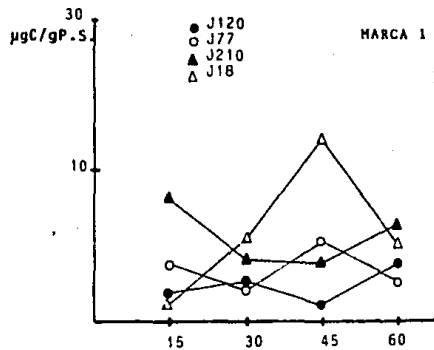
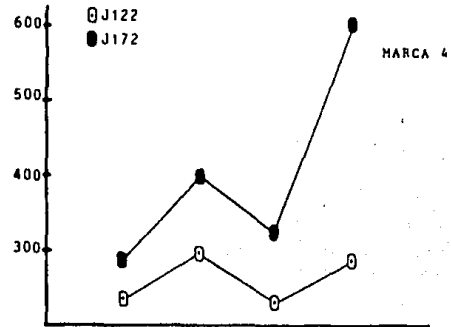
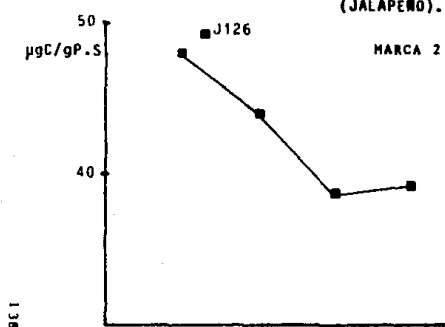
5.10 ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD EN LAS LINEAS CELULARES OBTENIDAS.

Con el propósito de examinar la estabilidad de las líneas celulares seleccionadas se determinó cuantificar su contenido de CAPS por un periodo de dos meses, lo cual implicó obtener cuatro datos de producción.

En las Figuras 11, 12 y 13 se representan gráficamente los resultados obtenidos en este estudio y en todos los clones, cabe señalar que se estableció llevar a cabo este estudio preliminar de estabilidad en todos los clones con el fin de observar si todos mantenían sus niveles de producción, lo cual era de esperarse si se considera que las líneas habían partido de un célula y por lo tanto podían tener las mismas características genéticas, fisiológicas, morfológicas y productoras (Rhodes y col., 1988).

En el caso del chile Jalapeño (Figura 11) se aprecia que

FIGURA 11. FLUCTUACION EN EL CONTENIDO DE CAPSAICINOIDES DE 10 LINEAS CELULARES SELECCIONADAS DE *C. annum* var. *annuum* (JALAPEÑO).



las producciones de los clones dentro de cada marca preestablecida cayeron dentro de un rango característico, de tal forma que se observa una separación clara entre los clones de más baja producción y los productores. Es así como podemos establecer que los clones de la marca 1, de acuerdo a la selección primaria, tuvieron producciones en el cultivo en suspensión y determinadas por HPLC de 1.7 a 12.02 $\mu\text{gC/g}$ peso seco, los de la marca 2 variaron de 38.5 a 47.83 $\mu\text{gC/g}$ peso seco, los de la marca 3 se mantuvieron entre 62.0 y 191.3 $\mu\text{gC/g}$ peso seco y por último los de la marca 4 cuyo rango varió de 231.9 a 605.9 $\mu\text{gC/g}$ peso seco, lo cual confirma claramente la posibilidad de separar cada nivel en base a la determinación cualitativa con el reactivo Gibbs.

Por otro lado, también se puede observar que hubo variabilidad en la producción de los CAPS a lo largo del tiempo de estudio, aspecto que se acentuó más en unos clones que en otros; este mismo fenómeno fue observado por Rodríguez (1989) trabajando con cultivos en suspensión no seleccionados en el Chile Chigol. Como se puede apreciar en la Figura 11 se presentó un comportamiento oscilatorio que se hizo más claro en las líneas catalogadas como productoras. Como ya ha sido señalado por varios autores las diferencias encontradas en la actividad biosintética entre cultivos es un fenómeno común en el Cultivo de Tejidos Vegetales, y aun cuando su explicación es aun desconocida, se plantean como posibles causas de esta inestabilidad: 1) la presencia de varios quimiotipos celulares diferentes dentro de la población celular, lo cual ha sido demostrado en clones de *Catharanthus roseus* derivados de protoplastos y productores de ajmalicina y serpentina (Constabel y col., 1982) y 2) la posibilidad de que la producción de metabolitos secundarios por Cultivo de Tejidos Vegetales este sujeta a algún proceso intrínseco

que lleve a una variabilidad continua en los niveles de producción (Tabata y col., 1978). Con respecto a este último punto, Zenk (1978) plantea que en base a la estabilidad en producción existen al menos dos clases de cultivos celulares; uno de ellos produce los compuestos específicos en altos niveles y la mayoría o todas las células lo hacen, de esta de esta manera estos cultivos son tanto altamente productores como estables por muchos años, ejemplos típicos de esta clase de cultivo son las especies *Dioscorea deltoidea*, *Panax ginseng*, *Morinda citrifolia*, *Ammi visnaga* y *Coleus blumei*, cuyas producciones se han mantenido estables por periodos de tiempo muy largos, lo cual demuestra claramente la estabilidad de las células diploides en su capacidad de formar ciertos productos.

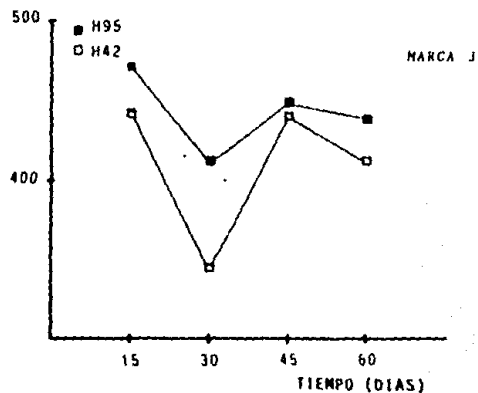
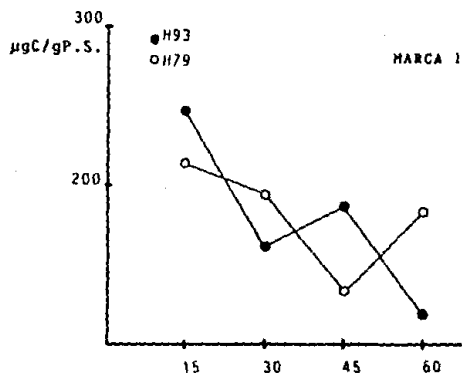
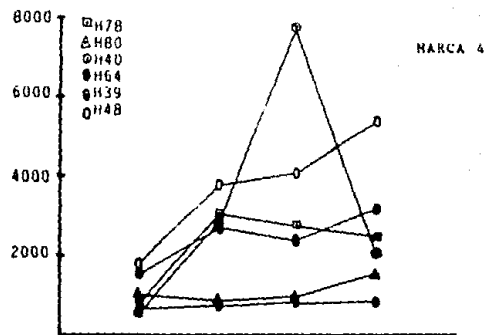
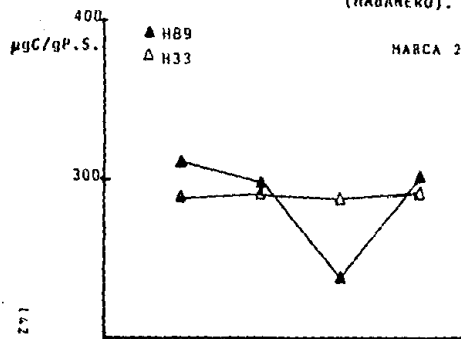
Un segundo tipo de cultivo *in vitro* es representado por un gran número de especies, entre las que destacan *Catharanthus roseus*, *Nicotiana tabacum* y *Capsicum frutescens*; en este caso las líneas celulares altamente productoras fueron obtenidas únicamente por selección clonal y siempre mostraron una considerable inestabilidad bioquímica a lo largo de los subcultivos, sin embargo, fue posible la recuperación de su característica de alta capacidad biosintética cuando se mantuvieron bajo procesos de selección continua. Aun cuando se ha atribuido que este comportamiento en la actividad biosintética está influenciado por factores nutricionales y ambientales su variabilidad en el último de los casos es un resultado directo de inestabilidad genética. Existen un gran número de evidencias de la aparición de cambios cromosómicos y mutaciones puntuales durante los cultivos *in vitro* (Bayliss, 1980; Meins, 1983), sin embargo no toda esta inestabilidad en la producción se puede atribuir a cambios genéticos, ya que también se tiene conocimiento de

que en condiciones *in vitro* se presentan cambios reversibles en la expresión genética, llamados cambios epigenéticos, lo cuales al parecer se asocian más con el control y la regulación de la actividad bioquímica de las células cultivadas (Warcing y col., 1985). Estos cambios epigenéticos son manifestados en respuesta a condiciones nutricionales, hormonales y ambientales, dirigidas de tal forma que bajo condiciones inductivas se aumenta la velocidad de variación.

Estas observaciones sugieren que para el caso del chile Jalapeño el tipo de cultivo que se presentó es del tipo de *E. roseus*, es decir, que se caracterizó por su inestabilidad en la capacidad biosintética, lo cual pudo haberse debido a la aparición de cambios epigenéticos causados por los diferentes condiciones de cultivo que se presentaron durante los subcultivos, ya que como menciona Scragg y col. (1988), las variaciones tanto nutricionales como ambientales en los subcultivos de una línea celular de *E. roseus* provocaron la inestabilidad de la misma en cuanto a su producción de serpentina.

Pasando ahora al chile Habanero (Figura 12), se observa que al igual que en Jalapeño, se presentó una separación entre cada marca previamente establecida de acuerdo a la selección primaria con el reactivo de Gibbs. En esta especie, los clones que se agruparon dentro de la marca 1 variaron de 120.11 a 244.16 $\mu\text{gC/g}$ peso seco, los de la marca 2 fluctuaron entre 237.8 y 312.16 $\mu\text{gC/g}$ peso seco, los de la marca 3 entre 343.15 y 417.13 $\mu\text{gC/g}$ peso seco y por último los de la marca 4 correspondieron de 515.46 a 7786 $\mu\text{gC/g}$ peso seco. De estos resultados se puede concluir que aun cuando se presentó una clara separación entre cada marca, también se observó que las diferencias entre una y otra fueron muy pequeñas, lo cual era de esperarse debido a que en esta especie se observó la

FIGURA 12. FLUCUACION EN EL CONTENIDO DE CAPSAICINOIDES DE
12 LINEAS CELULARES SELECCIONADAS DE *C. chinense*
(HABANERO).

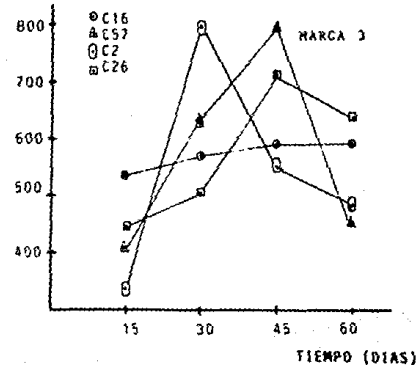
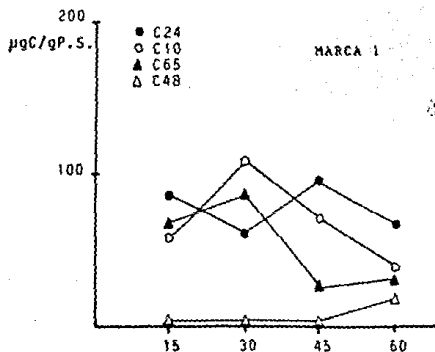
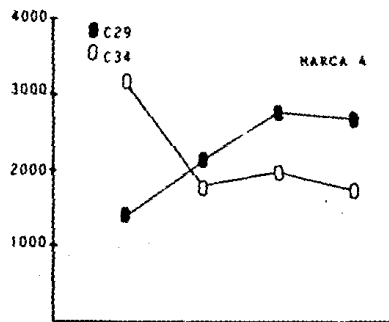
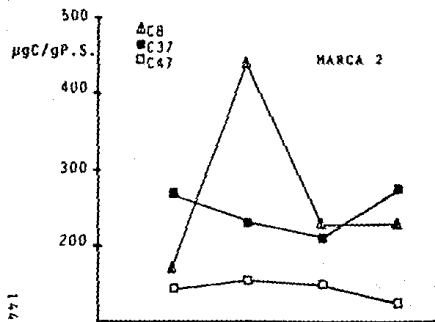


presencia de otros compuestos fenólicos (caracterizados por el color café que presentaron los cultivos tanto en medio semisólido como en suspensión) que provocaron interferencias en la reacción del reactivo de Gibbs y los CAPS durante la selección primaria. Este mismo hecho puede explicar el que dentro de la marca 4 (cultivos productores), como ya se dijo anteriormente, se presentara una mayor variabilidad entre los clones y sobretodo en una misma línea.

Como se puede apreciar en la Figura 12, y a diferencia del chile Jalapeño, las líneas agrupadas en las marcas 1, 2 y 3 tuvieron la tendencia general de disminuir su producción a lo largo del tiempo, mientras que las encasilladas en la marca 4 tendieron a aumentar su producción a través de los subcultivos. Estos dos diferentes comportamientos dentro de la misma especie pueden ser explicados como el resultado del diferente origen que tuvo cada línea. De manera general el comportamiento de cada línea de Jalapeño fue de mantenerse fluctuando dentro de un mismo rango; contrariamente, para el chile Habanero (Figura 12), el comportamiento general fue la disminución en la producción a lo largo de los subcultivos para las marcas 1, 2 y 3 y de elevación para la 4, lo cual comprueba el efecto de la fuente vegetal y la presencia del fenómeno de Variación Somaclonal.

En la Figura 13 se presentan los resultados obtenidos para el chile Chiltepin, donde se puede apreciar que esta fue la especie que presentó el mayor índice de variabilidad, lo que impidió establecer un tipo de comportamiento característico. En esta especie las líneas de la marca 1 variaron de 18.1 a 109.01 $\mu\text{gC/g}$ peso seco, las de la marca 2 cayeron en el rango de 123.71 a 441.50 $\mu\text{gC/g}$ peso seco, las correspondientes a la marca 3 fluctuaron de 341.18 a 797.27 $\mu\text{gC/g}$ peso seco, mientras que las de la

FIGURA 13. FLUCTUACION EN EL CONTENIDO DE CAPSAICINOIDES DE
13 LINEAS CELULARES SELECCIONADAS DE
C. annuum var. *glabriusculum* (CHILTEPIN).



marca 4 tuvieron un rango de 1392.82 a 3189.09 $\mu\text{gC/g}$ peso seco; resultados que nos llevan a establecer que en este caso la separación entre las marcas fue menos clara que en Jalapeño y Habanero, ya que hubo puntos que tuvieron producciones traslapadas; por otro lado, no se observó ningún tipo de comportamiento, ya que mientras unos clones se mantuvieron más o menos estables (marca 1), otros presentaron tanto oscilaciones drásticas seguidas de un comportamiento sin variación (marcas 3 y 4). Estos resultados, al igual que los obtenidos en Jalapeño y Habanero, confirman la importancia del origen del material vegetal y la necesidad de llevar a cabo selecciones continuas que permitan obtener altas producciones de una manera estable.

En base a lo anterior se puede concluir que las líneas celulares obtenidas en este trabajo presentaron variabilidad en su producción a lo largo del tiempo de estudio, sin embargo, fue posible enmarcarlas dentro de las marcas preestablecidas en la selección primaria. Por otro lado se observó que el origen biológico del material vegetal tuvo marcada influencia sobre el comportamiento de los subcultivos, ya que mientras Jalapeño, que partió de un cultivar mejorado, se comportó de una manera estable, Chiltepín, de origen totalmente silvestre, presentó un alto grado de variabilidad en los patrones de producción.

Las líneas celulares aquí obtenidas tuvieron el mismo comportamiento que ya antes había sido observado en otras especies, donde los cultivos, a pesar de haber sido derivados de células aisladas, exhibieron un amplio rango de variación en la producción, por lo que se plantea la necesidad de realizar selecciones continuas para así asegurar una productividad y estabilidad necesaria para el desarrollo biotecnológico.

Cabe aclarar que aun cuando la mayoría de nuestras líneas seleccionadas presentaron inestabilidad en su capacidad biosintética, no se observaron casos donde la tendencia fuera la disminución de esta característica a lo largo de los subcultivos. Tomando en cuenta este comportamiento, y el hecho que el picor en las especies del género *Capsicum* está controlado por un solo gen dominante (C/C unido a Est-7 del cromosoma 11 del genoma de *Capsicum*) (Loaiza y Tanksley, 1988), es posible sugerir que la inestabilidad en la capacidad biosintética de las líneas obtenidas estuvo determinada principalmente por cambios epigenéticos, ya que aun cuando hubo variaciones en la producción de CAPS, se observó que, sobretodo en Jalapeño, todos los datos cayeron dentro de un rango determinado y que no hubo disminuciones muy marcadas, de tal forma que estas variaciones pudieron haber sido debidas a algún cambio dentro de las condiciones del cultivo que indujeron diferentes respuestas en la expresión genética; por otro lado se ha sugerido que la pérdida o la variabilidad de la producción de metabolitos secundarios por cultivos *in vitro* es debida principalmente a cambios epigenéticos que se manifiestan como resultado de las variaciones que sufren las condiciones nutricionales, hormonales y ambientales durante los subcultivos de las líneas celulares (Wareing y col., 1985; Scragg y col., 1988).

Estos resultados también sugieren que el uso del reactivo de Gibbs como método de selección primaria es muy confiable, ya que aun cuando las líneas presentaron inestabilidad, se observa que los rangos de producción entre las diferentes marcas se mantuvieron constantes, de tal manera que existió una separación cuantitativa constante entre ellos, sobretodo en las especies Jalapeño y Habanero, mientras que en Chiltepin hubo problemas de traslape

entre algunos de ellos.

El comportamiento de las líneas obtenidas para estas tres especies sugiere que éstas forman parte del grupo de cultivos caracterizados por su inestabilidad bioquímica, y cuyas bases genéticas y fisiológicas no son totalmente entendidas, de lo cual resalta la necesidad de llevar a cabo estudios que permitan esclarecer por un lado, las causas de esta inestabilidad y por el otro, como se puede regular la capacidad biosintética a través de factores tanto físicos como químicos.

6. CONCLUSIONES.

* La relación entre el origen del material vegetal y el comportamiento del mismo en cultivos *in vitro* se vió reflejada a lo largo del presente trabajo, sobretodo en los resultados obtenidos en la germinación, en la respuesta a los métodos de plaqueo y en la estabilidad de las líneas seleccionadas.

* Los medios de cultivo que dieron los mejores resultados en la obtención de suspensiones con buen crecimiento y alto grado de disgregabilidad fueron el MS3 para el chile Habanero y el SH3 para el chile Jalapeño y el Chiltepín.

* El método de Weber y Lark modificado^m para las especies *C. annuum* var. *annuum* (Jalapeño) y *C. chinense* (Habanero), y el de Horsch modificado^m para *C. annuum* var. *glabriusculum* (Chiltepín), fueron los más adecuados para la obtención de clones celulares, ya que permitieron obtener las mayores eficiencias de plaqueo a las menores concentraciones celulares, evitando con esto la posibilidad de coalición entre células adyacentes durante su crecimiento.

* El uso de células alimentadoras en medio de cultivo líquido permitió por un lado obtener un mayor número de clones, y por el otro disminuir el tiempo de inducción de los mismos, en las tres especies de *Capsicum*.

* La especie *Capsicum annuum* var. *glabriusculum* (Chiltepín) presentó mayores requerimientos de cultivo para la inducción de crecimiento a partir de células aisladas.

* Los valores de eficiencia de plaqueo más altos que se obtuvieron en este trabajo fueron del 13.04% para Jalapeño, 10.80% para Habanero, y 4.03% para Chiltepín.

* El uso del reactivo de Gibbs con la técnica modificada de Rajpoot y Govindarajan (1981), resultó ser el más adecuado como método de selección cualitativa primaria y de descarte, ya que fue rápido y confiable para determinar dentro de un gran número de clones cual presentaba una mayor producción de CAPS.

* La falta de correspondencia cuantitativa entre la selección primaria y la selección secundaria se debió a que cada una de ellas se llevó a cabo bajo condiciones muy diferentes; sin embargo, si se observó una correspondencia cualitativa entre ambos métodos, lo que permitió establecer a la selección primaria como método grueso de determinación y descarte.

* Las líneas seleccionadas como de mayor producción fueron la J122 (239.12 $\mu\text{gC/g}$ peso seco) y la J172 (289.29 $\mu\text{gC/g}$ peso seco) para la especie Jalapeño; la C29 (1392.86 $\mu\text{gC/g}$ peso seco) y la C34 (3189.99 $\mu\text{gC/g}$ peso seco) para el chile Chiltepin y para Habanero se seleccionaron la H40 (515.46 $\mu\text{gC/g}$ peso seco), la H39 (618.78 $\mu\text{gC/g}$ peso seco), la H78 (786.48 $\mu\text{gC/g}$ peso seco), la H80 (1038.06 $\mu\text{gC/g}$ peso seco), la H64 (1445.78 $\mu\text{gC/g}$ peso seco) y la H48 (1717.13 $\mu\text{gC/g}$ peso seco). De esta manera se comprobó que la técnica de clonación celular para la obtención de líneas con altas producciones de metabolitos secundarios fue muy favorecedora, ya que permitió generar líneas cuya capacidad biosintética superó en gran medida a la de los cultivos de los cuales partieron.

* Las líneas celulares obtenidas en este trabajo superaron los niveles de producción encontrados en otras especies de *Capsicum* bajo condiciones *in vitro*, sin embargo, todavía se encuentran muy por abajo de los obtenidos en fruto.

* Tanto la producción de capsaicinoides y el

crecimiento en los cultivos en suspensión de las líneas seleccionadas, como la capacidad biosintética de estas y la de los cultivos de los que se originaron, no presentó ningún tipo de comportamiento claro que permitiera establecer alguna relación entre los parámetros estudiados.

* De acuerdo al estudio preliminar de la estabilidad en las líneas seleccionadas se plantea por un lado, que la variabilidad observada en su capacidad biosintética pudo haber sido causada por modificaciones en la expresión genética (cambios epigenéticos) originados por el régimen de subcultivos sin selección a los que estuvieron expuestas, y por el otro que las especies aquí estudiadas pertenecen al grupo de cultivos caracterizados por su inestabilidad bioquímica a lo largo de los subcultivos, por lo que se sugiere llevar a cabo procesos de selección continua para asegurar la productividad y la estabilidad necesaria en el desarrollo de un proceso biotecnológico.

* Tanto el fenómeno de Variación Somaclonal como la inestabilidad característica de este género plantea la necesidad de usar métodos de conservación para células vegetales que impidan la variabilidad y la pérdida de la capacidad biosintética de las células seleccionadas.

7. REFERENCIAS.

Aitken, M. & M. Yeoman. 1986. A rapid screening technique for the selection of high yielding capsaicin cell lines of *Capsicum frutescens* Mill. In: "Secondary metabolism in plant cell cultures" (Morris, P., A. Scragg, A. Stafford, & M. Fowler, Eds.), p: 224-230. Cambridge, U.K.

Bajaj, K.L. 1980. Colorimetric determination of capsaicin in *Capsicum* fruits. Assoc. Off. Anal. Chem. 63(6): 2314-2316.

Balandrin, F.M., A.J. Klocke, S.E. Wurtele & H. Bollinger. 1985. Natural plant chemicals: sources of industrial and medical materials. Science 229: 1154-1160.

Balza, S.I., M.S. Karawa & A.M. Girgis. 1968. The capsaicin content of *Capsicum* fruits at different stages of maturity. Lloydia 31: 272-274.

Bayliss, M. 1973. Origin of chromosome number variation in cultured plant cells. Nature. 246 21/28: 520-530.

Bayliss, M. 1980. Chromosomal variation in plant tissues in culture. In "Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture" (Vasil, I.K., Eds.), p: 113-140. Int. Rev. of Cyt. Supplm. 11A. New York.

Bennott, D.J. & G.W. Kirby. 1968. Constitution and biosynthesis of capsaicin. J. Chem. Soc. C: 442-446.

Benzion, G. R. Phillips, & W. Rines. 1986. Case histories of genetic variability *in vitro*: oats and maiza. In "Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants" (Vasil, I.K. Eds.), 3: 435-448. New York Academic.

Bergmann, L. 1977. Plating of plant cells. In "Plant tissue culture and its bio-technological application. (Barz,

W. E. Reinhard & M.H. Zenk, Eds.). p: 213-225.
Springer-Verlag Berlin Heidelberg N.Y.

Berlin, J. 1981. Formation of putrescine and cinnamoyl putrescines in tobacco cell cultures. *Phytochemistry*, 20: 53-55.

Brinberg, R.P., D.A. Somers & M.L. Brenner. 1988. Characterization of conditioning factors that increase colony formation from "Black Mexican Sweet Corn" protoplasts. *J. Plant Physiol.* 132: 316-321.

Calva, C.G. 1988. Producción de capsaicinoides por células del género *Capsicum* en cultivo sumergido. Informe de Actividades de Investigación 1988. CINVESTAV-Biotecnología y Bioingeniería.

Cella, R. & E. Galun. 1980. Utilization of irradiated carrot cell suspensions as feeder layer for cultured *Nicotiana* cells and protoplasts. *Plant Science Letters*, 19: 243-252.

Chaleff, R. 1983. Isolation of agronomically useful mutants from plant cell cultures. *Science*, 219: 676-682.

Collin, H. 1987. Determinants of yield of secondary products in plant tissue culture. In "Advances in Botanical Research". Vol. 13. p: 145-187. Academic Press Inc. London. LTD.

Conner J.A. & C.P. Meredith. 1984. An improved polyurethane support system for monitoring growth in plant cell cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 3: 59-68.

Constabel, F., W. Kurz & J. Kutney. 1982. Variation in cell cultures of periwinkle *Catharanthus roseus*. In "Plant Cell Culture 1982" Proc. 5th Intl. Con. Plant Tissue 7 cell Culture. Fujiwara, A. Eds. p: 301-304. Tokyo. Abe Photo Printing.

Cormier, F. & C.B. Do. 1988. Selection of monoterpene

producing mentha piperita cell lines. In "Bioflavour 1987 Analysis Biochem. Biotechnology". (Schreiber, P., Eds.). p: 357-363. Waster de Gryter Berlin N.Y.

Cresswell, R.C. 1986. Selection studies on *Catharanthus roseus*. In "Secondary metabolism in plant cell cultures" (Morris, P., A. Scragg, A. Stafford. & M. Fowler, Eds.). p: 230-236. Cambridge, U.K.

D'Amato., F. 1978. Chromosome number variation in cultured cells and regenerated plants. In "Frontiers of Plant Tissue Culture" (Thorpe, A., Eds.). p: 287-295. Int. Assoc. for Plant Tissue Culture. Canada.

Dennis, E., R. Brettel & W. Peacock. 1987. A tissue culture induced Adh1 null mutant of maize results from a single base change. Mol. Gen. Genet. 210: 181-183.

Deus, B. & M.H. Zenk. 1982. Exploitation of plant cells for the production of natural compounds. Biotechnology and Bioengineering. 24(9): 1995-1974.

Diaz, I., R. Moreno & J. Power. 1988. Plant regeneration from protoplasts of *Capsicum annuum*. Plant Cell Reports. 7: 210-212.

Dougall, D. 1985. Chemicals from plant cell cultures: yields and variation. In " Biotechnology in Plant Science Relevance to Agricultural in the Eighties" (Zaitlin, M., P. Day & A. Hollaender Eds.). p: 179-180. Academic Press.

Earle, E., V. Gracen, V. Best, L. Batts & M. Smith. 1987 Fertile revertants from S-type male-sterile maize grown *in vitro*. Theor. and Applied Genetics. 74(5). p: 601-604.

Ellis, B. 1982. Cell-to-cell variability in secondary metabolite production within cultured plant cell populations. Proc. 5th. Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Culture. Plant Tissue Culture, 1982.

Evans, D.A. 1989. Somaclonal variation-genetic basis and breeding applications. Trends in Genetics. 5(2): 46-50.

Fowler, W. 1982. Sustrate utilization by plant cell cultures. J. Chem. Tech. Biotechnol. 32: 338-346.

Fowler, M.W. 1983. Plant cell natural products. Proc. of Int. Conf. on the Com. Appl. and Imp. of Biotech. 1983. p:307-316.

Fowler, M.W. 1984. Plant cell culture: Natural products and industrial application. Biotech. and Genetic Engineering Reviews. 2: 41-67.

Fujimura, T. & A. Komamine. 1984. Fractionation of cultured cells. In "Cell culture and somatic cell genetics of plants". Vol. 1. (Vasil, I.K. Ed.). p: 159-166. Academic Press Inc. U.S.A.

Fujita, Y., Y. Hara, Ch. Suga & T. Morimoto. 1981. Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. II. A new medium for the production of skikonin derivatives. Plant Cell Reports. 1: 81-83.

Fujita, Y. & Y. Hara. 1985. The effective production of shikonin by cultures with an increased cell population. Agric. Biol. Chem. 49(7): 2071-2075.

Fujiwake, H., T. Suzuki & S. Oka. 1980. Enzymatic formation of capsaicinoid from vanillylamine and Iso-type fatty acids by cell-free extracts of *Capsicum annum* var. *annuum* cv. *Aarayatsubusa*. Agric. Biol. Chem. 44(12): 2907-2912.

Fujiwako, H., T. Suzuki & K. Iwai. 1982. Intracellular distributions of enzymes and intermediates involved in biosynthesis of capsaicin and its analogues in *Capsicum* fruits. Agric. Biol. Chem. 46(11): 2685-2689.

Fukui, H., K. Nakagawa, S. Tsuda & M. Tabata. 1982.

Production of isoquinoline alkaloids by cell suspension cultures of *Opuntia japonica*. In "Plant Tissue Culture 1982", Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Culture. Fujiwara, A Eds. p: 313-314. Abe Photo Printing. Tokio.

Gierer, J. 1954. Die reaktion von chinonmonchlorimid mit lignin. Acta Chemica Scandinavica. 8: 1319.

Govindarajan, V.S. 1986a. *Capsicum*: production, technology, chemistry and quality. II. Processed products, standards, world production and trade. CRC. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 23: 207.

Govindarajan, V.S. 1986b. *Capsicum*: production, technology, chemistry and quality. III. Chemistry of the color, aroma and pungency stimuli. CRC. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 24: 245.

Govindarajan, V.S. 1987. *Capsicum*: production, technology, chemistry and quality. IV. Evaluation of quality. CRC. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 25(3): 185-282.

Green, B.G. & L.J. Flammer. 1988. Capsaicin as a cutaneous stimulus: sensitivity and sensory qualities on hairy skin. Chemical Senses. 13(3): 367-384.

Hahlbrock, K., E. Oaks, A. Auden & J. Liersch. 1974. Determination of specific growth stages of plant cell suspension cultures by monitoring conductivity in the medium. Planta. 118: 75-84.

Hartman, T. & D. Kester. 1980. Propagación de plantas. principios y prácticas. CECSA. México.

Heiser, Ch. B. & P. G. Smith. 1953. The cultivated *Capsicum* peppers. Economic Botany. 7: 214-226.

Heiser, B. & B. Pickersgill. 1969. Names for the cultivated *Capsicum* species (Solanaceae). Taxon. 18: 277-283.

Holden, R., M. Aitken, K. Lindsey & M. Yeoman. 1986. Variability and stability of cell cultures of *Capsicum*

frutescens In "Secondary metabolism in plant cell culture" (Morris, P., A. Scragg, A. Stafford & M. Fowler, Eds.) p: 237-243. Cambridge U.K.

Holden, M., R. Hall, K. Lindsey & M. Yeoman. 1987. Capsaicin biosynthesis in cell cultures of *Capsicum frutescens*. In "Plant and Animal Cells: Process Possibilities" (Webb, C. & F. Mavituna. Eds.) p: 45-63. Ellis Horward Limited.

Holden, P., M. Holden & M. Yeoman. 1988. Variation in the secondary metabolism of cultured plant cells. In "The Manipulation Secondary Metabolism in Culture" (Robins, R. & M. Rhodes Eds.). p: 15-29. Cambridge England.

Horsch, R. & G. Jones. 1980. A double filter paper technique for plating cultured plant cells. In Vitro. 19(2): 103-108.

Horsch, R. 1984. Quantitative plating technique. In "Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants" (Vasil, I.K. Eds.). Vol.1. p: 192-197. Laboratory Procedures and their Applications. Academic Press Inc.

Hrubcová, M., M. Cvikrová, F. Pospíšil, L. Meravy & J. Eder. 1988. Content of phenolic acids in callus culture of Alfalfa (*Medicago sativa*): the effect of age and biochemical differentiation. Biologia Plantarum (PRAHA). 30(5): 321-326.

Ikeda, T., T. Matsumoto & M. Noguch. 1976. Effects of nutritional factors on the formation of ubiquinone by tobacco plant cells in suspension culture. Agric. Biol. Chem. 40: 1768-1769.

Instituto Nacional de la Nutrición 1977. Valor nutritivo de los alimentos mexicanos. Publicación de División de Nutrición. México.

Iwai, K., R. Lee, M. Kobashi & T. Suzuki. 1977a. Formation of pungent principles in fruits of sweet pepper:

Capsicum annuum L. var. *groscum* during post-harvest ripening under continuous light. Agric. Biol. Chem. 41(10): 1873-1876.

Iwai, K., T. Suzuki, K. Lee, M. Kobashi & S. Oka. 1977b. *In vivo* and *in vitro* formation of dihydrocapsaicin in sweet pepper fruits, *Capsicum annuum* L. var. *groscum*. Agric. Biol. Chem. 41(10): 1877-1882.

Iwai, K., K.R. Lee, M. Kobashi, T. Suzuki & S. Oka. 1978. Intracellular localization of the capsaicinoid synthesizing enzyme in sweet pepper fruits. Agric. Biol. Chem. 42(1): 201-202.

Iwai, K., T. Suzuki & H. Fujiwake. 1979. Formation and accumulation of pungent principle of hot pepper fruits, capsaicin and its analogues, in *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. *Karayabubusa* at different growth stages after flowering. Agric. Biol. Chem. 43(12): 2493-2498.

Joint Comm of the Pharm. Soc. and the Soc. for Anal. chem. on mets. of Assay of Crude Drugs. 1964. The determination of the content of *Capsicum* and its preparations. Analyst. 89(1099): 377-388.

Kibler, R. & K. Neumann. 1980. On cytogenetic stability of cultured tissue and cell suspensions of haploid and diploid origin. In "Plant Cell Cultures: Results and Perspectives" (Sala, F., B. Parisi, R. Cella & O. Cifferi Eds.). p: 89-88. Elsevier/North-Holland Biomedical Press.

Kinnersley, A.M. & D.K. Dougall. 1980. Increase in anthocyanin yield from wild-carrot cell cultures by a selection system based on cell-aggregate size. Planta. 149: 200-204.

Knobloch, K. & J. Berlin. 1980. Influence of medium composition on the formation of secondary compounds in cell suspension culture of *Catharanthus roseus* L. G. Don. Z. Naturforsch. 35c: 551-556.

Knobloch, K. & J. Berlin. 1981. Phosphate mediated regulation of cinnamoyl putrescine biosynthesis in cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum*. *Planta Medica*. 42: 167-172.

Knobloch, K. & J. Berlin. 1983. Influence of phosphate on the formation of the indole alkaloids and phenolic compounds in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2: 333-340.

Knoop, B. & R. Beiderbeck. 1985. Adsorbent filter: a tool for the selection of plant suspension culture cells producing secondary substances. *Z. Naturforsch.* 40c: 297-300.

Larkin, P. & W. Scowcroft. 1981. Somaclonal Variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60: 197-214.

Larkin, J.P., R. Brettell, S. Ryan, P. Davies, M. Pallotta & W. Scowcroft. 1985. Somaclonal Variation: impact on plant biology and breeding strategies. In "Biotechnology in plant science relevance to agriculture in the eighties". (Zaitlin, M., P. Day & A. Hollaender, Eds.). p: 83-100. Academic Press.

Larkin, P. 1987. Somaclonal Variation: history, method and meaning. *Iowa State J. Res.* 61: 393-434.

Lee, M. & R.L. Phillips. 1988. The chromosomal basis of Somaclonal Variation. *Ann Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 39: 413-437.

Leeman, E. & G. Rainer. 1981. Substance P in sensory neurons. *Trends Pharmacol. Sci.* 2(5): 119-121.

Leete, E. & M. Louden. 1988. Biosynthesis of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicum frutescens*. *J. Amer. Soc.* 50: 6837-6841.

Lindsey, K. & M.M. Yeoman. 1983. The relationship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation

in cell cultures. J. Exp. Bot. 34(145): 1055-1063.

Lindsey, K. 1985. Manipulation by nutrient limitation, of the biosynthetic activity of immobilized cells of *Capsicum frutescens* Mill. cv. *annuum*. Planta. 165: 126-133.

Lindsey, K. & M.M. Yeoman. 1985. Immobilised plant-cell culture systems. In "Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures. (Neumann, K. W. Barz, & E. Reinhard Eds.). p: 304-315. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg.

Loaiza, F. & S. Tanksley. 1988. Genetics of a second locus determining pungency in chilli peppers (*Capsicum*). J. of Heredity. 79(4): 314-315.

Logemann, H., & L. Bergmann. 1974. Einfluß von licht und medium auf die plating efficiency isolierter Zellen aus calluskulturen vor *Nicotiana tabacum* var *Samsun*. Planta 121: 283-292.

Lomeli, A. 1986. El chile y otros picantes. Ed. Prometeo Libre. México. 258 p.

Long, S. 1986. *Capsicum* y cultura: la historia del chile. Fondo de Cultura Económica. México. 180 p.

Lörz, H., & W. Scowcroft. 1983. Variability among plants and their progeny from protoplasts of Su/su heterozygotes of *Nicotiana tabacum*. Theor. Appl. Genet. 66: 67-75.

Luckner, M. 1980. Expression and control of secondary metabolism. In "Encyclopedia of plant physiology" (Bell, E.A. & B.U. Charlwood, Eds.). 8: 23-63. Springer-Verlag Berlin Heidelberg N.Y.

Maga, J.A. 1975. *Capsicum*. CRC. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 9: 177-199.

Maisch, R., B. Knoop & R. Beiderbeck. 1986. Adsorbent culture of tobacco cell suspensions with different

adsorbents. Z. Naturforsch. 41c: 1040-1044.

Mantell, S. & H. Smith. 1983. Cultural factors that influence secondary metabolite accumulations in plant cell and tissue cultures. In "Plant Biotechnology" (Mantell, S. & H. Smith, Eds.). p: 75-108. Cambridge U.K.

Mantell, S. 1986. Somaclonal Variation. In "Secondary Metabolism in Plant Cell Cultures". (Morris, P., A. Scragg, A. Stafford & M. Fowler, Eds.). p: 208-212. Cambridge U.K.

Matsumoto, T., N. Kanno, T. Ikeda, Y. Obi, T. Kasaki & M. Noguchi. 1981. Selection of cultured tobacco cell strains producing high levels of ubiquinone 10 by a cell cloning technique. Agric. Biol. Chem. 45C7: 1627-1633.

Meins, F. Jr. 1983. Heritable variation in plant cell culture. Ann. Rev. Plant Physiol. 34: 327-346.

Meredith, C.P. 1983. On being selective: mutants from cultured cell. Plant Molecular Biology Reports. 1: 105-110.

Misawa, M. 1985. Production of useful plant metabolites. In "Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology". (Fletcher, A. Eds.) 31: 59-88. Plant Cell Culture. Berlin, Tokyo.

Mizukami, H., M. Konoshima & M. Tabata. 1977. Effect of nutritional factors on skikonin derivative formation in *Lithospermum* callus cultures. Phytochem. 16: 1183-1186.

Mizukami, H., M. Konoshima & M. Tabata. 1978. Variation in pigment production in *Lithospermum erythrorhizon* callus cultures. Phytochemistry. 17: 95-97.

Monserreucosorn, Y., S. Kongsamut & D. Pezalla. 1982. Capsaicin: a literature survey. CRC. Crit. Rev. Toxicol. 10: 231-339.

Morris, P. 1986. Long term stability of alkaloid productivity in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. In "Secondary metabolism in plant cell culture"

(Morris, P.A., A. Scragg, A. Stafford & M. Fowler, Eds.). p: 257-262. Cambridge U.K.

Murashige, T. & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

Nagata, T. & I. Takebe. 1971. Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium *Planta.* 99: 12-20.

Nozue, M., J. Kawai & K. Yoshitama. 1987. Selection of a high anthocyanin-producing cell line of sweet potato cell cultures and identification of pigments. *J. Plant Physiol.* 129: 81-88.

Ochoa, N. 1989. Producción de capsaicinoides en células del género *Capsicum* en cultivo sumergido. Informe técnico final Proyecto CONACYT 3155.

Ogino, T., N. Hiraoka & M. Tabata. 1978. Selection of high nicotine-producing cell lines of tobacco callus by single-cell cloning. *Phytochem.* 17: 1907-1910.

Palmer, J.E. & J. Widholm. 1975. Characterization of carrot and tobacco cell cultures resistant to p-fluorophenylalanine. *Plant Physiol.* 56: 233-238.

Pankar, D.S. & N.G. Magar. 1977. New method for the determination of capsaicin by using multi-band thin layer chromatography. *J. of Chromatography.* 144: 149-152.

Partenen, C.R. 1963. Plant tissue culture in relation to developmental cytology. *Int. Rev. of Cytol.* 15: 215-243.

Payne, G.F., N.N. Payne, M.L. Shuler & M. Asada. 1988. *In vitro* adsorption for enhanced alkaloid production by *Catharanthus roseus*. *Biotech. Letters.* 10(3): 187-192.

Pickersgill, B. 1969. The domestication of chilli peppers. In "The domestication and exploitation of plant and animals" (Ucko, J. & W. Dimbleby, Eds.). p: 443-449. Gerald

Duckworth & Co. Great Britain.

Pozo, O. & J.C. Laborde 1984. Presente y pasado del chile en México. SARH-INIA. Publicación Especial No. 85. 1a. reimpression. 80 p.

Purseglove, J.H., S.R. Robbins, C.L. Green & E.G. Brown. 1981. Chillies: *Capsicum* sp. In "Spices". Vol.1, Chap. 7. Longman group limited. London and New York. p: 331-439.

Quesnel, A.A. & B.E. Ellis. 1987. Population responses in tobacco cell cultures during selection for resistance to p-fluorophenylalanine. Plant Science. 49: 223-229.

Rajpoot, N.C. & V.S. Govindarajan. 1981. Paper chromatographic determination of total capsaicinoids in *Capsicum* and their oleoresins with precision reproducibility and validation through correlation with pungency in Scoville Units. JAOAC. 64(2): 311-318.

Ranch, J., S. Rick, J. Brotherton & J. Widholm. 1983. Expression of 5-methyltryptophan resistance in plants regenerated from resistant cell lines of *Datura innoxia*. Plant Physiol. 71: 136-140.

Ramos, V.A. 1988. Comunicación personal.

Raveh, D., E. Huberman & E. Galun. 1973. *In vitro* culture of tobacco protoplasts: use of feeder techniques to support division of cells plated at low densities. In vitro 9(3): 216-222.

Reynolds., T. & T. Murashige. 1979. Plant cell lines. In "Methods in Enzymology". Academic Press Inc. p: 478-488.

Rhodes, M., R. Robins, A. Parr & J. Hamill. 1987. Secondary product formation in plant cell cultures. J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl. p: 105s-114s.

Rhodes, M., J. Hamill, A. Parr, R. Robins & N. Walton. 1988. Strain improvement by screening and selection techniques. In "The Manipulation Secondary Metabolism in

Culture" (Robins, R & M. Rhodes Eds.). p: 83-93. Cambridge. England.

Rodríguez, M. 1989. Manipulación del medio de cultivo de células de *Capsicum annuum* var. *glaberrimum/aviculare* para la producción de capsaicinoides. Tesis ENEP-Zaragoza. UNAM. 103 p.

Rodríguez, M. & A. Ramos. 1986. Producción de capsaicinoides por células del género *Capsicum* en cultivo sumergido. Informe de actividades 1986. CINVESTAV Biotecnología y Bioingeniería.

Salgado-Garciglia, R. Comunicación personal.

Sato, F. & Y. Yamada. 1984. High berberine-producing cultures of *Opello japonica* cells. *Phytochemistry*, 23(2): 281-289.

Schenk, R. & A. Hildebrandt. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50: 199-204.

Scowcroft, W. & P. Larkin. 1988. Somaclonal Variation. In "Applications of Plant Cell and Tissue Culture". Ciba Foundation Symposium 137. p: 21-35. New York.

Scragg, A., R. Cresswell, S. Ashton, A. York, P. Bond & M. Fowler. 1988. Growth and secondary product formation of a selected *Catharanthus roseus* cell line. *Enz. Microb. Technol.* 10: 532-536.

Shuler, M. 1981. Production of secondary metabolites from plant cell tissue: problems and prospects. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 369: 65-80.

Shuler, M.L., J.W. Pyne & G.A. Hallsby 1984. Prospects and problems in the large scale production of metabolites from plant cell tissue cultures. *JAOCS*, 61(11): 1724-1728.

Smith, J.A., C.E. Green & B.G. Gengenbach. 1984. Feeder layer support of low density populations of *Zea mays*

L. suspension cells. *Plant Science Letters*. **36**: 67-72.

Stafford, A., P. Morris & M.W. Fowler. 1986. Plant cell biotechnology: a perspective. *Enzyme Microb. Technol.* **9**: 578-587.

Suzuki, T., H. Fujiwake & K. Iwai. 1980. Intracellular localization of capsaicin and its analogues, capsaicinoids in *Capsicum* fruits. I. Microscopic investigation of the structure of the placenta of *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. *Arayatsubusa*. *Plant Cell Physiol.* **21**(5): 839-853.

Suzuki, T., T. Kawada & K. Iwai. 1981. Biosynthesis of acyl moieties of capsaicin and its analogues from valine and leucine in *Capsicum* fruits. *Plant & Cell Physiol.* **22**(1): 23-32.

Suzuki, 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" (Brossi, A., Eds). **23**: 227-300. Academic Press. Orlando, Florida.

Tabata, M. 1977. Recent advances in the production of medicinal substances by plant cell cultures. In "Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Application" (Barz, W., E. Reinhard & M. Zenk, Eds.). p: 3-16. Springer-Verlag Berlin. New York.

Tabata, M., T. Ogino, K. Yoshioka, N. Yoshikawa & N. Hiraoka. 1978. Selection of cell lines with higher yield of secondary products. In "Frontiers of plant tissue culture 1978" (Thorpe, A. Eds.). p: 213-222. Int. Assoc. for Plant Tissue Culture. Canada.

Tapia, R. 1987. Caracterización de capsaicinoides por HPLC, producidos en callos y células en suspensión del género *Capsicum*. Tesis Facultad de Química. UNAM. 75 p.

Thomas, E. & M. Davey. 1975. From single cells to

plants. Wykeham Publications. London. LTD. p: 66-73.

Thumann, J., B. Knoop & R. Beiderbeck. 1987. The separation of two cell strains with different secondary substance production by means of an improved adsorbent filter technique. *Biologia Plantarum*. 29(6): 422-424.

Todd, P., M. Bensinger & T. Biftu. 1975. TLC screening techniques for the qualitative determination of natural and synthetic capsaicinoids. *J. of Chromatographic Science*. 13: 577-579.

Velázquez, T. 1988. Establecimiento de callos y células en suspensión de tres variedades del género *Capsicum* para la producción de capsaicinoides. Tesis ENEP-Iztacala. UNAM. 83 p.

Wareing, P. & T. Al-Chalabi. 1985. Determination in plant cells. *Biologia Plantarum (PRAHA)*. 27(4-5): 241-248.

Watanabe, K. S. Yano & Y. Yamada. 1982. The selection of cultured plant cell lines producing high levels of biotin. *Phytochem*. 21: 513-516.

Weber, G. & K. Lark. 1979. An efficient plating system for rapid isolation of mutants from plant cell suspensions. *Theor. Appl. Genet*. 55: 81-86.

Wershum, G. 1988. Selecting in higher plant cell cultures : a discussion (Review). *Biochemie und Physiologie der Pflazen*. 183(5): 361-369.

Widholm, J.M. 1980. Selection of plant cell lines which accumulate certain compounds. In "Plant Tissue Culture as a source of Biochemicals" (Staba, E. Eds.). p: 99-113. CRC Press Inc. Florida.

Yamakawa, T., S. Kato, K. Ishida, T. Kodama & Y. Minoda. 1983. Production of anthocyanins by *Vitis* cells in suspension culture. *Agric. Biol. Chem*. 47: 2185.

Yamamoto, Y., R. Mizuguchi & Y. Yamada. 1982.

Selection of a high and stable pigment-producing strain in cultured *Euphorbia millii* cells. In "Plant Tissue Culture" (Fujiwara, A., Eds.). p: 283-284. Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Culture.

Yamamoto, O. & Y. Yamada. 1987. Selection of a reserpine-producing cell strain using UV-light and optimization of reserpine production in the selected cell strain. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 8: 125-133.

Yeoman, M. & A. Macleod. 1977. Tissue (callus) culture techniques. In "Plant Tissue and Cell Culture" (Street, E. Eds.). p: 31-59. Univ. of Calif. Press. Botanical Monographs. Vol. II. U.S.A.

Yeoman, M., K. Lindsey, M. Miedzybrodzka & W. McLauchlan. 1982. Accumulation of secondary products as a facet of differentiation in plant-cell and tissue cultures. in "Differentiation *in vitro*" (Yeoman, M., & D. Truman Eds.). Soc. Cell Biol. Symp. Vol. IV. Cambridge U.P. p: 65-82.

Yeoman, M.M. 1986. Cell line selection. In "Botanical Monographs" Vol. 23. "Plant Cell Culture Technology". (Yeoman, M.M. Eds.). p: 143-201.

Zähner, H. & R. Kurth. 1982. Overproduction of microbial metabolites: the supply of precursors from intermediary metabolism. In "Overproduction of Microbial Products" (Krumphanzl, V., B. Sikyta & Z. Vaněk Eds.). p: 167-179. Academic Press.

Zamski, E., O. Shoham, D. Palevitch & A. Levy. 1987. Ultrastructure of capsaicinoid-secreting cells in pungent and nonpungent red pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars. *Bot. Gaz.* 148(1): 1-8.

Zenk, M., H. El-Shagi & U. Schulte. 1975. Anthraquinone production by cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*. *Planta Medica Suppl.* p: 79-101.

Zenk, M., H. El-Shagi, H. Arens, E. Weiler & B. Deus. 1977. Formation of the indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. In "Plant Tissue Culture and biotechnological applications" (Barz, W. & E. Reinhard, Eds.), p: 27-43.

Zenk, M.H. 1978. The impact of plant tissue culture on industry and agriculture. In "Frontiers of Plant Tissue Culture 1978" (Thorpe, A., Eds.), Int. Assoc. for plant tissue culture. Canada. p: 1-13.

Zieg. R.G., S.W. Zito & E.J. Staba. 1983. Selection of high pyrethrin producing tissue cultures. *Planta medica*. 48: 88-91.