

28  
2ej.



**Universidad Nacional Autónoma de México**

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
PLANTEL ZARAGOZA

MANIPULACION DEL MEDIO DE CULTIVO DE CELULAS DE  
Capsicum annuum var. glabriusculum/aviculare PARA LA  
PRODUCCION DE CAPSAICINOIDES.

## **Tesis Profesional**

Que para obtener el Título de:

**B I O L O G O**

present a

**MARIO RODRIGUEZ MONROY**

México, D. F.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

1989



## **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.

### Principales abreviaturas utilizadas

caps	Capsaicinoides
MS	Medio de cultivo de Murashige y Skoog
MSM9	Medio de cultivo de Murashige y Skoog, con 9 $\mu$ M de 2,4-D.
MSM1	Medio de cultivo de Murashige y Skoog, con 114 nM de AIA y 0.92 nM de cinetina.
SH	Medio de cultivo de Schenk y Hildebrandt.
2,4-D	ácido 2,4-dicloro-fenoxi-acético.
pCPA	ácido p. cloro-fenoxi-acético.
td	Tiempo de duplicación.

# INDICE

	Pag.
INDICE DE CUADROS Y FIGURAS .....	i
I.- RESUMEN .....	1
II.- INTRODUCCION .....	3
III.- ANTECEDENTES	
3.1. EL CHILE Y LA OLEORRESINA .....	7
3.2. LOS CAPSAICINOIDES .....	10
3.3. EL CULTIVO DE CELULAS VEGETALES PARA LA PRODUCCION DE METABOLITOS SECUNDARIOS.....	18
3.3.1. SELECCION DE LINEAS CELULARES .....	22
3.3.2. MANIPULACION DE LOS NUTRIENTES DEL MEDIO DE CULTIVO .....	24
3.3.2.1. REGULADORES DE CRECIMIENTO VEGETAL ....	24
3.3.2.2. FUENTE DE CARBONO .....	26
3.3.2.3. FUENTE DE NITROGENO .....	29
3.3.2.4. RELACION CARBONO / NITROGENO .....	32
3.3.2.5. FUENTE DE FOSFORO .....	33
IV. MATERIALES Y METODOS	
4.1. MATERIAL BIOLÓGICO .....	35
4.2. MEDIOS DE CULTIVO .....	35
4.3. CONDICIONES DE INCUBACION DE LOS CULTIVOS ....	38
4.4. DESINFESTACION DE LAS SEMILLAS .....	38
4.5. INDUCCION DE TEJIDO CALOSO .....	38
4.6. CINETICA DE CRECIMIENTO DEL TEJIDO CALOSO .....	39
4.7. ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS EN SUSPENSION ....	39

4.8.	CINETICA DE CRECIMIENTO DE LOS CULTIVOS EN SUSPENSION .....	40
4.9.	EXTRACCION DE CAPSAICINOIDES .....	40
4.10.	CUANTIFICACION DE CAPSAICINOIDES .....	42
4.11.	EVALUACION DEL CONSUMO DE NUTRIENTES .....	42
4.12.	EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO .....	44
4.13.	VARIACION DE LA CONCENTRACION DE CARBONO Y DE NITROGENO .....	45
4.14.	EFECTO DE LA CONCENTRACION DE FOSFORO .....	47
4.15.	EFECTO DEL pH .....	47
<b>V. RESULTADOS Y DISCUSION</b>		
5.1.	OBTENCION DE MATERIAL VEGETATIVO .....	49
5.2.	INDUCCION DE TEJIDO CALLOSO .....	50
5.3.	CINETICA DE CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE CAPSAICINOIDES EN MEDIO SEMISOLIDO .....	53
5.4.	CINETICA DE CRECIMIENTO, CONSUMO DE NUTRIENTES Y PRODUCCION DE CAPSAICINOIDES EN LOS CULTIVOS EN SUSPENSION	
5.4.1.	CRECIMIENTO CELULAR .....	59
5.4.2.	PRODUCCION DE CAPSAICINOIDES .....	60
5.4.3.	CONSUMO DE FOSFORO .....	63
5.4.4.	CONSUMO DE NITROGENO .....	65
5.4.5.	CONSUMO DE SACAROSA .....	67
5.5.	EFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE CARBONO .....	68
5.6.	VARIACION DE LA CONCENTRACION DE CARBONO Y DE NITROGENO .....	72
5.7.	EFECTO DE LA CONCENTRACION DE FOSFORO .....	80

	Pag.
5.8. EFECTO DEL pH .....	86
5.9. VARIABILIDAD DE LOS CULTIVOS .....	88
VI.- CONCLUSION .....	91
VII.- BIBLIOGRAFIA .....	93

## INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

CUADROS:	Pag.
1.- Estructura química y grado de picor de los capsaicinopides.....	12
2.- Composición de los medios de cultivo de Murashige & Skoog y Schenk & Hildebrandt.....	36
3.- Macronutrientes principales del medio de Murashige & Skoog y sus relaciones más importantes .....	46
4.- Crecimiento de tejido calloso de <u>C. annuum</u> var. <u>glabriusculum/aviculare</u> en dos medio de cultivo ..	52
5.- Variabilidad en cuanto a crecimiento celular y producción de capsaicinoides de los cultivos de chile chigol ( <u>C. annuum</u> var. <u>glabriusculum/aviculare</u> ), durante 8 meses de subcultivos.....	89
FIGURAS:	
1.- Ruta de biosíntesis de capsaicinoides.....	16
2.- Estrategia de selección para la producción de metabolitos secundarios, en cultivo de células vegetales.....	20
3.- Vía de asimilación de nitrato en plantas.....	30
4.- Método de extracción de capsaicinoides, tanto de callo como de agar.....	41
5.- Cinética de crecimiento y producción de capsaicinoides de tejido calloso de chile chigol ( <u>C. annuum</u> var. <u>glabriusculum/aviculare</u> ) en el	

medio MS + $9 \times 10^{-6}$ M de 2,4-D.....	54
6.- Cinética de crecimiento y producción de capsaicinoides de tejido calloso de chile chigol ( <u>C. annuum</u> var. <u>glabriusculum/aviculare</u> ), en el medio MS + $11.4 \times 10^{-9}$ M de AIA y $9.3 \times 10^{-8}$ M de cintina.....	55
7.- Cinética de crecimiento celular, producción de capsaicinoides y consumo de nutrientes, de células en suspensión de chigol ( <u>C. annuum</u> var. <u>glabriusculum/aviculare</u> ), en el medio MSM9.....	61
8.- Efecto de diferentes fuentes de carbono, en el crecimiento y producción de capsaicinoides, en células en suspensión de <u>C. annuum</u> var. <u>glabriusculum/aviculare</u> .....	69
9.- Efecto de la concentración inicial de carbono y nitrógeno del medio MS, sobre el crecimiento de células en suspensión de <u>C. annuum</u> var. <u>glabriusculum/aviculare</u> .....	74
10.- Efecto de la concentración inicial de carbono y nitrógeno del medio MS, sobre la producción de capsaicinoides por células en suspensión de <u>C. annuum</u> var. <u>glabriusculum/aviculare</u> .....	74
11.- Efecto de la concentración inicial de carbono y nitrógeno, sobre el patron de producción de capsaicinoides por células de <u>C. annuum</u> var. <u>glabriusculum/aviculare</u> .....	78
12.- Relación de la máxima productividad de cap-	

capsaicinoides con diferentes relaciones de C/N, variando la conc. de carbono en 0.5 , 1.0 y 1.5 moles y utilizando células en suspensión de <u>C. annum</u> var. <u>glabriusculum/aviculare</u> .....	79
13.- Efecto de la concentración inicial de fósforo del medio MS, sobre el crecimiento de células en suspensión de <u>C. annum</u> var. <u>glabriusculum/aviculare</u> .....	82
14.- Efecto de la variación de la concentración de inicial de fósforo y de nitrógeno del medio de cultivo MS, en la producción de capsaicinoides por células en suspensión de <u>C. annum</u> var. <u>glabriusculum/aviculare</u> .....	84
15.- Efecto de diferentes pH 's iniciales del medio MS en el crecimiento y producción de capsaicinoides en células en suspensión de <u>C. annum</u> var. <u>glabriusculum/aviculare</u> .....	87

## I. R E S U M E N

El Cultivo de Células Vegetales representa una alternativa potencial, para la producción de sustancias destinadas a la industria farmacéutica, alimentaria y agronómica, principalmente metabolitos secundarios. Es precisamente dentro de estos compuestos donde se encuentran los capsaicinoides (caps), que son responsables del sabor picante del chile (Capsicum).

En el presente trabajo, se presentan los resultados obtenidos para la producción de caps, usando una variedad silvestre de chile conocida popularmente como chigol (Capsicum annuum var. glabriusculum/aviculare).

Para germinar las semillas de chigol, se requirió se remojo en agua durante 24 horas. A partir de los hipocotilos de las plántulas obtenidas en condiciones asépticas, se obtuvo la formación de tejido calloso en los medios de Murashige y Skoog (MS), suplementado con la auxina ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y Scenk y Hildebrandt (SH) con los reguladores de crecimiento 2,4-D, ácido p. cloro fenoxiacético (pCPA) y cinetina.

El mejor crecimiento y friabilidad de los callos en el medio semisólido, se obtuvo en el medio MS con 2,4-D a 9  $\mu$ M, presentando un tiempo de duplicación (td) de 11.72 días y una producción de caps de 1.6 mg/g peso seco.

La relación de la producción de caps y el crecimiento de las células de chigol en cultivo en suspensión, presentó una relación compleja, con una producción máxima de caps de 175  $\mu$ g/ l de medio. Al final de la cinética se encontró en los macronutrientes del medio de cultivo el siguiente orden de consumo (de mayor a

menor) : fósforo, carbono y nitrógeno.

Por otro lado, la fuente de carbono con la que se tuvo la mayor producción de caps, fué la sacarosa al 3 % comparada con glucosa y fructosa. Además, se comprobó que la cantidad de nitrógeno en el medio MS, está excedida tanto para la producción de caps, como para el crecimiento de las células. Analizando la relación entre los dos nutrientes anteriores carbono / nitrógeno (C/N) en la producción de caps, se obtuvo que a valores de dicha relación muy cercanos a 0 la producción de caps se favorece, sin embargo más que la relación C/N, el stress por deficiencia de éstos nutrientes en el medio de cultivo puede jugar un papel importante para su producción.

En un intervalo de pH inicial de 4.7 a 6.7 en el medio de cultivo, las células de chigol produjeron la mayor cantidad de caps a pH de 5.7.

Finalmente se propone como medio de cultivo para la producción de caps, el medio MS disminuido en su cantidad de nitrógeno (50 %), carente de carbono y fósforo y con 2,4-D en una concentración de 9  $\mu$ M.

## II. INTRODUCCION

El chile (Capsicum annuum) es un cultivo que fué domesticado en México (Pikersgill, 1969) y al cual la cultura del mexicano se encuentra íntimamente ligado en sus creencias, tradiciones y hábitos alimenticios (Lomeli, 1986 ; Long, 1986; Muñoz y Pinto, 1966). Este cultivo, al igual que otras especies pertenecientes a la familia de las Solanaceas (tomate, papa y berenjena), se han distribuido ampliamente por todo el mundo, formando parte importante en la alimentación de toda la humanidad.

Los frutos del Capsicum han sido difundidos ampliamente en la cocina internacional debido a su sabor picoso, el cual se atribuye a un grupo de metabolitos secundarios denominados capsaicinoides, que son producidos únicamente por éste género (Haga, 1975). En México es aceptado popularmente que los frutos de tamaño pequeño, pertenecientes a la variedad silvestre glabriusculum/aviculare, conocidos como "piquines" son de los más picosos; hecho que ha sido comprobado por diferentes autores (Morales, 1981; Tapía, 1987) al cuantificar por técnicas analíticas el contenido de capsaicinoides de diferentes frutos.

Los capsaicinoides son comercializados como un extracto impuro denominado "oleorresina", muy utilizado en las industrias de alimentos y farmacéutica (Govindarajan, 1987). En la industria alimentaria son usados como condimentos alimenticios, que provocan una mayor aceptación del producto, estimulando la insalivación del bolo alimenticio y además por sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Govindarajan, 1986a). Para la industria farmacéutica representan un mercado potencial, por los

efectos que han mostrado tener como anestésico local y en tratamientos reumáticos (Maga, 1975 ; Monserreeusorn y col., 1982).

El factor limitante para el comercio de la oleorresina del Capsicum, es su alto contenido de aceites provenientes de las semillas, que provocan con el tiempo un enranciamiento en el extracto y una pérdida de capsaicinoides (Long, 1986). Purseglove y col. (1981), en un intento para evitar dicha pérdida, reportó su purificación con extracciones repetidas con etanol frío, sin embargo, con los bajos rendimientos obtenidos los costos económicos no pudieron ser cubiertos.

Por otra parte, los capsaicinoides presentan estructuras complejas que hacen difícil y costosa su síntesis química (Govindarajan, 1986b; Suzuki e Iwai, 1984a).

Una alternativa para la producción de metabolitos secundarios, incluidos dentro de estos a los capsaicinoides es el uso de las técnicas de Cultivo de Tejidos Vegetales (Fowler, 1983; Robert y Loyola, 1985). A nivel industrial el uso del Cultivo de Células Vegetales en suspensión, ha dado resultados satisfactorios para la producción de de la shikonina, compuesto producido por las células de Lithospermum erythrorhizon, que tiene usos como colorante, antibactericida y antiinflamatorio, producido por la compañía japonesa Mitsui Petrochemical (Fujita y col., 1981); además de otros compuestos de interés económico que ya se encuentran a nivel de Planta Piloto (Mantell y Smith, 1983a).

Sin embargo, los rendimientos de producción de metabolitos

secundarios obtenidos por Cultivo de Células Vegetales hasta la década de los 60's, eran demasiado bajos al compararlos con los obtenidos por el cultivo de la planta, por lo cual se han llevado a cabo en los últimos años estudios sobre los posibles factores físicos y químicos que pueden tener un efecto regulatorio en el metabolismo secundario de las células, para así pensar en el desarrollo de nuevos procesos dirigidos a la producción de metabolitos secundarios de interés económico, por las técnicas de Cultivo de Células Vegetales (Rokem y Goldberg, 1985).

Teniendo en cuenta lo anterior en el Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y Estudios Avanzados - México y el Depto. de Fisiología Vegetal de la Unidad Irapuato de la misma Institución, desarrollan un proyecto conjunto sobre el estudio de la producción de Capsaicinoides por células del género Capsicum en cultivo sumergido (Proyecto CONACyT PVT/A1/NAL/85/3155). Dentro del proyecto global anterior, en el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

- a) Obtener material vegetativo aséptico de chile "chigol" perteneciente a la variedad glabriusculum/aviculare.
- b) Obtener tejido calloso de dicha especie en medio semisólido.
- c) Evaluar el comportamiento de crecimiento celular y producción de capsaicinoides del tejido calloso cultivado en el medio semisólido, adicionado con diferentes reguladores de crecimiento vegetal, tendientes a la obtención de cultivos friables.
- d) Caracterizar el comportamiento cinético de los cultivos en

suspensión : crecimiento celular y producción de capsaicinoides , así como el consumo de los macronutriente principales del medio de cultivo.

- e) Estudiar en los cultivos de células en suspensión, el efecto de diferentes fuentes de carbono, sobre el crecimiento y producción de capsaicinoides.
- f) Evaluar la respuesta de crecimiento celular y producción de capsaicinoides, en cultivos de células en suspensión con diferentes concentraciones iniciales, de la fuente de carbono, nitrógeno y fósforo de la composición del medio de cultivo original.
- g) Evaluar en células en suspensión, la respuesta de producción de capsaicinoides a diferente pH inicial del medio de cultivo.

### III. ANTECEDENTES

#### 3.1. EL CHILE Y LA OLEORRESINA

El chile (Capsicum annuum) es un cultivo originario de América, domesticado en México (Pickersgill, 1969; Purseglove y col., 1981). El género Capsicum comprende cinco especies que son: C. annuum, C. baccatum, C. chinense, C. frutescens y C. pubescens, las cuales presentan un mosaico de formas, tamaños y colores (Pickersgill, 1969).

En los trabajos de revisión sobre el chile efectuados por Long en 1986 y Lomeli en el mismo año, se discute ampliamente el hecho de que estos frutos forman parte importante de la cultura del mexicano, encontrándose relacionados con sus creencias, tradiciones e íntimamente ligados a su dieta alimenticia.

Los frutos del chile son comercializados internacionalmente como frutos completos o en polvo, ambas formas son usadas en todo el mundo como una especie picante para propósitos domésticos culinarios (Purseglove y col., 1981).

El grado de picor de los frutos del chile varía de una especie a otra, pero en México es generalmente aceptado que los frutos de menor tamaño son los más picosos. Al respecto Morales (1981), determinó el grado de pungencia de distintos frutos adquiridos en mercados mexicanos y encontró que los frutos silvestres pertenecientes a Capsicum annuum var. glabriusculum/aviculare eran los más picosos; estos chiles son conocidos popularmente como piquines (nombrados así por su tamaño minúsculo), aunque dependiendo de la región geográfica del

país reciben otros apelativos como : chile parado, chile mira para arriba, chile chiltepe, chiltepillo, chilpaya, chile de monte, chigol y otros (Long, 1986).

Purseglove y col. (1981), afirman que Capsicum annuum var. glabriusculum/aviculare es probablemente el progenitor silvestre de los cultivos de C.annuum var.annuum, con el cual se puede cruzar fácilmente, en la actualidad la variedad glabriusculum/aviculare se encuentra extendida desde el sureste de EU, a través de México y Centro América, hasta el noroeste de América del sur.

La industria alimentaria suele usar los frutos del Capsicum completos en la elaboración de salsas o chiles en conserva, sin embargo para el sazónamiento de alimentos procesados como jamón, salchichas y otros, resulta ventajoso el uso del extracto aceitoso del fruto conocido como "oleorresina" (Govindarajan, 1987).

Desde el punto de vista tecnológico la calidad de la oleorresina se mide en base a su color, olor y picor (Govindarajan, 1987). Con respecto al color, Maga (1975) cita que los pigmentos principales asociados con la coloración del chile rojo son : capsantina, capsorutina,  $\beta$ -carotenos, violaxantina y criptoxantina. En tanto que el olor de la oleorresina ha sido atribuido a una larga lista de compuestos que incluyen alcoholes, ácidos carboxílicos, ésteres, pirazinas y terpenos; sin embargo, en las evaluaciones de control, se da mayor atención al compuesto 2-metoxi-3-isobutil pirazina (Govindarajan, 1986a; 1987).

La mayor importancia de la oleorresina es atribuida al picor que ésta presenta, debida a la presencia de una mezcla de amidas

ácidas de vainillilamina unidas a cadenas laterales de ácidos grasos, de 9 a 11 átomos de carbono denominados Capsaicinoides (Suzuki e Iwai, 1984a). La calidad de la oleorresina depende de algunos factores claves como son : el estado óptimo de madurez de los frutos, el tratamiento adecuado al secarlos, triturarlos y el disolvente usado para su extracción (Purseglove y col., 1981).

La oleorresina del Capsicum obtenida del fruto, presenta el problema que con el transcurso del tiempo sufre un enranciamiento, debido a la presencia de aceites, procedentes principalmente de las semillas (Long, 1986). Como consecuencia de lo anterior se ha intentado la purificación de los Capsaicinoides, sin embargo el hacerlo, origina que disminuya el rendimiento del proceso y que los costos de producción se eleven (Purseglove y col., 1981).

Por otra parte, la producción de los capsaicinoides por síntesis química es un proceso muy costoso e involucra un gran número de pasos, obteniendo en el producto final una mezcla de isómeros con propiedades de picor diferentes a las de los capsaicinoides (Govindarajan, 1986a; Suzuki e Iwai, 1984a).

Es importante para la industria de alimentos contar con una mayor disponibilidad de capsaicinoides, ya que estos compuestos presentan algunas ventajas sobre otros aditivos alimenticios, por su estabilidad en el picor y por sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas sobre Bacillus cereus y B. subtilis (Govindarajan, 1987). Por otro lado desde el punto de vista farmacológico el potencial de los capsaicinoides es amplio, ya que tiene efectos variables sobre los sistemas respiratorio y

cardiovascular cuando son proporcionados oralmente o intravenosamente. Estos compuestos han mostrado poder servir como analgésicos locales, siendo esta actividad farmacológica atribuida a su efecto sobre neurotransmisores como la substancia P y otros neuropéptidos (Leeman y Rainer, 1981; Monserrenusorn y col., 1982; Virus y Gebhart, 1979).

### 3.2. LOS CAPSAICINOIDES

Thresh en 1846 fué el primero en cristalizar y nombrar capsaicina al compuesto responsable del sabor picoso de los frutos del Capsicum, pero fué hasta 1923 cuando Nelson y Dawson determinaron su fórmula química como ác. 8-metil-6 nonoico de vainillilamina (Govindarajan, 1985).

En la actualidad gracias al desarrollo de técnicas analíticas como la cromatografía de capa fina, cromatografía de gases y cromatografía líquida de alta resolución se ha podido descubrir que además de la capsaicina, en los frutos existen otros compuestos análogos con sabor picante, los cuales en conjunto son denominados capsaicinoides (Lego, 1984; Suzuki e Iwai, 1984a; Tood y col., 1975).

Lego (1984) y Suzuki y col. (1981a) reconocen cinco capsaicinoides como los de mayor picor: la Capsaicina (Cap), Dihidrocapsaicina (DHC), Nordihidrocapsaicina (NDC), Homocapsaicina (HC), Momodihidrocapsaicina (HDC) y la Norcapsaicina (NC). De las anteriores la Cap y la DHC, son las que predominan en los frutos (90 % del total de capsaicinoides), manteniendo una proporción 2:1 o 1:1 y dando mayor pungencia a

los frutos (Cuadro 1).

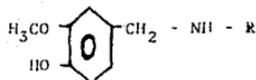
La biosíntesis de capsaicinoides en relación a la madurez del fruto ha sido estudiada por Balbaa y col. (1968), Suzuki y col. (1980) e Iwai y col. (1979), quienes observaron un incremento gradual en los niveles de capsaicinoides con la madurez del fruto.

En la investigación de chiles de Egipto hecha por Balbaa y col. (1968), la pungencia no fué detectada hasta que los frutos iniciaron su cambio de coloración, desde verde a verde-amarillo cuatro semanas después de la floración, en sus plantas cultivadas en verano y cinco semanas en sus plantas de otoño. Además comprobaron que el picor de los frutos cultivados en verano fué mayor al de los frutos de otoño.

Iwai y col. (1979) y Suzuki y col. (1981) observaron en frutos de C. annum cv. Karayatsubusa el máximo contenido de capsaicinoides (8.8 mg/fruto) a las cinco semanas después de la floración, punto que coincidió con el máximo de peso fresco y contenido de clorofila, posteriormente los tres parámetros anteriormente mencionados disminuyeron, mientras que se incrementó el contenido de carotenoides.

Factores ambientales como la temperatura y la luz influyen en la formación de capsaicinoides en los frutos. Por ejemplo: en cultivos de Capsicum se ha demostrado que a temperaturas menores a 20 °C disminuyeron la floración y el contenido de capsaicinoides, por el contrario, con temperaturas mayores se vió que la síntesis y acumulación de capsaicinoides se incrementó (Suzuki e Iwai, 1984a).

Iwai y sus colaboradores a lo largo de sus estudios sobre la



GRUPO R	NOMBRE	PICOR EN UNIDADES ORGANOLEPTICAS SCOVILLE	
		Todd y col. (1977)	MILLONES ml/g Jerenitch (1981)
	CAPSAICINA	16.1 ± 0.6	17.0
	DIHIDROCAPSAICINA	16.1 ± 0.6	10.8
	NORDIHIDROCAPSAICINA	9.3 ± 0.4	9.6
	HOMOCAPSAICINA	6.9 ± 0.5	---
	HOMODIHIDROCAPSAICINA	8.1 ± 0.7	8.3

Cuadro 1. Estructura química y grado de picor de los capsaicinoides.

(Adaptado de Govindarajan, 1987).

formación de capsaicinoides en los frutos del Chile, obtuvieron datos que demostraron que la luz es un factor importante para la formación de capsaicinoides. Iwai y col. (1977a), observaron que bajo condiciones de luz continua la biosíntesis de los capsaicinoides, en la placenta de frutos de C. annuum var. grossum se inició de 4 a 7 días después de la cosecha, sin embargo, ningún capsaicinoide se detectó en frutos incubados en oscuridad. Resultados similares fueron obtenidos por Iwai y col. (1977b) al incubar frutos inmaduros de ésta misma variedad carentes de pedúnculo, en presencia de vainillin-amina y ác. isocáprico (precursores de la ruta de biosíntesis de los capsaicinoides), bajo condiciones de luz y de oscuridad a 30 °C de temperatura.

Suzuki e Iwai (1984a), en su trabajo de revisión del Capsicum, citan el trabajo de Bubiez, quien demostró que la cantidad de macronutrientes (130 kg/ha de potasio, 50 kg/ha de nitrógeno y 22 kg/ha de fósforo), adicionados a los cultivos de Capsicum annuum, juegan un papel decisivo para la obtención de frutos con alto contenido de capsaicinoides. Por otro lado, Nowak en cultivos hidropónicos de plantas de C. annuum mostró que la producción de frutos y acumulación de capsaicinoides fue afectada considerablemente por la proporción de algunos micronutrientes tales como el cobre, boro y molibdeno.

Por lo que respecta al lugar de formación de capsaicinoides en el fruto, Iwai y col (1977a) observaron por microscopía electrónica, que las células epidérmicas de la placenta es el lugar donde se sintetizan y acumulan estos metabolitos. Posteriormente Suzuki y col. (1980), localizaron a nivel celular

pequeñas vesículas similares a las vacuolas, como estructuras de mayor acumulación. Recientemente Zamski y col. en 1987 ratificaron lo observado por los investigadores anteriores, sobre el lugar de su formación y además muestran que los capsaicinoides son sintetizados en el compartimento interno del retículo endoplásmico; y sugieren que las pequeñas vesículas que contiene a los capsaicinoides, son derivadas de pequeños fragmentos del retículo endoplásmico que migran a través de citoplasma y se fusionan con el plasmalema, el cual debe jugar un papel importante en la excreción de los capsaicinoides a la zona subcuticular del tejido epidérmico, donde son acumulados.

Investigaciones de la ruta biosintética de la capsaicina y sus análogos fue contemporaneamente iniciada por los científicos británicos Bennett y Kirby (1968) y por los científicos americanos Leete y Louden (1968) en frutos de C. annuum, aplicando técnicas de marcaje con radioisotopos y estableciendo como precursor de la parte aromática de los capsaicinoides a la L-fenilalanina y de la cadena acil-grasa a la L-valina.

Posteriormente un grupo de investigadores japoneses: Iwai y col. (1977a,b; 1978; 1979), Suzuki y col. (1980; 1981a,b) y Fujiwake y col.(1980; 1982a,b), usando en sus estudios una especie de chile con gran capacidad para la biosíntesis de capsaicinoides, C. annuum var. annuum cv. Karayatsubusa estudiaron la ruta de biosíntesis de capsaicinoides, proponiendo finalmente la vía que se muestra en la figura 1. En sus estudios, dichos investigadores comprobaron lo propuesto por Bennett y Kirby (1968), de que el precursor del anillo de

vainillilamina de la capsaicina es la L-fenilalanina, en tanto que para las cadenas acil-grasas laterales, la L-valina condujo a la formación de Cap y DHC, mientras que la L-leucina llevó a la formación de NDC y HDC.

Sin embargo, es importante aclarar, que la ruta de biosíntesis de capsaicinoides propuesta para fruto (figura 1), no es conocida en su totalidad, ya que el paso entre el ácido ferúlico a la vainillilamina no se ha detallado, se desconocen el número de pasos que involucra, así como las enzimas que en ella intervienen. Por lo tanto el mecanismo total de la biosíntesis de los capsaicinoides no está completamente aclarado (Suzuki e Iwai, 1984a).

Como puede verse en la figura 1, la biosíntesis de los capsaicinoides involucra diferentes intermediarios que pueden ser metabolizados a la formación de otros productos del metabolismo primario o secundario de la células. Además al tratarse de células eucarióticas, la distribución de las enzimas está confinada en diferentes organelos, lo cual plantea algunos problemas de transporte en su ruta biosintética (Luckner, 1980).

Así la actividad de la trans-ácido cinámico 4-monooxigenasa, que cataliza la reacción de ác. cinámico a ác. cumárico y la capsaicinoide-sintetasa la cual cataliza la reacción de condensación de vainillil-amina y las cadenas acil-grasas fueron encontradas en la vacuola (tonoplasto), en tanto la actividad de la fenil alanina-amonioliasa que cataliza la conversión de fenilalanina a ácido cinámico fue encontrada en el citosol (Fujiwake y col., 1982b).



Considerando la localización intracelular de las enzimas y productos intermedios de la biosíntesis de los capsaicinoides, Suzuki e Iwai (1984), establecieron que los capsaicinoides son sintetizados de vainillilamina y diversos ácidos grasos en la forma de acil CoAs, que son unidos a través de la enzima capsaicinoide-sintetasa cerca del tonoplasto y se depositan en pequeñas vesículas que son excretadas fuera de la célula y acumuladas en un receptáculo como una mezcla de capsaicinoides-lípidos.

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

Las plantas contienen una gran cantidad de sustancias químicas que han sido utilizadas por el hombre durante siglos como fármacos, aditivos alimenticios, fragancias, etc. Sin embargo, la disminución de los recursos vegetales por talas inmoderadas en todo el mundo (erosión génica), pérdida de cosechas por adversidades climáticas y plagas, así como en el aumento en los costos de fertilizantes, han traído problemas para la obtención de productos naturales, especialmente metabolitos secundarios a partir de las plantas (Baladrín y col., 1985; Shuler, 1981).

Los adelantos tenidos en los últimos años en la técnica de Cultivo de Células Vegetales, permiten vislumbrarla como una alternativa para la producción de compuestos químicos, especialmente aquellos clasificados como de bajo volumen de comercialización y alto precio, tales como los metabolitos secundarios (Scragg, 1986). Quintero (1985) afirma que el uso de esta técnica en el desarrollo biotecnológico de México, podrá generar beneficios a corto y largo plazo.

Fowler (1983) reconoce que las ventajas que ofrece el Cultivo de Células Vegetales, para la producción de metabolitos secundarios de interés industrial son:

- a) Una independencia de las condiciones ambientales como clima, plagas, contrastes estacionales, etc.
- b) Un sistema de producción definido, en el lugar donde se requerirá producto.

- c) Una mayor consistencia en la producción tanto en cantidad, como en calidad.
- d) Y quizá el más importante, menores tiempos de producción.

Quando se desea alguna sustancia química, sintetizada en una especie vegetal determinada y se tienen problemas para su obtención a partir de plantas naturales, o se quieran destinar extensiones de terreno para el cultivo de otros productos de primera necesidad, se puede recurrir a los estudios para su producción por otros medios, como puede ser el Cultivo de Células Vegetales (Stafford y col., 1986), que puedan conllevar al desarrollo de un proceso biotecnológico, como es el caso de la producción del agente bactericida, antiinflamatorio y colorante shikonina a partir de células de Lithospermum erythrorhizon a nivel industrial, producido por la compañía japonesa Mitsui Petrochemical (Fujita y col., 1981).

Algunos autores proponen estrategias a seguir para tales fines, una de ellas es la esquematizada en la figura 2. Primeramente hay que aprovechar la variabilidad genética que se presenta en la naturaleza, seleccionando aquellas plantas que presentan una mayor producción del metabolito deseado, ya que dicha característica genética puede ser mantenida en los cultivos in vitro, como lo demostraron los trabajos realizados con Nicotiana tabacum (Zenk y col., 1977) y Cataranthus roseus (Kinnersley y Dougall, 1981).

Posteriormente, para iniciar el cultivo in vitro se puede partir de cualquier segmento de planta; ya sea crecida en campo o cortándolo de pequeñas plántulas obtenidas por la germinación de

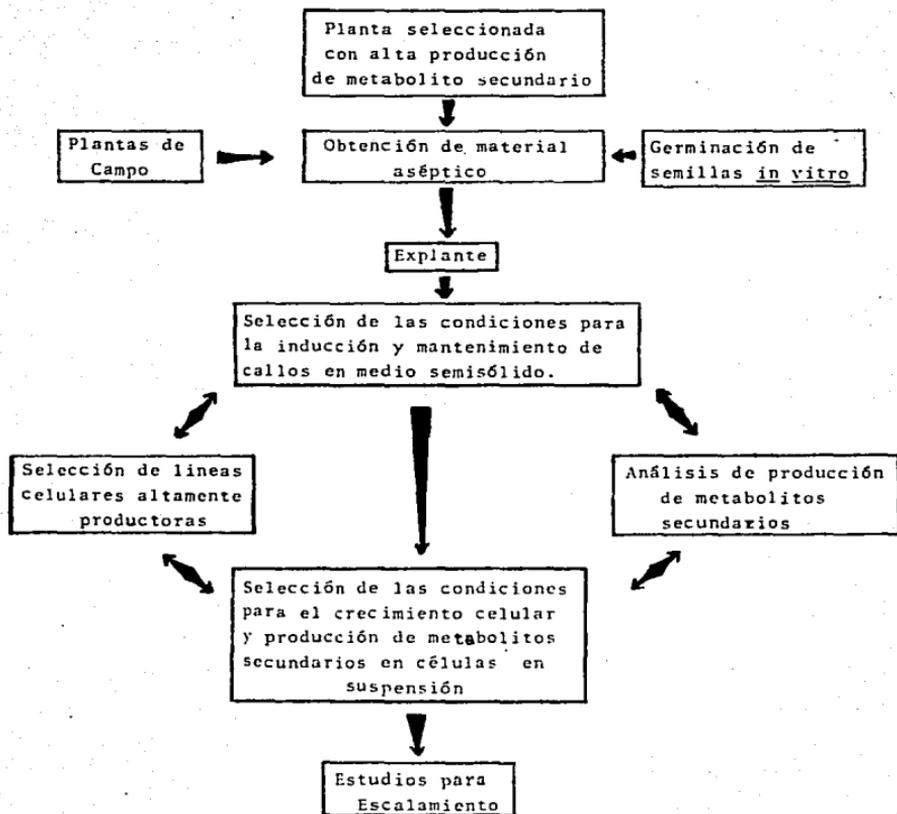


Figura 2. Estrategia de selección para la producción de metabolitos secundarios en cultivos de células vegetales. Adaptado de Stafford y col., 1986.

sus semillas bajo condiciones asépticas en el laboratorio, siendo éste último preferible por presentar menor grado de diferenciación, mayor homogenidad celular y una fuente aséptica (Yeoman y Macleod, 1977).

Para poder llegar al Cultivo de Células Vegetales en Suspensión hay que pasar por callos, que se obtienen después de desdiferenciar a los tejidos usados como explantes, al ser llevados éstos a medios de cultivo que contienen en general los siguientes compuestos; a) macronutrientes, b) micronutrientes, c) fuente de carbono, d) fuente de fierro, e) vitaminas, f) reguladores de crecimiento vegetal y en caso de ser un medio de cultivo semisólido se adiciona un agente gelificante (Fossard, 1976; Yeoman y Macleod, 1977).

Mantell y Smith (1983a), asumen que tomar un tejido en donde el metabolito secundario no se esté sintetizando o acumulando, no influye en su capacidad de producción de las células in vitro. Al respecto Yeoman y col. en 1980, observaron que la producción de capsaicinoides por tejido calloso de C. frutescens, no presentó diferencia alguna al inducir los callos de segmentos de frutos (lugar de síntesis y acumulación), tallos, hojas o raíces.

Para inducir la formación de tejido calloso son importantes los reguladores de crecimiento vegetal, que se agrupan en auxinas, citocininas y giberelinas, siendo importante la relación de las dos primeras en los procesos de diferenciación (embriogénesis y organogénesis) y en los de desdiferenciación (Rennert, 1977).

Strett (1977), establece que si se parte de callos disgregables, se facilita la obtención de cultivos de células en

suspensión más homogéneos. Al respecto Mavituna y col. (1987), desarrollaron un método para producir rápidamente cultivos en suspensión, por homogenización de callos de Capsicum frutescens (13 000 rpm/3 min) en condiciones asépticas, con éste método las células bajaron su viabilidad a un 40 %, sin embargo, el cultivo se recuperó en 15 días a 98% de viabilidad. Además el método ha sido usado para reducir el tamaño de los agregados celulares en suspensión.

El Cultivo de Células en Suspensión representa muchas ventajas sobre el cultivo de células en medio semisólido, ya que al tener agregados celulares pequeños inmersos en una matriz acuosa en movimiento, se facilita el intercambio gaseoso, se eliminan los gradientes de polarización en el tejido y se homogeniza la distribución de nutrientes (Yeoman y Macleod, 1977).

Cuando se tienen los cultivos en suspensión, es posible mejorar su producción de metabolitos secundarios por diversas técnicas; como la selección de líneas celulares, la manipulación de los nutrientes del medio, la adición de precursores y por la inmovilización de las células, cuyo objetivo en común es llevar a las células a expresar su información génica de biosíntesis, de su metabolismo secundario.

### 3.3.1 SELECCION DE LINEAS CELULARES

Un problema importante a considerar en el cultivo de células es que el proceso de iniciación del cultivo involucra la desdiferenciación de células organizadas, por la adición de

reguladores de crecimiento vegetal, y que posteriormente son inducidas a crecer, por lo tanto, la probabilidad de que existan alteraciones a nivel cromosómico durante la mitosis se incrementa. Estas alteraciones pueden ser a nivel de número cromosómico: poliploidias y anuploidias o a nivel intercromosómico: deleciones, inversiones y translocaciones (De-Amato, 1978; Sunderland, 1977).

La aplicación industrial del Cultivo de Células Vegetales para la producción de metabolitos secundarios, requiere el uso de líneas celulares que tengan estabilidad a lo largo del tiempo (Fowler, 1983; Tabata y col., 1978). Sin embargo, un gran número de especies vegetales muestran una gran variabilidad e inestabilidad. Holden y col. (1986) encontraron en las células de C. frutescens una gran variabilidad extraclonal e interclonal en sus características fenotípicas, índice de crecimiento y producción de capsaicinoides, que se fueron manifestando a través de los subcultivos. Así mismo las células de Catharanthus roseus, mostraron a lo largo de dos años, variabilidad en su producción de ajmalicina y serpentina (Morris, 1986a).

Por lo anterior, es importante la obtención de líneas celulares que presenten mayor acumulación y estabilidad de producción de metabolitos secundarios de interés, como se ha hecho para la producción de ajmalicina en células de Catharanthus roseus (Zenk y col., 1977), de nicotina por Nicotiana tabacum (Ogino y col., 1978) y de snikonina por Lithospermum erythrorhizon (Fujita y col., 1984).

La selección de líneas celulares que producen metabolitos secundarios coloridos, facilitan la selección de las mismas, como

es el caso de Lithospermum erythrorhizon (Fujita y col., 1984). Sin embargo, cuando los metabolitos son producidos en pequeñas cantidades y los métodos de cuantificación son largos y tardados, se puede recurrir al desarrollo de técnicas inmunológicas que faciliten analizar un gran número de muestras, en un intervalo de tiempo relativamente pequeño con gran seguridad, como la desarrollada por Aitken y Yeoman (1986), para la selección de líneas productoras de capsaicinoides en cultivos de C. frutescens.

### 3.3.2. MANIPULACION DE LOS NUTRIENTES DEL MEDIO DE CULTIVO

Muchos medios nutritivos se han desarrollado para el crecimiento de diferentes especies vegetales en cultivo en suspensión, sin embargo, en su mayoría los niveles de producción de metabolitos secundarios reportados, son bajos con respecto a los obtenidos de su fuente tradicional (Fowler, 1983). Debido a lo anterior, se ha recurrido a la manipulación de los componentes del medio, tratando de incrementar la síntesis del metabolito deseado. Los componentes que mayormente han sido estudiados son:

#### 3.3.2.1: REGULADORES DE CRECIMIENTO VEGETAL.

Con la excepción de los cultivos oncogénicos, los cultivos celulares requieren la adición de reguladores de crecimiento vegetal, auxinas y citocininas al medio de cultivo para poder crecer. Sin embargo, el uso de estos compuestos en algunos casos puede llegar a afectar la actividad de enzimas importantes en la

biosíntesis de metabolitos secundarios, como la fenil alanina-amonioliasa, enzima clave en el inicio de biosíntesis secundaria (Hugh, 1984; Innerarity y col., 1972; Ozeki y Komamine, 1985), es por ello que sus efectos en la producción de estos metabolitos ha recibido gran atención.

Morris y col. (1985) y Stafford y col. (1986) suponen que las bajas producciones de algunos metabolitos secundarios reportadas hasta antes de 1970, se debió a la incorporación de la auxina 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) al medio de cultivo. Al respecto Zenk y col. (1977), probando diferentes reguladores de crecimiento en cultivos en suspensión de Catharanthus roseus, encontraron que el 2,4-D y el ácido Naftalenacético (ANA) suprimieron la formación de serpentina, en tanto que el ácido Indolil-3-acético (AIA), la favoreció.

Nueve años después Morris (1986b), hizo un estudio con mayor detalle de los efectos del 2,4-D en la misma especie y corroboró lo encontrado por Zenk y col. (1977) para esta auxina, sin embargo, cuando adicionó cinetina y ANA, logró incrementar la producción de alcaloides, demostrando de esta manera la importancia del balance de auxinas y citocininas en la producción de metabolitos secundarios.

Por otro lado, en cultivos en suspensión de Cinchona ledgeriana, al hacer una reducción de la concentración de reguladores de crecimiento (de 2.0 a 0.5 mg/l 2,4-D y de 0.5 a 0.1 mg/l de bencil adenina), se logró incrementar 400 veces la producción de alcaloides (Robins y col., 1986).

Aunque en la mayoría de los casos se ha encontrado que el

2,4-D juega un papel represivo en la producción de metabolitos secundarios, existen algunos trabajos en los que el 2,4-D ha permitido una mayor expresión del metabolismo secundario, como lo es la producción de antraquinonas en cultivos de Morinda citrifolia (Zenk y col. 1975) y en la producción de saponinas por tejido calloso de Panax ginseng (Furuya y col., 1983), que produjeron niveles similares a los encontrados en la planta.

El suprimir el uso de reguladores de crecimiento del medio, también ha dado buenos resultados para incrementar la producción, ya que permite que se frene el crecimiento y el metabolismo primario, para que se incremente el metabolismo secundario en medios considerados de producción, como por ejemplo, en el cultivo de células inmovilizadas de Capsicum frutescens, después de eliminar las hormonas (auxinas y citocininas), la producción de capsaicina se incrementó al doble (Lindsney, 1985). El problema en estos casos es la pérdida de viabilidad con los subcultivos subsecuentes en ausencia de auxinas, como fué demostrado en células de Catharanthus roseus (Morris, 1986b) y Anchusa officinalis (De-Ekmankul y Ellis, 1985b), en ambos casos las células no fueron capaces de crecer para el tercer subcultivo.

### 3.3.2.2. FUENTE DE CARBONO

Como la mayoría de los cultivos vegetales son heterotróficos, requieren la adición de carbohidratos que les sirvan para la síntesis de constituyentes celulares, importantes para su mantenimiento y crecimiento celular.

Para tales fines han sido probadas una gran variedad de

carbohidratos , entre los cuales podemos mencionar a la glucosa, galactosa, fructosa, sacarosa, sorbitol y otros, aunque muchas especies pueden crecer en una amplia variedad de ellos, los mejores resultados en cuanto a crecimiento celular y producción de metabolitos secundarios se han obtenido con sacarosa , glucosa y la fructosa (Fowler , 1982a; Fowler y col., 1982a; Fowler y Stepan-Sarkissian, 1985).

Los resultados anteriores no son de extrañar ya que dentro de la bioquímica y fisiología de los vegetales, la sacarosa , glucosa y fructosa desempeñan papeles muy importantes; como el hecho de que la sacarosa, sacárido formado por glucosa y fructosa, es la principal forma de transporte de carbohidratos en la planta, en tanto que la glucosa y la fructosa juegan un papel importante en la glucólisis (Maretzki y col., 1974).

Los mecanismos de asimilación de la sacarosa y de la glucosa se encuentran aún en estudio, sin embargo, los modelos postulados de asimilación para la glucosa pueden resumirse como sigue: a) la glucosa entra a la célula por transporte pasivo y posteriormente en el citosol sufre una fosforilación, pasando a una forma más activa como glucosa-6-fosfato (G6P), b) la glucosa entra a la célula por un transporte activo y durante éste, por la acción de una hexocinasa, es transformada en G6P (Fowler y Stepan-Sarkissian, 1985).

Por otro lado, los mecanismos de asimilación de la sacarosa por la célula resultan más complejos y éstos pueden ser divididos en hidrolíticos y no hidrolíticos. Dentro de los primeros se considera la existencia de la enzima invertasa extracelular

responsable de la ruptura de la sacarosa en sus monómeros, en tanto los no hidrolíticos, establecen un transporte íntegro de la sacarosa al interior de la célula (Fowler y Sarkissian, 1985). Además de que no son conocidos con claridad, los mecanismos de asimilación de los carbohidratos anteriores por las células vegetales, sus relaciones con la producción de metabolitos secundarios es todavía más compleja.

En sistemas de cultivos de células vegetales in vitro, en donde los medios de cultivo están generalmente excedidos en las cantidades de sus nutrientes, un aumento de la concentración de carbohidratos suele dar un incremento en la producción de biomasa, sin embargo como ha sido discutido por Lindsey y Yeoman (1983c), la tasa de crecimiento celular no siempre va a la par con la producción de metabolitos secundarios, ya que para que se manifieste esta última debe existir cierto grado de diferenciación en las células (Wiermann, 1981). Por ejemplo Kubek y Shuler (1980), encontraron que la adición de 8 % de sacarosa en cultivos de Rosa sp., incrementó la producción de biomasa, mientras la producción de fenoles se vio disminuida, con esta misma concentración de sacarosa (8 %) se provocó en callos de Solanum laciniatum un efecto inhibitorio en el crecimiento, pero coincidió con la máxima producción de fenoles (Chandler y Dodds, 1983).

Así mismo, existen otros trabajos en los que al haber incrementado la concentración de carbohidratos se observó una mayor producción de metabolitos secundarios (Merillon y col., 1984; Smith y col., 1987; Suzuki y col., 1984b), explicándose este como respuesta de la célula a condiciones de stress osmótico

que dispara el metabolismo secundario.

### 3.3.2.3. FUENTE DE NITROGENO

Fowler y col. (1982b) han encontrado que la mayoría de las formulaciones de los medios de cultivo comunmente usados para el crecimiento de células vegetales, utilizan como principales fuentes de nitrógeno al nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y al amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), aunque las concentraciones relativas, varían en sus efectos sobre el cultivo: tasa de crecimiento celular y producción de metabolitos secundarios.

Para las células vegetales se ha establecido como mecanismo de asimilación de nitrógeno el esquematizado en la figura 3. Como observa este proceso involucra 4 reacciones generales, que son: a) asimilación de nitrato por parte de la célula, b) reducción de nitrato a nitrito, c) reducción de nitrito a amonio y conversión de amonio a nitrógeno orgánico.

La relación  $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$  ha mostrado tener efectos significativos en la producción de metabolitos secundarios, como en la producción de antraquinonas por células de Rubia cordifolia, en donde con una relación 1:1 se observó una producción cien veces más alta con respecto al cultivo original (Suzuki y col., 1984b), resultados similares fueron observados por Yamakawa y col. (1983), en cultivos de células de Vitis para la producción de antocianinas.

En algunos casos los cultivos celulares tienen preferencia por otras fuentes de nitrógeno para la mayor producción de metabolitos secundarios, como lo observaron Knobloch y Berlin

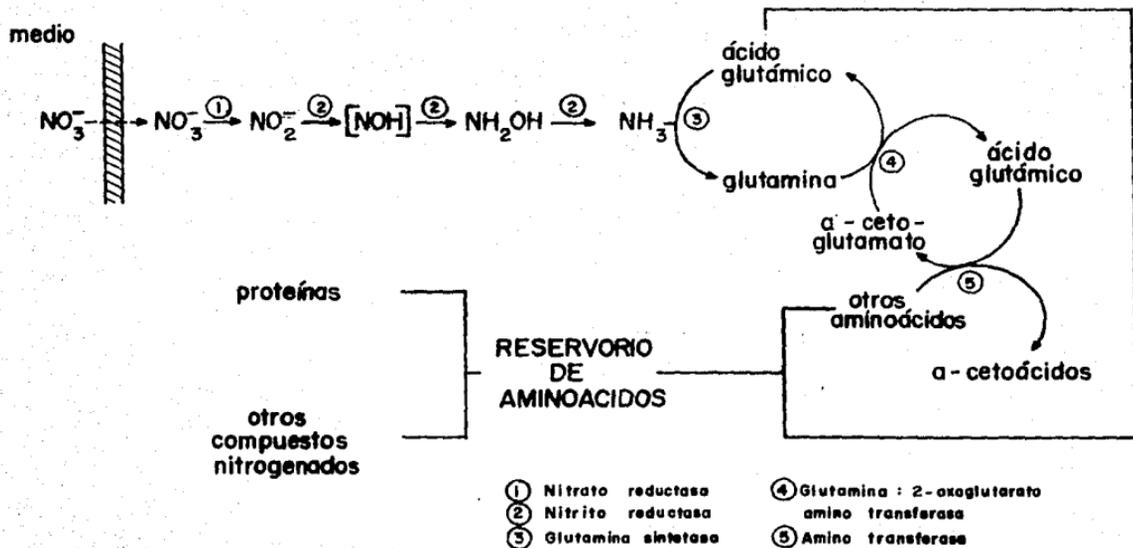


Fig. 3 Vía de asimilación de nitrato en plantas.  
 Adaptado de Goodwin y Mercer, 1983.

(1981), en la producción de polifenoles por células de Nicotiana tabacum, donde de diferentes fuentes probadas : nitrato de amonio + nitrato de potasio, nitrato de potasio, cloruro de amonio, nitrato de amonio y citrato de amonio, encontraron que el citrato de amonio favoreció tanto el crecimiento celular, como la producción de polifenoles. Sin embargo, algunos cultivos suelen preferir para su crecimiento fuentes de nitrógeno orgánicas, como lo son los aminoácidos (Thom y col., 1981).

El nitrógeno en bajas concentraciones puede ser usado como un nutriente limitante de crecimiento celular y por tanto servir como mecanismo que pueda dar inicio a las rutas metabólicas secundarias, incrementando la producción de algunos productos de interés. Como se observó en la producción de shikonina, donde una vez que las auxinas y el nitrógeno fueron consumidos completamente, se detuvo la incorporación de fenilalanina (precursor de shikonina) a proteínas y se inició su incorporación a shikonina (Mizukami y col., 1977).

Los medios usados para el crecimiento de las células vegetales generalmente están excedidos de nitrógeno, por lo tanto cuando éste se reduce, las producciones de metabolitos secundarios se incrementan, como lo muestran los trabajos de Chandler y Dodds (1983) para la producción de fenoles y el De-Ekmankul y Ellis (1985a) con células de Anchusa officinalis en la producción de ácido rosmarínico.

Así mismo Lindsey (1985), demostró para el cultivo de Capsicum frutescens que el incremento de la concentración inicial de nitrato del medio de cultivo está directamente relacionado con

el crecimiento celular y la incorporación de fenilalanina en protefnas solubles, pero inversamente relacionado con su incorporación en capsaicina. La posible explicación que aducen los autores, es que el nitrógeno esta regulando la actividad de algunas enzimas claves, tal como la fenil alanina amonio liasa, de manera similar a como ocurre en en la biosíntesis de otros metabolitos secundarios (Hahlbrock y col., 1974; Wescott y Henshaw., 1976).

#### 3.3.2.4. RELACION CARBONO/ NITROGENO

La alteración de la relación carbono/nitrógeno (C/N), es un ajuste clásico en la fisiología de los microorganismos para aumentar su crecimiento y producción de muchos metabolitos.

Existen evidencias de que un ajuste similar puede incrementar la producción de muchos metabolitos secundarios por células vegetales en suspensión, como lo demuestran los trabajos de Kubek y Shuler (1980), quienes examinaron la relación C/N en la producción de compuestos fenólicos por células de Rosa sp y Glicine max, observando las máximas producciones con relaciones C/N de 20 (mg/mg) y 85 (mg/mg) respectivamente. Por otra parte Yamakawa y col. (1983) observaron que con relaciones C/N 2.4 - 4.8 (mol/mol) la producción de antocianinas fué mayor a la del medio original.

En contra parte a lo anterior, diversos autores (Dicosmo y Towers, 1984; Stafford y col., 1986) expresan que para la producción de metabolitos secundarios por Cultivo de Células Vegetales, no es tan importante la relación C/N, como las condiciones de stress a que se sometan los cultivos.

especialmente por la presión osmótica del medio de cultivo con altas concentraciones de sacarosa y cuando se cambia el nutriente limitante; usando bajas concentraciones de carbono y altas concentraciones de nitrógeno, como se observó en los cultivos de Cinchona ledgeriana, para la producción de alcaloides (Winjnsma y col., 1986)

### 3.3.2.5. FUENTE DE FOSFORO

Como la fuente de carbono y nitrógeno, los altos niveles de fosfato en el medio de cultivo, permiten estimular la tasa de crecimiento celular, por tanto una disminución del fosfato generalmente hace disminuir la tasa de crecimiento celular e incrementar la producción de metabolitos secundarios (Mantell y Smith, 1983a).

En algunos sistemas el fósforo puede ser usado como nutriente limitante para el crecimiento celular, ya que éste es el primer nutriente que se consume, generalmente entre 24 a 48 horas después de ser inoculadas las células (De-Ekmankul y Ellis, 1984; Knobloch y Berlin, 1983). Sin embargo, éste es almacenado intracelularmente como fué comprobado en células de Thalictrum rugosum (Berlin y Molleschott, 1988).

Chandler y Dodds (1983), disminuyendo 80 % el fosfato del medio MS, lograron incrementar al doble la producción de compuestos fenólicos en cultivos de Solanum laciniatum, en tanto Yamakawa y col. (1983), observó como la producción de antocianinas presentó una relación inversa con el incremento de la concentración inicial de fosfato del medio.

Una posible explicación que puede darse al hecho de que la disminución de fosfatos en el medio de cultivo estimule la producción de metabolitos secundarios, es la relación que éste tiene con la actividad de algunas enzimas claves en el metabolismo secundario, como la fenil alanina amonio-liasa (enzima clave en el metabolismo de fenil propanoides). Knobloch y Berlin (1981, 1983), observaron que la actividad de la fenil alanin amonio-liasa esta regulada por la presencia de fosfato, ya que su actividad disminuyó conforme se incrementó la concentración de fosfato inicial del medio de cultivo.

#### IV. MATERIALES Y METODOS

##### 4.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron chiles silvestres de Capsicum annuum var. glabriusculum/aviculare que se recolectaron en el estado de Oaxaca y fueron proporcionados por la SARH-Oaxaca. Estos chiles reciben localmente el nombre de chile "chigol".

El lote de frutos silvestres de chile chigol que se utilizó para éste estudio se caracterizó por la presencia de frutos verdes en su mayoría, con un tamaño aproximado de 1.0 a 1.5 cm de longitud y de forma cónica, al cual se le extrajeron manualmente las semillas de diámetro de 0.3 cm.

##### 4.2. MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo empleados en este trabajo fueron seleccionados de acuerdo a los reportados por Lindsey y col. (1983a) y Lindsey (1986) para el crecimiento de células de Capsicum frutescens, y fueron los siguientes:

- a) Murashige y Skoog (MS), (Murashige y Skoog, 1962).
- b) Schenk y Hildebrandt (SH), (Schenk y Hildebrandt, 1972).

La composición de los dos medios se muestra en el cuadro 2, usando para su preparación agua desionizada.

Para la germinación in vitro de las semillas se emplearon las sales minerales del medio MS y soporte de Gelrite al 0.0015 % (Kelco Division of Merck & Co. Inc.), mientras que para la inducción de tejido calloso se probaron tanto el medio MS y SH

Cuadro 2. Composición de los medios de cultivo de Murashige y Skoog (1962) y Schenk y Hildebrandt (1972)

Constituyente	Concentración en el medio (M)	
	MS	SH
<b>MACRONUTRIENTES</b>		
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2.06 X 10 <sup>-2</sup>	-----
KNO <sub>3</sub>	1.88 X 10 <sup>-2</sup>	2.50 X 10 <sup>-2</sup>
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	3.00 X 10 <sup>-3</sup>	1.50 X 10 <sup>-3</sup>
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.50 X 10 <sup>-3</sup>	1.50 X 10 <sup>-3</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.25 X 10 <sup>-3</sup>	-----
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-----	2.50 X 10 <sup>-3</sup>
Sacarosa	8.80 X 10 <sup>-2</sup>	8.80 X 10 <sup>-2</sup>
<b>MICRONUTRIENTES</b>		
KI	5.00 X 10 <sup>-6</sup>	6.00 X 10 <sup>-6</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.00 X 10 <sup>-4</sup>	1.30 X 10 <sup>-4</sup>
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	9.99 X 10 <sup>-5</sup>	5.90 X 10 <sup>-5</sup>
NaMoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1.00 X 10 <sup>-6</sup>	4.10 X 10 <sup>-7</sup>
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	1.00 X 10 <sup>-7</sup>	8.00 X 10 <sup>-7</sup>
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	1.00 X 10 <sup>-7</sup>	4.20 X 10 <sup>-7</sup>
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2.99 X 10 <sup>-5</sup>	3.50 X 10 <sup>-6</sup>
<b>FUENTE DE FIERRO</b>		
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.00 X 10 <sup>-4</sup>	5.40 X 10 <sup>-5</sup>
Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	1.00 X 10 <sup>-4</sup>	5.40 X 10 <sup>-5</sup>
<b>VITAMINAS</b>		
Mio-Inositol	4.90 X 10 <sup>-4</sup>	5.60 X 10 <sup>-3</sup>
Acido nicotínico	4.66 X 10 <sup>-6</sup>	4.10 X 10 <sup>-5</sup>
Piridoxina · HCl	2.40 X 10 <sup>-6</sup>	2.40 X 10 <sup>-6</sup>
Tiamina · HCl	3.00 X 10 <sup>-7</sup>	1.50 X 10 <sup>-5</sup>
Glicina	3.00 X 10 <sup>-5</sup>	-----

con los siguientes reguladores de crecimiento vegetal:

- a) MS suplementado con la auxina 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en concentraciones de 3.6 - 13.5  $\mu\text{M}$ , detalladas en cada experimento.
- b) SH suplementado con 2,4-D 2.26  $\mu\text{M}$ , ácido paracloro fenoxi acético 10.7  $\mu\text{M}$  y cinetina 0.5 mM.

La cinética de crecimiento celular y de producción de capsaicinoides en medio de cultivo semisólido se hizo en el medio MS suplementado con dos tratamientos de reguladores de crecimiento diferentes que fueron :

- a) MS más 9.0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D (MSM9).
- b) MS más 114 nM de ác. 3-Indolil acético (AIA) y 0.92 nM de cinetina (MSCI).

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

Los cultivos en suspensión se hicieron en matraces Erlenmeyer de 125 ml de capacidad, con 30 ml del medio MSM9 sin agente gelificante.

El pH de los medios de cultivo se ajusto a 5.8 en un potenciómetro Fisher Accument Modelo 525, empleando soluciones de KOH y HCl, ambas a 1 M según se requiriera.

Todos los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave, a 15 lb/pulg<sup>2</sup> durante 15 minutos, manipulando posteriormente los cultivos bajo condiciones de asepsia dentro de una campana de flujo laminar.

#### 4.3. CONDICIONES DE INCUBACION DE LOS CULTIVOS

Los cultivos en medio semisólido, para la germinación de las semillas y los cultivos de callos en medio semisólido, se mantuvieron bajo las siguientes condiciones: iluminación continua de 2 800 lux proporcionada por lámparas de luz fluorescente (blanco frío) y temperatura de  $29 \pm 2$  °C.

Por otra parte, los cultivos en suspensión se incubaron en una agitadora rotatoria (New Brunswick scientific Co., Inc. modelo 653), a una velocidad de 80 rpm con una amplitud de giro de 2 pulgadas, a una temperatura de  $25 \pm 2$  °C y manteniendo las mismas condiciones de iluminación usadas para los cultivos en medio semisólido.

#### 4.4 DESINFESTACION DE LAS SEMILLAS

Las semillas de chile chigol fueron sometidas a un pretratamiento físico previo a la desinfestación, que consistió en remojarlas en agua durante 24 horas, tratando de ablandar sus cubiertas protectoras. Posteriormente las semillas de chigol fueron desinfestadas usando primeramente una solución de etanol al 70 % durante un minuto, seguido de una inmersión en solución de hipoclorito de sodio (cloralex) al 2.7 % v/v (con 0.2 ml de Tween 20) durante 20 minutos y finalmente 5 enjuagues sucesivos con agua destilada esteril.

#### 4.5. INDUCCION DE TEJIDO CALOSO

Se usaron fragmentos de hipocotilo de plántulas germinadas

in vitro de aproximadamente 0.5 cm de longitud, los que fueron sembrados en los medios diferentes de inducción de tejido calloso mencionados anteriormente en el inciso 4.2. de materiales y métodos.

#### 4.6. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DEL TEJIDO CALLOSO

Se sembró 1 g de peso fresco de tejido calloso en frascos Gerber con 25 ml de medio de cultivo, preparados según el inciso 4.2 de materiales y métodos, incubándolos con iluminación continua de 2 800 lux y una temperatura de  $29 \pm 2$  °C. Tomando muestras por triplicado cada 7 días y se determinaron los siguientes parámetros: peso fresco, peso seco y producción de capsalcinoides. Para el peso fresco, se colocó el tejido calloso en pequeñas charolas de papel aluminio de peso conocido, que se pesaron en una balanza granataria de laboratorio, obteniendo por diferencia de peso el valor real.

Mientras que para el peso seco, el tejido calloso usado para peso fresco, se colocó en una estufa de vacío (Lab - live - Dou - Vac oven) a una temperatura de 70 °C, hasta alcanzar peso constante y se pesaron en una balanza analítica (Bush - S 200), determinando el peso seco del tejido por diferencia de pesos.

#### 4.7. ESTABLECIMIENTO DE LOS CULTIVOS EN SUSPENSIÓN

Para obtener los cultivos en suspensión, se inocularon de 3 a 5 g de peso fresco de tejido calloso en matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad, con 50 ml de medio MSM9, manteniéndolos en agitación rotatoria de 80 rpm, con iluminación continua de 2.800 lux y temperatura de  $25 \pm 2$  °C. Realizando subcultivos en esta

etapa cada 15 días.

#### 4.8. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LOS CULTIVOS EN SUSPENSIÓN

Se inocularon 1.0 a 2.0 g peso fresco de células, provenientes de un cultivo madre en suspensión, en matraces Erlenmeyer de 125 ml conteniendo 30 ml del medio MSM9. Para ello, las células fueron lavadas previamente con agua desionizada esteril en un embudo Bushner con papel filtro, a presión reducida.

Los cultivos se incubaron con agitación rotatoria de 80 rpm, bajo iluminación continua de 2 800 lux y a temperatura de  $25 \pm 2$  °C.

La toma de muestras se efectuó cada siete días evaluando los siguientes parámetros: crecimiento celular en base a peso seco, producción de capsaicinoides y consumo de nutrientes.

Para el peso seco, se filtró el contenido de cada matraz en un embudo Buchner con un papel filtro (Whatman No.1) de peso conocido que se encontraba conectado a una línea de vacío. Las células colectadas se lavaron con agua desionizada y se colocaron en una estufa de vacío a una temperatura de 70 °C hasta alcanzar su peso constante. El peso de las células se determinó por diferencia de pesos.

#### 4.9. EXTRACCIÓN DE CAPSAICINOIDES

La extracción de capsaicinoides del tejido caloso, se realizó según la metodología desarrollada por Tapia en 1987, cuyo diagrama de flujo se presenta en la figura 4. Esta consistió en

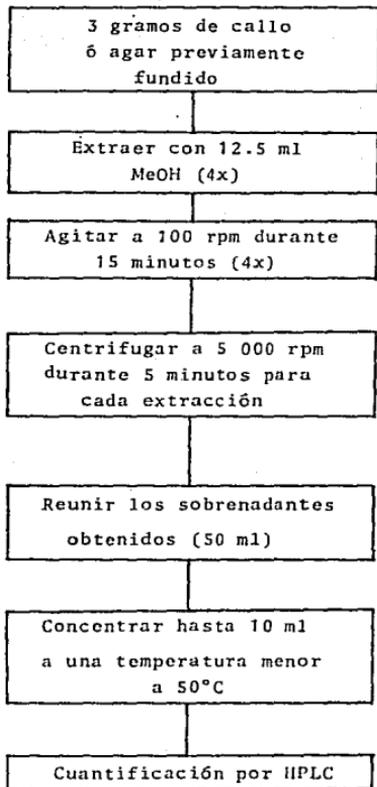


Figura 4. Método de extracción de capsaicinoides, tanto de callo como del agar (Tapia, 1987).

realizar extracciones con metanol tanto en el tejido calloso como en el agar, debido a que los capsaicinoides son liberados por las células al medio de cultivo (Lindsey y col., 1983a).

Por otra parte, para los cultivos en suspensión los capsaicinoides se extrajeron del medio de cultivo filtrado, con tres volúmenes de 10 ml de cloroformo. Los extractos obtenidos fueron llevados a sequedad en baño María con una temperatura menor a 60 °C, bajo presión reducida. La muestra así obtenida fué resuspendida en 1 ml de metanol para su posterior cuantificación.

#### 4.10. CUANTIFICACION DE CAPSAICINOIDES

A los extractos metanólicos de los cultivos en medio semisólido y en suspensión, se les cuantificó su contenido de capsaicinoides mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), empleando para ello un cromatógrafo (Marca Tracor) con una columna Supelcosil - C18 fase reversa, fase móvil metanol-agua (60 - 40 v/v) con 0.05 M de Ag NO a un pH = 2.5, un flujo de 1.0 ml/min, con un detector de luz ultravioleta a 280 nm e inyectando un volumen de 10 µl de muestra, usando un estándar externo de capsaicina (Sigma) (Tapía, 1987).

#### 4.11. EVALUACION DEL CONSUMO DE NUTRIENTES

Para estimar el consumo de los macronutrientes principales en los cultivos en suspensión, se emplearon los siguientes métodos:

Carbohidratos: por el método de fenol-sulfúrico descrito por Dubois y col. (1956), se hizo una dilución 1/100 del medio de

cultivo libre de células, tomando 1 ml de la dilución y adicionando 1 ml de fenol 5 % y 5 ml de  $H_2SO_4$  concentrado. Como la reacción fué exotérmica, los tubos se dejaron reposar durante 15 minutos. Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro (Perkin-Elmer 35) a una longitud de onda de 490 nm.

La curva patrón se hizo con sacarosa (Merck) en un intervalo de 0 a 1 000  $\mu g/ml$ .

Fosfatos : De acuerdo al método de Beremblum y Chain descrito por Lidberg y Ernster en 1957. A 1 ml de medio de cultivo libre de células se le adicionan 2 ml de agua desionizada, 0.5 ml de  $H_2SO_4$  5 M, 5 ml de una solución de isobutanol-benceno 1:1 y 0.5 ml de molibdato de amonio al 10 %. Bajo estas condiciones el ácido fosfomolibdico que se formó en la solución ácida se extrajo con la mezcla de isobutanol-benceno. Se agitó la mezcla durante 15 segundos y se tomó una muestra de 1 ml, el cual fué llevado a un volumen de 5 ml con una solución etanólica acidulada con  $H_2SO_4$  al 3.2 % (v/v). Para desarrollar el color se adicionaron 0.5 ml de una solución de Cloruro de estaño monohidratado ( $SnCl_2 \cdot H_2O$ ) al 10 % (p/v) en HCl al 10 %. Las lecturas de las muestras se hicieron en un espectrofotómetro (Perkin - Elmer 35) a una longitud de onda de 724 nm.

La curva patrón se hizo a partir de una solución madre de  $KH_2PO_4$  (219.5 mg) secado a 110 °C y aforado a 0.5 l (con. 1 ml = 100  $\mu g PO_4^{3-}$ ), en un intervalo de 0 a 40  $\mu g$ .

Amonio y Nitratos: El nitrógeno en forma de amonio y nitrato fué cuantificado en base al método de óxido de magnesio-reactivo

de Devarda, descrito por Bremer (1965).

Se colocó una alícuota de 2 ml de medio de cultivo libre de células en un matraz balón de 100 ml, adicionando 8 ml de agua desionizada y 200 mg de MgO para ser sometidos a una destilación por arrastre de vapor. El destilado se recogió en un matraz Erlenmeyer de 50 ml conteniendo 5 ml de una solución indicadora de ácido bórico hasta alcanzar un volumen final de 30 ml; éste destilado se valoró con una solución de  $H_2SO_4$  0.005 N (1 ml  $H_2SO_4$  = 70  $\mu g$  de N), hasta observar el vire de color (verde-rosa), determinando en éste momento la cantidad de amonio del medio de cultivo.

Al residuo del matraz de destilación se le adicionaron 200 mg de la aleación de Devarda y se repitió el proceso de valoración descrito anteriormente, determinando en esta segunda, la cantidad de nitratos existentes en el medio.

#### 4.12. EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO

Se probó la suplementación de diferentes fuentes de carbono: glucosa, fructosa y sacarosa a una concentración del 3% en el medio MSM9. Esto se hizo en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 30 ml de medio de cultivo, inoculados con 1.3 a 1.8 g de células (peso fresco). Los matraces se incubaron con agitación rotatoria de 80 rpm, iluminación continua de 2 800 lux y una temperatura de  $25 \pm 2$  °C.

Los cultivos fueron evaluados 25 días después de su inoculación, cuando alcanzaron su fase estacionaria de su ciclo de crecimiento, y se determinó el crecimiento celular en base a

peso seco y producción de capsaicinoides.

#### 4.13. VARIACION DE LA CONCENTRACION DE CARBONO Y DE NITROGENO

Tomando de base la concentración de macronutrientes que contiene el medio MS, mostrada en el cuadro 3, se realizaron los estudios de los efectos de su variación sobre el crecimiento celular y la producción de capsaicinoides.

Para este experimento se realizó un diseño experimental factorial de cuatro por cuatro niveles con tres repeticiones. Las variaciones en la concentración inicial de carbono y de nitrógeno fueron: 0 %, 50 %, 100 % y 150 % de la concentración del medio MSM9. Además de los tratamientos anteriores se analizó el efecto de la relación Carbono/Nitrógeno sobre la producción de capsaicinoides.

Para ello se inocularon matraces Erlenmeyer de 125 ml que contenían 30 ml de medio de cultivo, con inóculos de 1.3 a 1.8 g de células (peso fresco) lavadas previamente con agua destilada estéril. Los cultivos fueron incubados con agitación rotatoria de 80 rpm, con iluminación continua de 2 800 lux a una temperatura de  $25 \pm 2$  °C.

Los cultivos fueron evaluados a los 25 días después de su inoculación, cuando alcanzaron su fase estacionaria de su ciclo de crecimiento, y se determinó el crecimiento celular en base a peso seco y producción de capsaicinoides.

Cuadro 3. Macronutrientes principales del medio Murashige & Skoog (1962), y sus relaciones más importantes.

CONSTITUYENTE	MOLARIDAD <sup>a</sup>	MOLES	RELACIONES DE MACRONUTRIENTES MOL/MOL
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2.06 X 10 <sup>-2</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> = 39.41	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> / NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> = 0.52
KNO <sub>3</sub>	1.88 X 10 <sup>-2</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> = 20.62 N = 0.06	
Sacarosa	8.80 X 10 <sup>-2</sup>	C = 1.05	C / N = 17.50
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.25 X 10 <sup>-3</sup>	P <sup>+5</sup> = 0.0074	

a) Concentraciones en el medio MS y MSM9.

Cuadro 3. Macronutrientes principales del medio Murashigo & Skoog (1962), y sus relaciones más importantes.

CONSTITUYENTE	MOLARIDAD <sup>a</sup>	MOLES	RELACIONES DE MACRONUTRIENTES MOL/MOL
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2.06 X 10 <sup>-2</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> = 39.41	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> / NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> = 0.52
KNO <sub>3</sub>	1.88 X 10 <sup>-2</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> = 20.62 N = 0.06	
Sacarosa	8.80 X 10 <sup>-2</sup>	C = 1.05	C / N = 17.50
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.25 X 10 <sup>-3</sup>	P <sup>+5</sup> = 0.0074	

a) Concentraciones en el medio MS y MSM9.

#### 4.14. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE FOSFORO

Usando el medio MSM9 con 1.05 moles de carbono, correspondientes a un 100 % del medio original, se probaron las siguientes concentraciones de nitrógeno: 6,3 y 0 mmoles que corresponden respectivamente al 100 %, 50 % y 0 % del medio original, contra las siguientes concentraciones de fósforo : 11.1, 7.4, 3.7 y 0 mmoles, que corresponden respectivamente al 150 %, 100 %, 50 % y 0 % del medio original.

Además de los tratamientos anteriores se realizó otro estudio con el medio MSM9 pero sin la fuente de carbono y con un 30 mmoles de nitrógeno (50 % del medio original), provando las siguientes concentraciones de fósforo: 11.1, 7.4, 3.7 y 0 mmoles de P, que corresponden respectivamente al 150 %, 100 %, 50 % y 0 % del medio original.

Para ello se inocularon matraces Erlenmeyer de 125 ml que contenían 30 ml de medio de cultivo, con inóculos de 1.3 a 1.8 g de células (peso fresco) lavadas previamente con agua desionizada estéril.

Los cultivos fueron incubados con agitación rotatoria de 80 rpm, con iluminación continua de 2 800 lux a temperatura de  $25 \pm 2$  °C. Haciendo las evaluaciones después de 25 días de su inoculación, determinando su crecimiento celular en base al peso seco y la producción de capsaicinoides.

#### 4.15.EFECTO DEL pH

Debido a que las células vegetales no soportan pH extremos,

sólo se probaron los pH's iniciales del medio de cultivo MSM9 de 4.7, 5.7 y 6.7 ajustado con HCl 1 M y NaOH 1 M, en un potenciómetro (Fisher Accumet Modelo 525 digital).

Para ésto se inocularon matraces Erlenmeyer de 125 ml que contenían 30 ml de medio de cultivo, con inóculos de 1.3 a 1.8 g (peso fresco) de células previamente lavadas con agua desionizada estéril.

Los cultivos fueron incubados en agitación rotatoria de 80 rpm, con iluminación continua de 2 800 lux a temperatura de  $25 \pm 2$  ° C. La evaluación se hizo a los 25 días después de su inoculación, determinando su crecimiento celular y la producción de capsaicinoides.

## V. RESULTADOS Y DISCUSION

### 5.1. OBTENCION DE MATERIAL VEGETATIVO

La elección de Capsicum annum var. glabriusculum/aviculare (piquín Chigol), se hizo en base a que los frutos de esta variedad son de los más picosos. Aún cuando en este trabajo no se determinó el contenido de capsaicinoides en los frutos de chigol, debido a problemas de insuficiencia de material biológico, existen pruebas cuantitativas que han demostrado que los frutos mexicanos pertenecientes a la variedad glabriusculum/aviculare, son los de mayor contenido de capsaicinoides, como lo demuestra el trabajo de Morales (1981), quien analizó el contenido de capsaicinoides en 20 variedades cultivadas en México, mediante un método colorimétrico y observó que los piquines fueron los que presentaron el mayor contenido de capsaicinoides.

Por otro lado, Tapia en 1987, utilizando la técnica de Cromatografía Líquida de Alta resolución y frutos de diferentes variedades, comprobó que con la excepción del chile habanero (C. chinense), los piquines presentaban el mayor contenido de capsaicinoides (11.0 a 16.7 mg de capsaicinoides/g de fruto).

Para su germinación las semillas fueron sembradas en el medio semisólido MS, sin embargo éstas no germinaron después de un mes de incubación. Por ello se analizó por observación visual el lote de semillas, encontrando un 30% de semillas vanas, caracterizadas por una coloración muy tenue o muy café con respecto al resto de las semillas. Por ello fueron eliminadas, este hecho también fue observado por Gizard (1981), al determinar

las causas probables de anomalía en la germinación de semillas de chile serrano (C. annuum var. annuum).

Una posible razón por la que las semillas de chigol no germinaran, es porque de los frutos que se obtuvieron, fueron en su mayoría verdes y como se ha visto en otros estudios (Bedoya, 1971; Cochran, 1943), existe un estado óptimo de madurez de los frutos de chiles (coloración roja), de donde se obtienen las semillas con los más altos porcentajes de germinación.

Con el pretratamiento de remojo en agua durante 24 horas, las semillas de chigol lograron germinar en un 20 % en el transcurso de un mes. Es característico de las semillas de los chiles piquines su bajo porcentaje de germinación, sin embargo como se comprobó en este trabajo y en el de Velázquez en 1988, éste se puede incrementar al 20 % o al 100 % con el remojo de las semillas en agua o en solución ácida, tratamientos basados en lo que les sucede a las semillas de los frutos silvestres de Chile en la naturaleza, que se ven sometidas a diferentes factores importantes para su germinación; como es la escarificación de sus cubiertas protectoras, diferentes regímenes de sequía-humedad-sequía y tratamientos ácido-enzimático al ser ingeridas por pájaros (Pickersgill, 1969).

## 5.2. INDUCCION DE TEJIDO CALLOSO.

Con la finalidad de obtener tejido calloso con una velocidad de crecimiento alta y buena friabilidad, que sirviera como fuente de inóculo para la cinética de crecimiento celular en el medio semisólido y para la obtención de los cultivos en suspensión, se

probó la inducción de tejido calloso a partir de fragmentos de hipocotilo, tomados de plántulas germinadas in vitro. Estos fueron sembrados en el medio MS con la auxina 2,4 -D y en el medio SH con los reguladores de crecimiento 2,4 -D, pCPA y cinetina.

Para los dos medios probados, se obtuvo la formación de tejido calloso en el transcurso de los primeros 15 días, que conforme evolucionó su desarrollo, presentaron características particulares de crecimiento, friabilidad y pigmentación.

Como se observa en el cuadro 4, la respuesta de crecimiento y friabilidad de tejido calloso en el medio MS, aumentó de manera directa conforme se incrementó la concentración de 2,4-D de 3.6  $\mu\text{M}$  hasta 9  $\mu\text{M}$ , pero un aumento posterior (13.5  $\mu\text{M}$ ) tuvo un efecto inhibitorio tanto en el crecimiento como en su friabilidad. Esta respuesta de los hipocotilos de C. annuum a la formación de tejido calloso en el medio MS suplementado con la auxina 2,4-D concuerda con las observaciones hechas por Phillips y Hubstenberger (1985), quienes realizaron estudios de organogénesis con la misma especie.

Por otra parte el crecimiento de tejido calloso del chile chigol en el medio SH, fue tan grande como el observado en el medio MS con 9.0  $\mu\text{M}$  de 2,4 -D, sin embargo la poca friabilidad de los callos obtenidos en el medio SH originó que se eligiera para posteriores experimentos el uso del medio MS con 9.0  $\mu\text{M}$  de 2,4 -D (MSM9), medio en el cual se obtuvo un buen crecimiento y alta disgregabilidad, condiciones deseables para la obtención de cultivos en suspensión.

Cuadro 4. Crecimiento de tejido calloso de chile chigol (*C. unnuum* var. *glabriusculum* / *aviculare*) en dos medios de cultivo<sup>c</sup>

MEDIO	REGULADOR DE CRECIMIENTO	CONC. $\mu$ M/1	CRECIMIENTO <sup>a</sup>	FRIABILIDAD <sup>b</sup>	COLORACION
MS	2,4-D	3.6	+	*	Café
MS	2,4-D	6.7	++	**	Beige
MS	2,4-D	9.0	++++	****	Zonas café y verde
MS	2,4-D	13.5	+++	**	Café
SH	2,4-D	2.2			
	pCPA	10.7	++++	*	Beige
	cinetina	0.5			

a) + nulo  
 ++ poco  
 +++ regular  
 ++++ bueno

b) \* Muy compacto  
 \*\* Compacto  
 \*\*\*\* Muy friable

c) Incubados a 30°C  
 iluminación continua 2 800 lux.

### 5.3. CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE CAPSAICINOIDES EN MEDIO SEMISOLIDO

Con el objeto de probar si existe un efecto represivo de la auxina 2,4 -D comparándola con los reguladores de crecimiento AIA y cinetina, en la producción de capsaicinoides del tejido calloso de chigol. Se procedió a efectuar la cinética de crecimiento celular y producción de capsaicinoides en el medio MSM9 y en el medio MSC1, usando para ello como inóculo pequeños fragmentos de 1 g de tejido calloso.

El perfil de la curva de crecimiento y producción de capsaicinoides de los callos de chile chigol en los medios MSM9 y MSC1 son presentados en las figuras 5 y 6. Como se observa la curva de crecimiento en base a peso fresco y peso seco, presentó el comportamiento típico de los sistemas biológicos, una curva sigmoideal en la cual se observan sus 5 fases de crecimiento: lag, exponencial, logarítmica, desaceleración y el inicio de la estacionaria, teniendo una duración de 40 días y obteniéndose una biomasa final de 6.0 g peso fresco (0.3 g peso seco) y 5.2 g peso fresco (0.2 g peso seco) para los medios MSM9 y MSC1 respectivamente.

Comparando los parámetros cinéticos obtenidos para el crecimiento del tejido calloso de chigol en los dos medios, tenemos para el medio MSM9 un tiempo de duplicación ( $t_d$ ) de 11.72 días, en tanto que para el medio MSC1 su  $t_d$  fue de 14.16 días, lo que nos indica que la velocidad de crecimiento del tejido calloso de chigol, fué mayor en el medio MSM9, además la friabilidad de estos callos fue mayor a la de los callos crecidos



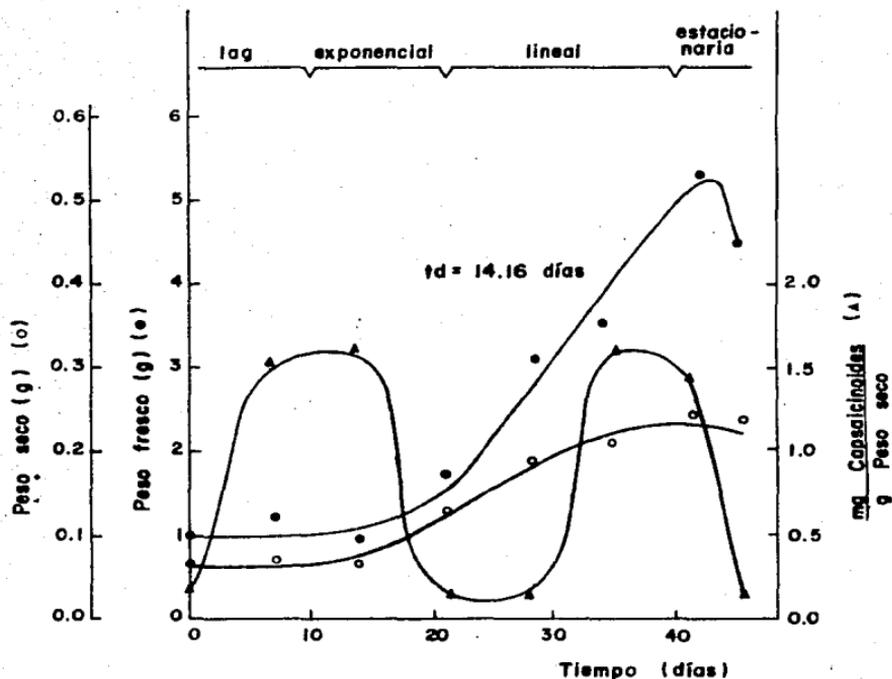


Fig. 6 Cinética de crecimiento y Producción de capsaicinoides del tejido caloso de chile chigol (*C. annum* var. *glabrusculum/aviculare*) en el medio MS +  $11.4 \times 10^{-9}$  M AIA y  $9.3 \times 10^{-8}$  M cinetina .

en el medio MSC1.

El valor de los parámetros cinéticos obtenidos para el chile chigol, es muy similar al obtenido por Velázquez en 1988, para el tejido calloso de otro piquin, conocido como chile chilpay, que reporta un valor de  $t_d = 13.61$  días con buena friabilidad, usando en su estudio también el medio MS. Esto sugiere un comportamiento similar en el crecimiento de tejido calloso de los chiles pertenecientes a Capsicum annuum var. glabriusculum.

Por otra parte la producción de capsaicinoides ( Fig. 5 y 6 ), fué de un mayor rendimiento de producción cuando el cultivo se encontró en su fase lag : 1.5 mg capsaicinoides/g peso seco tanto para el medio MSM9 como MSC1, seguido por una disminución en su fase exponencial y un nuevo aumento al entrar el cultivo en su fase lineal : 0.8 mg capsaicinoides/ g callo para MSM9 y 1.5 mg capsaicinoides/g callo para MSC1.

En síntesis, el comportamiento cinético de crecimiento y de producción de capsaicinoides en los medios MSM9 y MSC1 fueron muy similares, pero no concuerda con lo propuesto por diversos autores, como Morris y col., (1985) y Stafford y col., (1986), quienes asumen que los bajos rendimientos de algunos metabolitos secundarios se debe al uso de la auxina 2,4 -D en el medio de cultivo, la cual tiene un efecto represivo en la actividad de algunas enzimas relacionadas con el metabolismo secundario de las células, tal es el caso de la producción de antocianinas por cultivos de células en suspensión de zanahoria, en los que al eliminar el 2,4-D del medio de cultivo, provocó una mayor producción de antocianinas acompañada de una mayor actividad de las enzimas : fenilalanina amonioliasa, 4-cumarato-CoA ligasa y

cumarato 4-hidroxilasa (Ozeki y Komamine, 1985).

Comparando la producción de capsaicinoides del tejido calloso del chile chigol (fig.5 y 6), con la reportada por Velázquez (1988) para otro chile piquin (chilpay), tenemos que ambos piquines alcanzaron valores de 1.0 a 1.7 mg de caps/ g de callo durante su fase lineal de crecimiento y además los callos de chigol mostraron un aumento de capsaicinoides durante la fase lag, que no se presentó en el chile chilpay.

El incremento de la producción de capsaicinoides en los callos de chigol en la fase lag de la curva de crecimiento, pudiera estar relacionado con el aumento en la actividad de las enzimas de la ruta biosintética de los capsaicinoides, tal como la fenilalanina amonioliasa, la cual es considerada como la enzima clave en el metabolismo de fenil propanoides y ésta encargada de la conversión de fenil alanina en ác. cinámico (fig. 1 ). Para otras especies en cultivos celulares in vitro, dicha enzima ha mostrado tener un incremento en su actividad durante la resiembra de los cultivos, efecto que se ha llamado de dilución (Hugh, 1984; Thorpe y col., 1971).

Por lo anterior, en estudios posteriores deberá considerarse la actividad de las enzimas de la ruta biosintética de los capsaicinoides, con el objeto de establecer a largo plazo los mecanismos para su regulación metabólica.

Analizando la producción de capsaicinoides del tejido calloso de chile chigol que fué de 1.5 y 1.7 mg de caps/ g de peso seco de callo, con el contenido de capsaicinoides de otros frutos de chile piquin (C. annuum var. glabriusculum), que

alcanzan valores de 7.0 a 16.0 mg caps/ g de peso seco (Tapia, 1987), se obtiene que el tejido calloso del chile chigol está reduciendo su producción respecto al fruto hasta aproximadamente un 10 %.

Sin embargo, la producción de capsaicinoides del tejido calloso de chigol es ligeramente menor o en algunos casos superior al que se obtiene de frutos de otros chiles como : Capsicum pubescens (1.9 mg caps/ g peso seco de fruto), C. annum var. annuum, jalapeño (0.61 mg caps/g peso seco de fruto), serrano (0.86 mg caps/ g peso seco de fruto) y de agua (1.83 mg caps/ g peso seco de fruto) reportados por Tapia en 1987.

Tomando en cuenta que el objetivo principal de los experimentos anteriores, realizados en el medio semisólido, fue el establecer las condiciones de reguladores de crecimiento que permitieran la obtención de tejido calloso con una velocidad alta de crecimiento y buena friabilidad del tejido, así mismo debido a que comprobamos el poco efecto de la auxina 2,4-D en una concentración de 9  $\mu$ M sobre la producción de capsaicinoides (fig. 5 y 6), entonces se eligió el medio MSM9, para mantener el tejido calloso y obtener cultivos en suspensión con mayor rapidez y disgregabilidad.

#### 5.4. CINÉTICA DE CRECIMIENTO, CONSUMO DE NUTRIENTES Y PRODUCCIÓN DE CAPSAICINOIDES EN LOS CULTIVOS EN SUSPENSIÓN

##### 5.4.1. CRECIMIENTO CELULAR

Para poder optimizar la producción de metabolitos secundarios a partir de células vegetales, es requisito indispensable conocer el comportamiento cinético del crecimiento celular y de la producción del metabolito secundario deseado, ya que en la naturaleza durante el curso del crecimiento de los organismos, su máxima producción generalmente se da cuando el cultivo ha alcanzado cierto grado de desarrollo y madurez. En el caso de la síntesis de capsaicinoides, ésta ocurre en la planta durante un período de tiempo muy corto (Iwai y col., 1979), y la expresión de la ruta biosintética solamente se da en los frutos, presentando en *C. frutescens* un perfil de producción ligeramente asociado al crecimiento, no obstante, éste varía entre especie y entre variedad.

In vitro el comportamiento de producción de metabolitos secundarios varía muchas veces, dependiendo de las condiciones del cultivo, reguladores de crecimiento, especie vegetal y sobre todo según la línea celular que se trabaja, como lo muestran los trabajos de De- Ekmankul y Ellis (1985b), Stafford y col., (1986) y Zenk y col., (1977).

Tomando en cuenta lo anterior, y con el objeto de estudiar el comportamiento del crecimiento celular y la producción de capsaicinoides en los cultivos en suspensión del chile chigol, se inocularon matraces Erlenmeyer, y se evaluó cada 3 días (por

triplicado) el crecimiento celular en base al peso seco y producción de capsaicinoides. Los resultados obtenidos son presentados en la figura 7A, en la que se observa un patrón de crecimiento sigmoidal, con fase lag hasta los 9 días, exponencial de 9 a 12 días, lineal de 13 a 25 días y finalmente el inicio de su fase estacionaria a los 26 días.

El valor del tiempo de duplicación ( $t_d$ ) fué de 4.81 días, este valor resultó ser mayor al reportado para células en suspensión de Capsicum frutescens ( $t_d = 2.71$  días) por Mavituna y Park (1985), aunque ellos utilizaron glucosa como fuente de carbono y por lo tanto su asimilación y utilización por las células fué más rápida. Sin embargo, el  $t_d$  obtenido en el presente trabajo concuerda con el obtenido por los mismos autores, para células de la misma especie inmovilizadas en espumas de poliuretano.

#### 5.4.2. PRODUCCION DE CAPSAICINOIDES

Como se observa en la figura 7A, al relacionar la cinética de crecimiento celular y producción de capsaicinoides en rendimiento volumétrico, se observó que en la fase lag el nivel de producción de capsaicinoides tuvo una disminución, se volvió a incrementar a los 10 días hasta  $100 \mu\text{g}$  de Caps/l (fase exponencial) y permaneció constante durante su fase lineal de crecimiento, y alcanzó su mayor producción en la fase estacionaria (a los 26 días) con un valor de  $175 \mu\text{g}$  Caps/l. El comportamiento anterior nos llevó a establecer que la producción de capsaicinoides fue combinada (asociada y no asociada) con

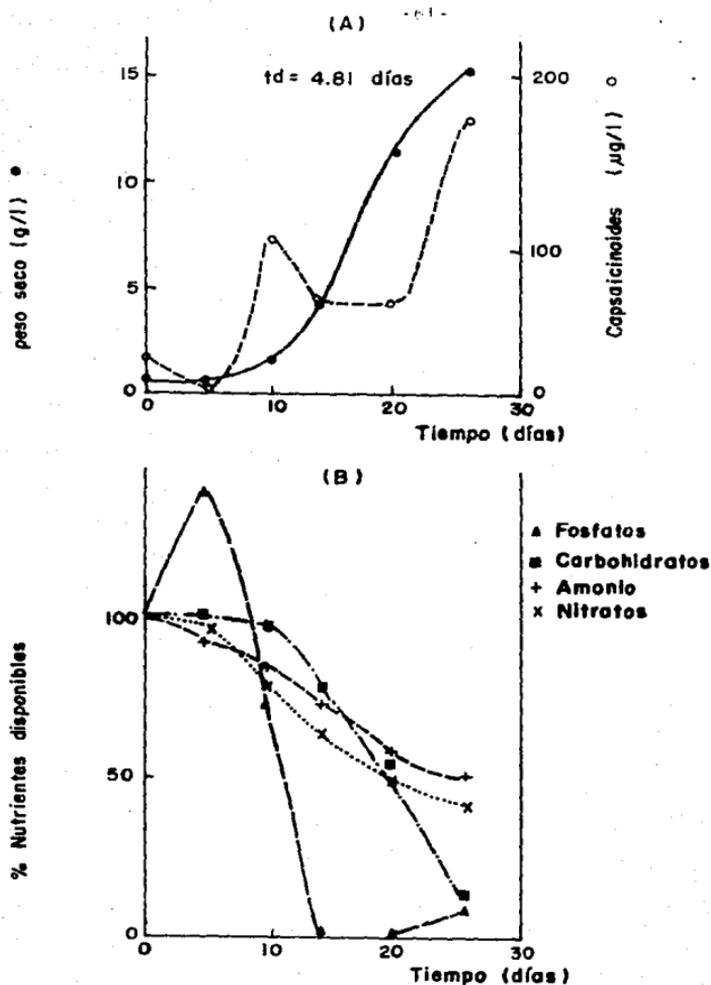


Fig. 7 Cinética de Crecimiento celular, Producción de capsaicinoides (A) y consumo de nutrientes (B) de células en suspensión de chigol (*C. annum* var. *glabriusculum* / *aviculare*) en el medio MSM9.

respecto al crecimiento celular.

Durante la fase lag de crecimiento, la baja de capsaicinoides, puede explicarse en base a un recambio y/o degradación de capsaicinoides por las células, probablemente una vez que han solucionado sus necesidades que les frenaron la formación de capsaicinoides, reinician su biosíntesis en la fase exponencial, para volver a tener un recambio y/o degradación de capsaicinoides en la fase lineal y por último volver a incrementar su producción de capsaicinoides al estar el cultivo en su fase de desaceleración e inicio de la estacionaria. Este comportamiento al parecer cíclico, fué también observado por Lindsey y Yeoman (1984b), en la producción de capsaicinoides con células inmovilizadas de C. frutescens.

De los capsaicinoides producidos (fig. 7A ), se encontró a la capsaicina como único capsaicinoide cuantificable, y solamente trazas de la dihidrocapsaicina.

A diferencia de lo observado en el cultivo de tejido calloso (fig. 5 y 6 ) donde se obtuvo como principal capsaicinoide a la nordihidrocapsaicina, en los cultivos en suspensión se tuvo una mayor concentración de capsaicina (dato no mostrado), hecho de gran importancia, ya que como se observa en el cuadro 1, el grado de picor de la capsaicina es mayor al de la nordihidrocapsaicina .

Expresada la producción de capsaicinoides obtenidos en el presente trabajo como  $\mu\text{g Caps/l}$ , se obtuvo un valor máximo de 175  $\mu\text{g}$  de capsaicinoides/l, que fué 8.7 veces mayor al observado para células en suspensión de Capsicum frutescens por Lindsey (1983a). Por otra parte, expresada la producción como un rendimiento por

gramo de células  $\mu\text{g Caps/g P.S./l}$ , se obtuvo el valor máximo de 58  $\mu\text{g de caps/g P.S./ l}$  a los 10 días (Fig. 7), siendo superior en 11 veces al reportado por Lindsey (1986) para células en suspensión de C. frutescens. Los resultados anteriores nos llevan a suponer una mayor actividad biosintética de las células en suspensión de chiles pertenecientes a la especie C. annum var. glabriusculum/aviculare, hacia la producción de capsaicinoides, que la especie anteriormente citada.

#### 5.4.3. CONSUMO DE FOSFORO

El consumo de nutrientes como puede verse en la figura 7B, para el caso del fósforo se observó un incremento del contenido inicial en la fase lag por encima del 100 %, con una velocidad alta de consumo durante el inicio de su fase exponencial, desapareciendo en la fase lineal y volviendo a aparecer cuando el cultivo alcanzó la fase de desaceleración.

En los estudios de Calva (1988) y Velázquez (1988), se ha observado el aumento de concentración del fósforo durante la fase lag de crecimiento de las células del género Capsicum, tal y como se presentó en el presente trabajo. Sin embargo, se desconoce si pueda tratarse de una liberación de fosfatos por lisis celular, ya que no se checó la viabilidad celular.

Como se ha visto en otros sistemas el fósforo es el primer nutriente consumido por las células (De- Ekmankul y Ellis, 1984; Knobloch y Berlin, 1983; Thom y col., 1981), lo cual ocurre debido a los altos requerimientos de este nutriente, necesarios para la síntesis de constituyentes celulares como nucleótidos,

moléculas importantes para la reproducción celular, hecho que fue comprobado en células en suspensión de Catharanthus roseus (Ukaji y Ashihara, 1986) y de Datura innoxia (Hylegalla y col., 1985).

En diferentes cultivos de células vegetales se ha comprobado, que la célula asimila rápidamente el fósforo, como se observó en las células de chigol. Por ejemplo, células inmovilizadas de Capsicum frutescens cultivadas en un reactor de lecho estacionario, se vieron limitadas por fosfato después de un período corto de tiempo (Lindsey y Yeoman, 1983b), así mismo en cultivos de Catharanthus roseus se determinó su consumo total en un intervalo de 0 a 700  $\mu\text{M}$  (Majerus y Pareilleux, 1986). Este fósforo es canalizado por diferentes rutas metabólicas, como sucedió en las células de Thalictrum rugosum, en las cuales se encontró el fósforo radioactivo adicionado en el inicio del cultivo en diferentes compuestos como azúcares fosfatados, ortofosfato citoplasmático libre, fosfato inorgánico en vacuolas y en compuestos de alta energía como ATP y GTP (Berlin y col., 1988).

Relacionando el comportamiento de producción de capsaicinoides con la asimilación de fósforo, observamos (fig.7) que para el día 5 las células liberaron fósforo intracelular y hubo un posible recambio y/o degradación de capsaicinoides que hizo disminuir su acumulación a 0, de los días 10 al 14 se dio una rápida asimilación de fósforo extracelular hasta ser agotado del medio de cultivo, mientras que la producción de capsaicinoides en el día 10 tuvo un incremento de 2.5 a 103  $\mu\text{g}$  de caps/ l, para posteriormente presentar una disminución hasta 60

$\mu\text{g}$  de caps/l en el día 14. Entre los días 14 y 20 cuando no hubo fósforo en el medio de cultivo, tampoco hubo acumulación de capsaicinoides en el medio y finalmente entre los días 20 y 26, cuando las células liberaron fósforo al medio de cultivo se presentó la mayor acumulación de capsaicinoides (175  $\mu\text{g}$  de Caps/l).

Diversos autores (Mantell y smith, 1983a ; Vining, 1986), reportan que para otros metabolitos secundarios, se ha visto que una asimilación completa del fósforo del medio de cultivo, activó su metabolismo secundario e incrementó su producción, sin embargo, como pudo verse en los cultivos de chigol el comportamiento de asimilación de éste nutriente y la acumulación de capsaicinoides es un proceso de mayor complejidad.

Por otra parte, la rápida asimilación de fosfatos observada en el presente trabajo, no es un hecho que pueda generalizarse para todos los cultivos vegetales, excepciones a tal comportamiento puede ser el caso reportado por Wijnsma y col. (1986) quienes observaron en cultivos de Cinchona ledgeriana un consumo gradual y lento de fósforo, que no afectó la producción de antraquinonas.

#### 5.4.4. CONSUMO DE NITROGENO

Como se observa en la figura 7B, la tasa de consumo de nitrógeno, tanto en su forma de amonio como en su forma de nitrato, presentó una disminución gradual hasta llegar a un 50 % del contenido inicial del medio, en la fase estacionaria de la cinética de crecimiento de las células de chile chigol.

Calva (1988) y Velázquez en el mismo año, trabajando con

células en suspensión de Capsicum annuum var. glabriusculum crecidas también en el medio MS, observaron un consumo de nitrógeno de 30 mM, valor igual al obtenido con las células de chigol. Esto confirma que la cantidad de nitrógeno de dicho medio se encuentra en exceso para el crecimiento de las células de ésta variedad.

La asimilación de nitrato y de amonio observada en la figura 7B, pudo estar íntimamente relacionado con la regulación del pH por la célula vegetal, pues es conocido que si el medio de cultivo en que se crecen las células es básico, asimilan  $\text{NH}_4^+$  eliminando  $\text{H}^+$  al intercambiarlo, por lo que baja el pH al formarse ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) con el nitrato restante. Inversamente, si el pH es ácido absorben nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) eliminando  $(\text{OH})^-$  al intercambiarlo, por lo que el pH se incrementa al formarse hidróxido de amonio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) (Bidwell, 1979).

El comportamiento anterior hace suponer que en los cultivos de chigol funciona tanto la vía de asimilación de nitrato a través de la enzima nitrato reductasa, para convertirlo en nitrito y seguir las sucesivas reacciones de reducción hasta llegar a amonio e incorporarse en  $\alpha$ -ceto ácidos por una reacción de transaminación para la síntesis de aminoácidos (como puede observarse en la figura 3). Así como una vía de asimilación de amonio que evita los pasos reductorales del nitrógeno e incorpora el amonio en los aminoácidos a través de la enzima glutamina sintasa (Dougall, 1977).

Por otra parte, en investigaciones futuras, no debe

descartarse el estudio de los efectos de otras fuentes de nitrógeno como los aminoácidos, los cuales en otros sistemas incrementaron de acuerdo a sus objetivos, ya sea el crecimiento celular o la producción de algunos metabolitos secundarios, al ser éstos en algunos casos precursores metabólicos del producto deseado (Thom y col., 1981; Yamakawa y col., 1983; Yamamoto y Yamada, 1986).

#### 5.4.5. CONSUMO DE SACAROSA

Finalmente por lo que respecta a la asimilación de sacarosa como fuente de carbono por las células de chigol (figura 7B), se observó que durante la fase lag su consumo fue poco significativo y con el inicio de la fase exponencial el contenido de carbono del medio descendió de una manera lineal en un 89 % de la sacarosa inicial al entrar el cultivo a la fase estacionaria, un 11 % de la sacarosa inicial en la fase estacionaria (a los 26 días).

Lo anterior es debido a que durante la fase lag las células se encuentran sintetizando sus constituyentes celulares indispensables para la división celular (nucleótidos) y tienen una baja demanda de azúcares, sin embargo durante su fase de crecimiento celular (fase exponencial y logarítmica), la demanda de carbohidratos se incrementó debido a las necesidades de las células para la síntesis de constituyentes celulares y almacenamiento en moléculas de almidón. Tal como fue demostrado en células de Datura innoxia (Wylegalla y col., 1985). La importancia que tiene la fuente de carbono en los cultivos de células vegetales es vital, ya que al tratarse de cultivos

hétérotrofos es indispensable la presencia de carbohidratos que puedan servir para la síntesis de constituyentes celulares y como fuente de energía, ya que son pocos los cultivos que han logrado expresar la capacidad autotrófica total de la célula vegetal (Yamada y col., 1978), es decir atender sus necesidades del metabolismo primario y dirigirse hasta el metabolismo secundario, sin necesidad de la fuente de carbono externa.

#### 5.5.EFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE CARBONO

Bajo condiciones in vitro han sido probadas una gran variedad de fuentes de carbono, para el crecimiento de células de diferentes especies, éstas incluyen fuentes refinadas como sacarosa, maltosa, fructosa, glucosa, galactosa, etc. y fuentes no refinadas como almidón, melazas, agua de remojo de maíz, etc., teniendo efectos muy variables sobre el crecimiento celular y la producción de metabolitos secundarios (Fowler, 1982a; Fowler y Stepan-Sarkissian, 1984).

Sin embargo, en células del género Capsicum, los efectos de estas fuentes de carbono en el crecimiento y producción de capsaicinoides no habían sido reportados, por lo cual se decidió probar la suplementación en el medio MS del disacárido sacarosa y de los monosacáridos que lo forman glucosa y fructosa, todos al 3 %.

Los resultados obtenidos son presentados en la figura 8. Como se puede observar tanto la sacarosa como la glucosa fueron las fuentes que permitieron un mayor crecimiento (10 y 11 g peso seco de biomasa respectivamente), en tanto que con la fructosa

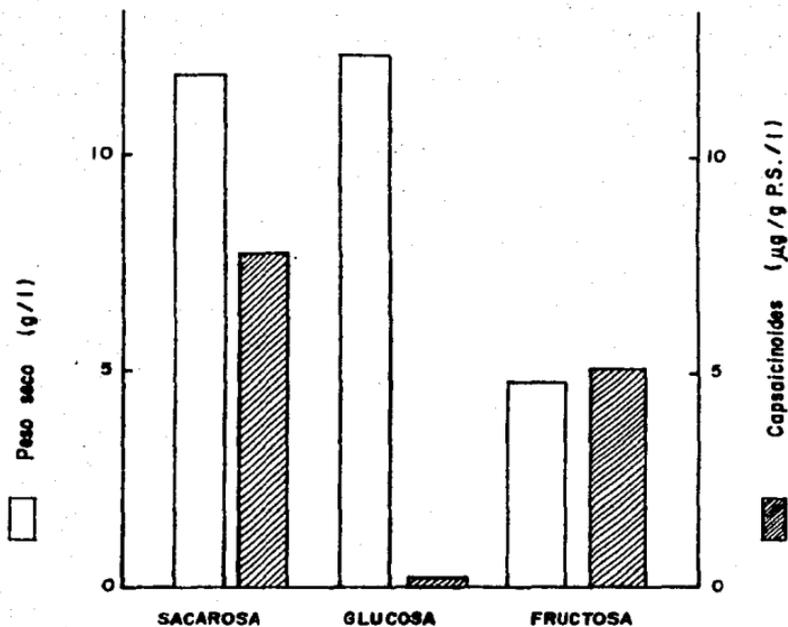


Fig. 8 Efecto de diferentes fuentes de Carbono (3%) en el crecimiento y producción de Capsaicinoides en células en suspensión de *C. annum* var. *glabriusculum/aviculare*.

se obtuvo menos del 50 % (5 g peso seco) de lo que se obtuvo para la sacarosa y la glucosa.

Analizando la producción de capsaicinoides, se encontró la mayor producción con la sacarosa (7.07  $\mu\text{g Caps/g P.S./l}$ ), seguido de la fructosa con la que se obtuvo un 30 % menos (5.49  $\mu\text{g Caps/g P.S./l}$ ) y únicamente se detectaron trazas de éste metabolito con la glucosa.

Los resultados de la figura 8, sugieren que las células de chigol crecidas en presencia de sacarosa, contienen la enzima invertasa, responsable de hidrolizar a la sacarosa en sus monómeros glucosa y fructosa que posteriormente son asimilados y utilizados, como sucede en diferentes cultivos, como el de células de Streptanthus tortuosus (Stanzel y col., 1988).

Las células de chigol cultivadas en sacarosa y en glucosa, fueron las de mayor crecimiento, sin embargo con la glucosa la producción de capsaicinoides fué mínima, en este caso la glucosa pudiera estar reprimiendo o inhibiendo la producción de capsaicinoides en algún paso de su ruta de biosíntesis. Mientras que para la fructosa, su asimilación puede estar condicionada a la enzima fructocinasa, que regula la entrada de éste azúcar a la glucólisis y por ello el bajo crecimiento de las células, desviando sus rutas metabólicas al metabolismo secundario e incrementando la producción de capsaicinoides. La actividad de dicha enzima ha sido propuesta por Ashihara y col. en 1988, a ser el paso limitante en la glucólisis de las células cultivadas en suspensión de Catharanthus roseus.

Los resultados anteriores de producción de capsaicinoides con diferentes fuentes de carbono, confirman una vez más lo

establecido por Fowler y Stepan-Sarkissian (1985), que la sacarosa y la glucosa son las fuentes de carbono con las que se obtiene mayor producción de biomasa en Cultivos de Células Vegetales, sin embargo, existe una gran diferencia entre ellas en sus efectos de producción de metabolitos secundarios. Y de igual manera demuestran lo propuesto por Lindsey y Yeoman (1983c), que existe una relación inversa entre el crecimiento celular y la producción de metabolitos secundarios.

Cuando se hacen variaciones en la fuente de carbono o en la concentraciones de carbohidratos en el medio, se puede afectar además de las vías metabólicas primarias, a las vías alternas secundarias de la célula vegetal. Resultados que se manifestaron en el patrón de producción de metabolitos secundarios, por ejemplo: Bauch y Leistner (1978) observaron diferentes patrones de producción de antraquinonas, antraquinón-glicósidos y naftoles por las células de Galium mollugo y la misma alteración en la relación de producción fué reportada para ajmalicina, antocianina y compuestos fenólicos por células de Catharanthus roseus (Knobloch y col., 1982).

En el presente trabajo para las células de chigol, no se observó cambio alguno en el patrón de producción con respecto al tipo de capsaicinoides (fig. 8 ), habiéndose cuantificado a la capsaicina como único capsaicinoide para las tres fuentes de carbono probadas.

En base a estos resultados se decidió continuar trabajando en los siguientes experimentos con la sacarosa como fuente de carbono.

## 5.6. VARIACION DE LA CONCENTRACION DE CARBONO Y DE NITROGENO

Existen diversos reportes en la literatura (Mantell y col., 1983a; Smith y col., 1987; Suzuki y col., 1984b) en los cuales se ha analizado el efecto de la variación de la concentración inicial de carbono o nitrógeno inicial, sin embargo, como ha sido discutido por algunos autores como Rokem y Goldberg (1985) el contenido inicial de carbono y nitrógeno así como su relación (C/N) juegan un papel sumamente importante para mejorar la producción de metabolitos secundarios por cultivos de células vegetales in vitro.

En el crecimiento de células vegetales y su producción de metabolitos secundarios, resulta de gran importancia el análisis de dos o más factores en conjunto, como lo demuestran los trabajos de Kubek y Shuler (1980) y Sahai y Shuler (1987). Ya que de lo contrario, cuando se van optimizando independientemente las concentraciones de cada nutriente, al hacer la conjunción final se puede obtener una producción del metabolito menor a la del medio original, como lo observaron De -Ekmankul y Ellis (1985b), en la producción del ácido rosmarínico.

Por lo anterior, en el presente trabajo se realizó un experimento de diseño factorial, probando diferentes concentraciones iniciales de carbono: 0, 0.5, 1.0 y 1.5 moles y de nitrógeno: 0, 30, 60 y 90 mmoles, evaluando el crecimiento celular y producción de capsaicinoides por las células de chigol. Para ello se mantuvo constante la relación de amonio:nitrato de 0.52 mol/mol en todos los tratamientos experimentales.

Los resultados obtenidos para la producción de biomasa son

presentados en la figura 9 . En general la superficie de respuesta presento un perfil de campana de Gauss, donde se observa que cuando se eliminó del medio de cultivo la fuente de carbono el crecimiento fué mínimo, igual ocurrió cuando se incrementó de 60 a 90 mmoles de N, sin embargo, cuando el nitrógeno fué eliminado del medio se presentó un incremento proporcional en la biomasa conforme se aumentó la concentración de carbono, alcanzando un máximo relativo con 1.57 moles de C (índice de crecimiento de 5.26).

Otro tratamiento de crecimiento máximo se observo cuando se mantuvo la concentración de carbono del medio original (1.05 moles) y se disminuyó la concentración de nitrógeno de 60 a 30 mmoles (índice de crecimiento de 5.86). Estos resultados confirman que la cantidad de nitrógeno adicionada en el medio MS original, esta en exceso de los requerimientos nutricionales de las células de chigol, hecho que también habia sido observado durante su cinética de crecimiento ( fig. 7 ), donde las células asimilaron solamente el 50 % del nitrógeno inicial del medio MS (60 mmoles). Además se observó, que por encima de 40 mM hay un efecto represivo del nitrógeno en el crecimiento celular.

Calva (1988), trabajando con esta misma especie a nivel de fermentador de dos litros, ha comprobado lo anterior y ha establecido que las células de chigol son capaces de crecer en el medio MS con 12 mmoles de nitrógeno total.

Por lo que respecta a la producción de capsaicinoides (figura 10), se observa en la superficie de respuesta, que la producción de capsaicinoides presentó dos puntos máximos; uno

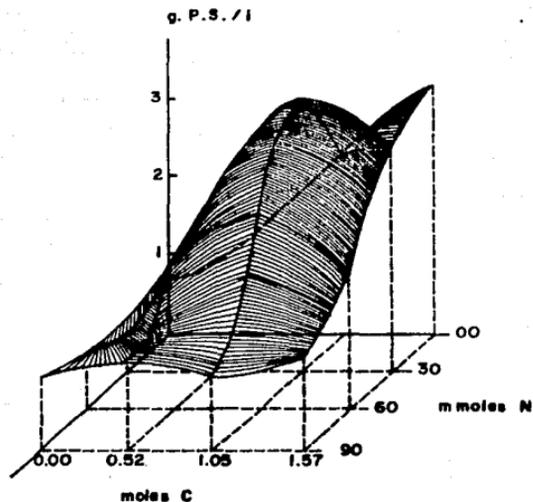


Fig. 9 Efecto de la concentración inicial de Carbono y Nitrógeno del medio MS sobre el crecimiento de células en suspensión de C. annum var. glabriusculum/aviculare.

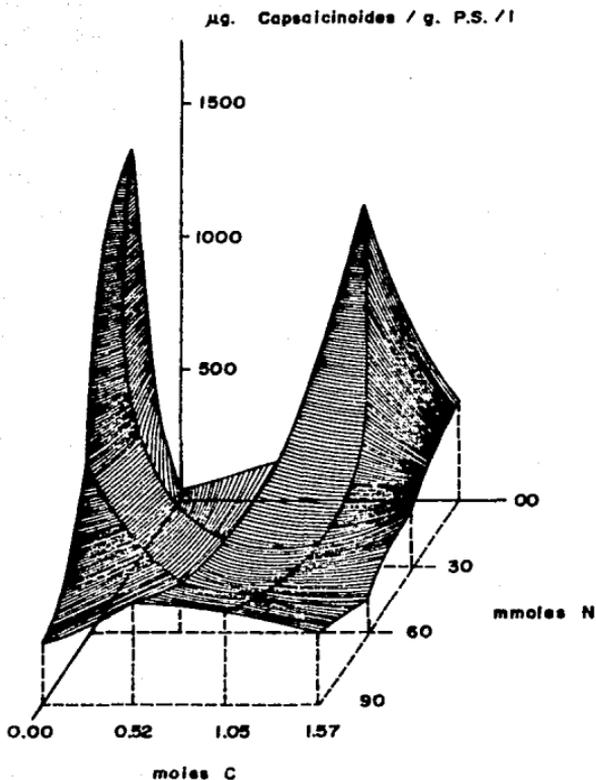


Fig. 10 Efecto de la concentración inicial de Carbono y Nitrógeno del medio MS, sobre la producción de Capsaicinoides por células en suspensión de Capsicum annuum var. glabriusculum/gyiculare.

cuando se eliminó el carbono del medio de cultivo y se redujo a 30 mmoles el nitrógeno, y el otro cuando el nitrógeno se eliminó del medio y se mantuvo la concentración original del medio MS en 1.05 moles de carbono.

Relacionando la gráfica de crecimiento celular con la producción de capsaicinoides (figura 9 y 10 respectivamente), se observa en algunos casos puede establecerse una posible relación inversa, ya que las concentraciones de carbono-nitrógeno en las que se obtuvo mayor crecimiento, no se presentó la mayor producción de capsaicinoides, como en la concentración de 30 mmoles de nitrógeno y 1.05 moles de carbono, la cual tuvo un índice de crecimiento de 5.8 y una producción de solamente 82.5 µg Caps/g P.S./l, contrastando con la observada con 30 mmoles de nitrógeno y eliminando el carbono, cuyos resultados fueron: un índice de crecimiento de 0.36 y producción de 1693.4 µg Caps/g P.S./l.

Por otro lado, analizando todos los tratamientos con 90 mM de nitrógeno, observamos que son los puntos en los que se obtuvieron los menores crecimientos celulares y producciones de capsaicinoides, ésto nos indica que hay un efecto inhibitorio en las células por la cantidad de nitrógeno presente, que está afectando tanto el crecimiento de las células, así como la producción de capsaicinoides; efecto similar al observado por Wescott y Henshaw (1976), en la producción de fenoles por cultivos de Acer pseudoplatanus al incrementar al doble la cantidad de nitrógeno del medio.

La producción de capsaicinoides también se incrementó, cuando se eliminó el carbono y se redujo el nitrógeno a la mitad

de la concentración del medio MS original (30 mmoles), tal como había sido propuesto previamente por Yeoman y col., en 1980, para el cultivo de tejido caloso de Capsicum frutescens.

El patrón de producción de capsaicinoides obtenido en la prueba anterior se presenta en la figura 11. Como se observa, se encontraron como únicos productos a la capsaicina y la dihidrocapsaicina, existiendo un predominio de cantidad de la dihidrocapsaicina sobre la capsaicina, con la excepción de los siguientes tratamientos: a) eliminando la fuente de nitrógeno con 1.0 y 1.5 moles de carbono, b) eliminando la fuente de carbono con 30 mmoles de nitrógeno y c) 90 mmoles de nitrógeno con 0.5 y 1.0 moles de carbono, en los que había más capsaicina o casi en igual cantidad de capsaicina y de dihidrocapsaicina.

Al hacer las variaciones de carbono y nitrógeno del medio original, se obtuvieron diferentes relaciones de carbono/nitrógeno (C/N), las cuales se graficaron contra la máxima productividad específica de capsaicinoides. Los resultados se muestran en la figura 12. Se observó que la tendencia general, fué de una mayor producción de capsaicinoides conforme disminuyó la relación C/N a valores muy cercanos a 0. Sin embargo, como se puede ver en la misma figura, para la relación C/N de 17.5 se obtuvieron tres valores distintos de producción de capsaicinoides, con diferentes concentraciones absolutas de carbono y nitrógeno.

Los resultados anteriores sugieren que además del posible efecto de la relación C/N es importante la cantidad absoluta de

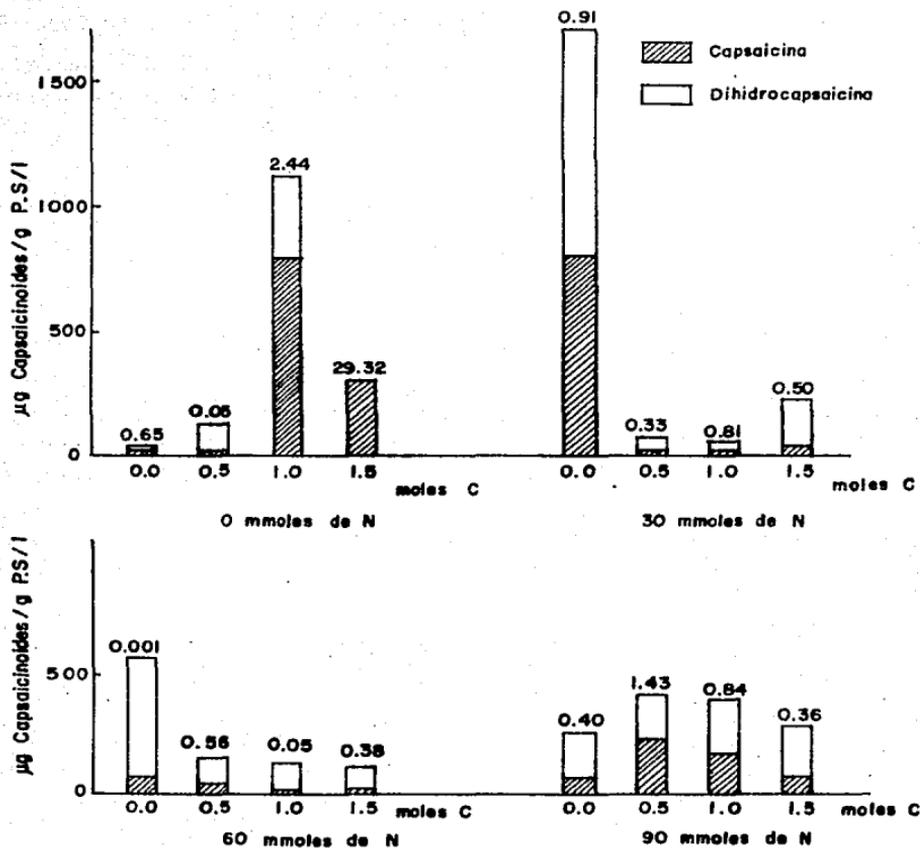


Fig. 11 Efecto de la concentración inicial de carbono y nitrógeno, sobre el patrón de producción de capsaicinoides por células de *C. annuum* var. *glabriusculum* / *aviculare* ( los números sobre las barras indican la relación Capsaicina / Dihidrocapsaicina ).

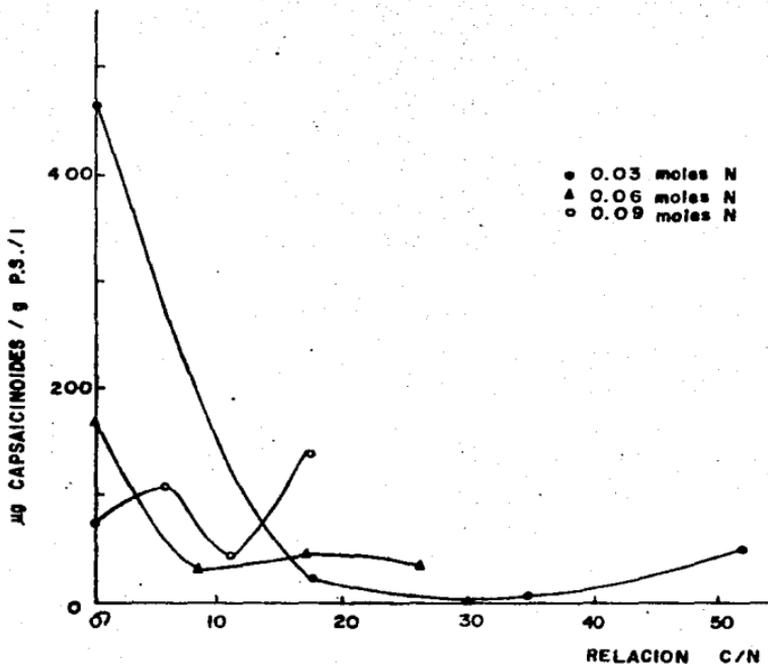


Fig.12 Relación de la máxima productividad de capsaicinoides con diferentes relaciones C/N, variando la concentraciones de carbono en 0.5, 1.0 y 1.5 moles y utilizando células en suspensión de Capsicum annuum var. glabriusculum/aviculare.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

cada nutriente en el medio de cultivo, para tener una mayor producción de capsaicinoides, comportamiento similar al observado en la producción de alcaloides por células de Cinchona ledgeriana (Wijnsma y col., 1986).

Tomando en cuenta los resultados anteriores, para efectuar las variaciones de la concentración de fósforo del medio MS y ver su efecto sobre el crecimiento celular y la producción de capsaicinoides, se seleccionaron los siguientes tratamientos:

- a) Las concentraciones de carbono y nitrógeno que presentaron mayor producción de capsaicinoides:
  - a.1) con 1.5 moles de carbono y sin adición de nitrógeno.
  - a.2) sin adición de carbono y 30 mmoles de nitrógeno.
- b) La concentración de máximo crecimiento, con 1.05 moles de carbono y 30 mmoles de nitrógeno.
- c) La concentración original del medio MS, con 1.05 moles de carbono y 60 mmoles de nitrógeno.

#### 5.7.EFECTO DE LA CONCENTRACION DE FOSFORO

En microorganismos se ha establecido que muchos metabolitos secundarios no son sintetizados cuando la concentración de fósforo es óptima para el crecimiento (Vining, 1986). Así mismo en cultivos de células vegetales, se ha demostrado que en ausencia de éste nutriente, existe una respuesta favorable de la célula, para la producción de metabolitos secundarios (Rokem y Goldberg, 1985).

Considerando lo anterior, en el presente trabajo se varió la concentración del fósforo inicial del medio de cultivo,

manteniendo concentraciones de carbono y nitrógeno con las que mejores resultados se obtuvieron para el crecimiento celular y de producción de capsaicinoides. Los resultados obtenidos para el crecimiento celular son presentados en la figura 13 A-B.

Como se muestra en la figura 13A, el crecimiento fué bajo cuando el nitrógeno se eliminó del medio de cultivo, para todas las variaciones de fósforo que se probaron, lo mismo se observó cuando el carbono fué eliminado completamente del medio (figura 13B).

Por otra parte, cuando la concentración de nitrógeno se redujo a 30 mmoles, la máxima biomasa se obtuvo con 7.4 mmoles de fósforo, que es la concentración original del medio de cultivo (figura 13A), en tanto que con 60 mmoles de nitrógeno se obtuvo el máximo crecimiento con 3.7 mmoles de fósforo.

Contrastando los resultados de la figura 9, con los obtenidos en éste experimento (figura 13A-B), se observa que el máximo crecimiento de las células se presentó en ambos casos con 1.5 moles de carbono y 30 mmoles de nitrógeno (mitad del medio MS) y 7.4 mmoles de fósforo (concentración original del medio MS), pero además del punto máximo anterior, se observó otro que corresponde a una disminución de un 50 % del fósforo del medio MS y manteniendo la concentración de carbono y nitrógeno del medio MS original.

Cuando se eliminó el fósforo del medio, con los cuatro tratamientos de carbono y nitrógeno probados (figura 13A-B), se observó un crecimiento mínimo, lo cual indica que el fósforo es indispensable para el crecimiento de las células de chigol. Resultados similares a los que han sido reportados para células

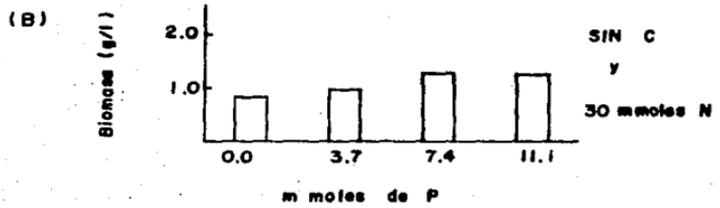
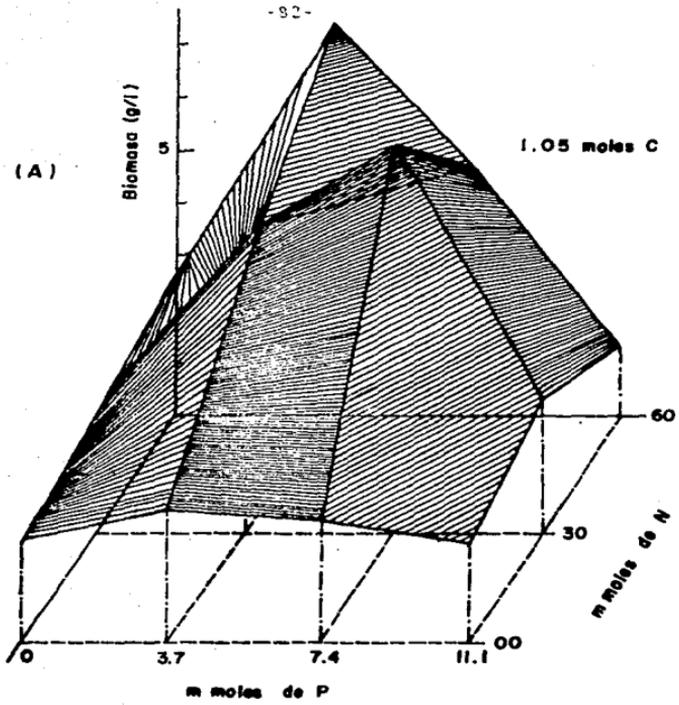


Fig. 13 Efecto de la concentración inicial de fósforo (P) del medio MS, sobre el crecimiento de células en suspensión de *C. annum* var. *glabriusculum* / *aviculare*.  
A. Con 1.05 moles de C y diferentes concentraciones de N  
B. Sin C y 30 mmoles de N.

de Catharanthus roseus (Majerus y Pereilleux, 1986).

Los resultados de producción de capsaicinoides son presentados en la figura 14A-B. En la figura 14A se presenta la superficie de respuesta para la concentración de carbono de 1.05 moles, en ella las máximas producciones de capsaicinoides se obtienen cuando el nitrógeno, como el fósforo se eliminaron del medio. Manteniendo el medio de cultivo sin fósforo se observó una disminución de la producción conforme el nitrógeno se aumentó, más sin embargo, no se observo un cambio tan notorio en la biomasa obtenida de dichos tratamientos (fig 13A). Estos resultados indican que durante la primera resiembra de las células de chile chigol, en el medio MS reducido a 30 mmoles de nitrógeno sin carbono y sin fósforo, la producción de capsaicinoides durante ésta prueba se incrementó de 0.11 µg Caps/g P.S./l (medio MS original, figura 14A-B), hasta 66.3 µg Caps/g P.S./l, que representó un aumento de 602 veces.

En la literatura se reportan casos que proponen el uso de dos medios de cultivo : uno para el crecimiento de las células y otro para la producción de metabolitos secundarios (Mantell y Smith, 1983a). Los resultados obtenidos en este trabajo, plantean como posible alternativa para la producción de Capsaicinoides el uso de dos medios: el primero de crecimiento celular, en el cual puede usarse el medio MS con 1.05 moles de carbono, 30 mmoles de nitrógeno y 7.4 mmoles de fósforo, o el mismo medio pero con 1.05 moles de carbono, 60 mmoles de nitrógeno y 3.7 mmoles de fósforo. Y otro para la producción de Capsaicinoides, donde se utilizaría el medio MS con 30 mmoles de nitrógeno, pero sin

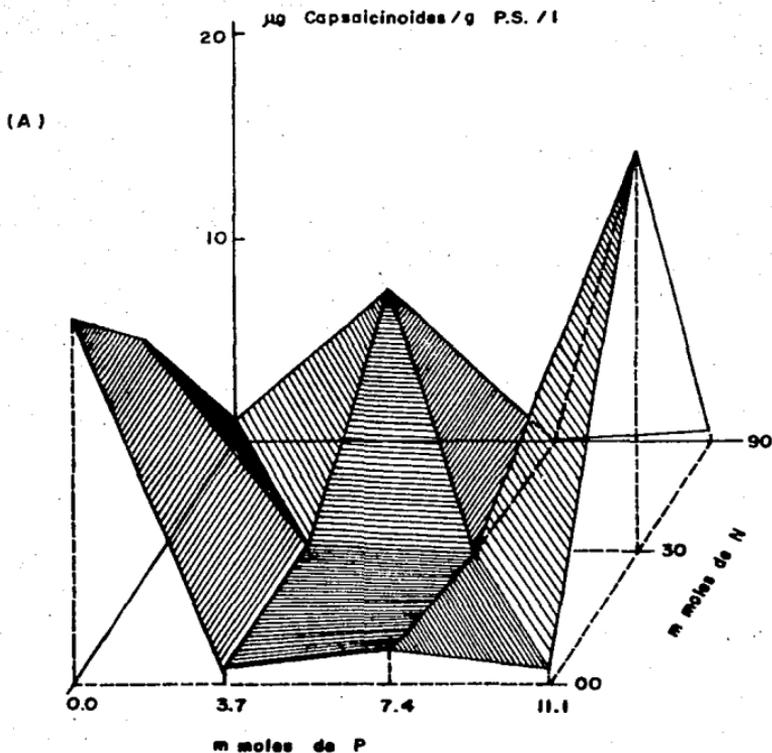


Fig. 14.A Efecto de la variación de la concentración inicial de fósforo y de nitrógeno del medio de cultivo MS, en la producción de Capsaicinoides por células en suspensión de Capsicum annuum var. glabriusculum / quiculare .

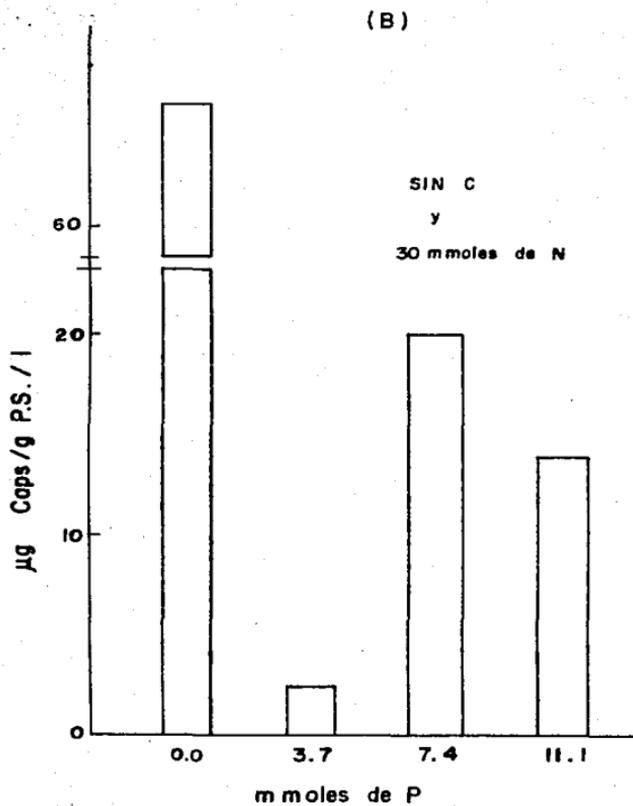


Fig. 14.B.

carbónico ni fósforo, en la primera resiembra.

Del total de capsaicinoides presentados en la figura 14A-B, la capsaicina fue la que predominó en un 95 % y solo se detectaron en algunos tratamientos en mínimas cantidades a la nordihidrocapsaicina y a la homodihidrocapsaicina.

#### 5.8. EFECTO DEL pH

Los medios para cultivo de células vegetales son preparados con un pH inicial de 5 a 6. El componente capaz de amortiguar los cambios de pH en este rango es el fosfato. Durante el transcurso del crecimiento de las células en el medio, el pH del medio cambia; así este puede llegar a valores menores a 4 o elevarse a valores por encima de 7 (Hahnbrock y Kuhlén, 1972; Martín y Rose, 1976). Tales cambios pueden tener un efecto en el metabolismo de las células.

Como en la literatura consultada existe muy poca información sobre el efecto del pH en la producción de metabolitos secundarios, se decidió probar el efecto del pH (4.7, 5.7 y 6.7) sobre el crecimiento de las células de chigol y en su producción de capsaicinoides.

Los resultados obtenidos son mostrados en la figura 15, donde se observó que a pH de 5.7 y 6.7 las células presentaron el mayor crecimiento celular (15.5 g biomasa/l), en tanto, que a pH de 4.7 se obtuvo un menor crecimiento celular (10.7 g biomasa/l).

Analizando la producción de capsaicinoides, se obtuvo la mayor producción (4.22 µg Caps/g/l) a un pH de 5.7, observándose valores de producción menores a 1 µg Caps/g/l para pH's de 4.7 y 6.7. Lo anterior nos indica, la importancia del pH inicial del

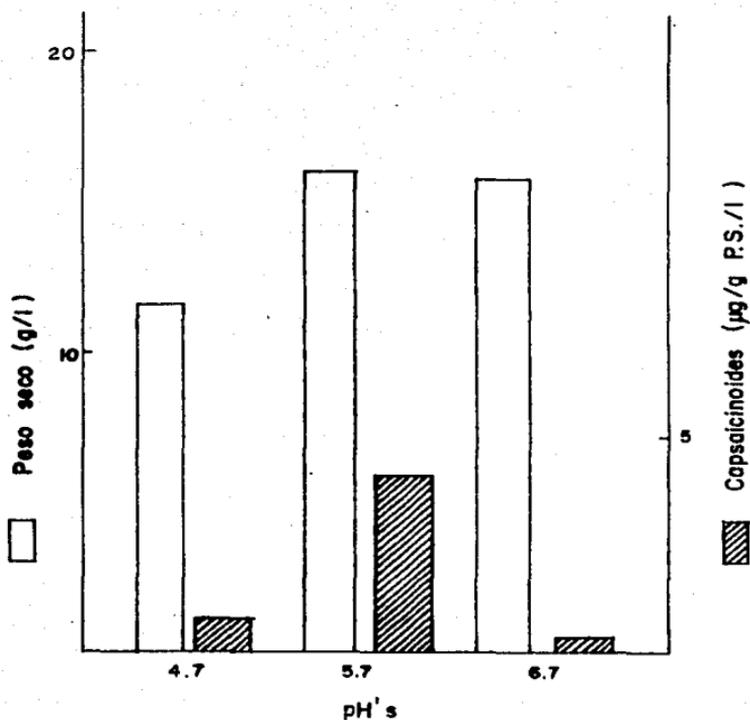


Fig. 15 Efecto de diferentes pH's iniciales del medio MS, en el crecimiento y producción de capsaicinoides, en células en suspensión de C. annuum var. glabriusculum / aviculare.

medio en la producción de metabolitos secundarios. Para la producción de capsaicinoides con las células de chigol, una diferencia de una unidad influyó notablemente.

#### 5.9. VARIABILIDAD DE LOS CULTIVOS

Uno de los problemas que se presentaron a lo largo de la investigación, fué la variabilidad de los cultivos tanto en su crecimiento, como en la producción de capsaicinoides. En el cuadro 5, se presentan los valores de índice de crecimiento y de producción de capsaicinoides para cinco cultivos, los valores fueron tomados de los diferentes experimentos en donde se utilizó el medio MS original, realizados a lo largo del trabajo. Como se observa en dicho cuadro, el índice de crecimiento en base al peso seco, varió desde 5.8 hasta 24.7, en tanto la producción de capsaicinoides lo fué de 0.11  $\mu\text{g}/\text{g}/\text{l}$  a 56.3  $\mu\text{g}/\text{g}/\text{l}$ .

La variabilidad observada en las células de chigol, es un problema en común en el Cultivo de Células Vegetales, que se ha presentado aún al trabajar con líneas celulares (variabilidad somaclonal). Como en el caso de las líneas celulares de Capsicum frutescens, que mostraron en el transcurso de sus subcultivos diferencias en su morfología, crecimiento, contenido de clorofilas y en su producción de capsaicinoides (Holden y col., 1986), así como en las líneas celulares de Thalictrum minus, productoras de berberina (Bariaud - Fontanel y Tabata, 1988).

En los cultivos de chigol, se desconoce la causa de la variación, sin embargo, probablemente pudiera deberse como lo supone Morris en 1986b, para los cultivos en suspensión de

CULTIVO	PRODUCCION DE CAPS µg / g p.s. / l	INDICE DE CRECIMIENTO
CULTIVO 1 <sup>a</sup>	20.52	24.7
CULTIVO 2 <sup>b</sup>	56.30	5.8
CULTIVO 3 <sup>c</sup>	7.67	6.2
CULTIVO 4 <sup>d</sup>	0.11	6.6
CULTIVO 5 <sup>e</sup>	4.22	16.1

- a. Tomado de la figura 7
- b. Tomado de la figura 10
- c. Tomado de la figura 8
- d. Tomado de la figura 14
- e. Tomado de la figura 15

Cuadro 5. Variabilidad en cuanto a crecimiento celular (índice de crecimiento) y producción de capsaicinoides, de los cultivos de chigol (C. annum var. giabriusculum/aviculare) durante 8 meses de subcultivos.

Catharanthus roseus, a factores como : la variabilidad somaclonal, la densidad de inóculo usado en las resiembras, la variación de los períodos de subcultivo y a las variaciones inevitables de la temperatura.

## VI. CONCLUSIONES

\* Las semillas de chile "Chigol" tuvieron un porcentaje bajo de germinación (20 %), debido a factores inherentes a la cosecha de los frutos y fué necesario para su germinación remojarlas en agua durante 24 horas.

\* El medio de cultivo más adecuado para la inducción, crecimiento y friabilidad de tejido caloso, a partir de explantes de hipocotilos de chile "Chigol", fue el MS suplementado con  $9.0 \mu\text{M}$  de 2,4-D.

\* Las células de chigol cultivadas en medio MSM9 en cultivo semisólido, tuvieron un tiempo de duplicación de 11.72 días, presentando una producción máxima de caps de 1.5 a 1.7 mg de /g P.S. En tanto que en el mismo medio, pero en cultivo en suspensión su tiempo de duplicación fué de 4.81 días, con su producción máxima de caps de 58  $\mu\text{g/g}$  de p.s. /l. Sin embargo, a lo largo de las cinéticas, dicha producción no fué un proceso continuo, ésta se presentó interrumpidamente con incremento y disminución en los caps que no estuvieron relacionada de una manera clara con el crecimiento celular.

\* El orden descendiente de velocidad de consumo, de los principales macronutrientes del medio de cultivo en suspensión, fué el siguiente : fósforo, carbono y nitrógeno, consumidos al finalizar la cinética en 94 %, 89 % y 50 % de la concentración inicial respectivamente.

\* La fuente de carbono que favoreció una mayor producción de caps fue la sacarosa, en tanto que se observó alta producción de biomasa con la glucosa y con la misma sacarosa.

\* Con relaciones C/N cercanas a 0, se favoreció la producción de caps. Sin embargo, para dicha producción es muy importante la cantidad absoluta de ambos nutrientes en el medio de cultivo.

\* El medio MSM9 con el nitrógeno al 50 % (30 mmoles) y carente de carbono y fósforo, puede ser un medio para la producción de capsaicinoides, para el primer subcultivo.

\* El principal capsaicinoide detectado en todos los experimentos fue la capsaicina, que predominó en 95 %.

\* En un intervalo de pH de 4.7 - 6.7 , el valor de pH de 5.7 fue en el que se obtuvo una mayor producción de capsaicinoides.

\* En el transcurso de la investigación se observó inestabilidad y variabilidad de los cultivos celulares, reflejado en la producción de capsaicinoides de las células de chigol en suspensión.

VII. BIBLIOGRAFIA

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.). Cambridge, U.K. : p.224-229.

Ashihara H., T. Horikosi, X. Li, K. Sagishima & Y. U. Yamashita. 1988. Profiles of enzymes involved in glycolysis in Catharanthus roseus cells in batch suspension culture. J. Plant Physiol. 133:38-45.

Balandrin, F. M., A. J. Klocke, S. E. Wurtele & H. Bollinger. 1985. Natural plant chemicals: sources of industrial and medical materials. Sci. 228: 1154-1160.

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

Bariaud-Fontanel, A. & M. Tabata. 1988. Somaclonal variation in the berberine-producing capability of a strain of Thalictrum minus. Plant Cell Rep. 7: 206-209.

Bauch, H. J. & E. Leistner. 1978. Aromatic metabolites in cell suspension cultures of Galium mollugo L. Planta Medica. 33(2): 105-123.

Bedoya, A.G. 1971. Efecto de la edad del fruto en la calidad (% de germinación), de la semilla de Capsicum baccatum var. pendulum (Willd), Eshbaugh (Aji-"Escabeche"). Tesis. Universidad Agraria La Molina, Perú. 48p.

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

Berlin, J. 1986. Secondary products from plant cell cultures. In "Biotechnology. Microbial Products II. Vol. 4." (Rehm, J. and G. Reed, Eds.). Verlagsangabe Wienheim, Germany: p. 629 - 658.

Berlin, J., Ch. Mollenschott & V. Wray. 1988. Triggered efflux of protoberberine alkaloids from cell suspension cultures of Thalictrum rugosum. Biotechnol. Lett. 10(3): 193-198.

Bidwell, R. 1979. Fisiología Vegetal. ed. AGT. México. p.207-244.

Bremer, M. J. 1965. Inorganic forms of nitrogen. In "Method of soil analysis. Chemical and microbiological properties" (Black, C. A., Eds.) Amer. Soc. of Agronomy. Inc. Publishers of Madison Wisconsin. USA. p. 1179-1237.

Calva, C. 1988. Comunicación personal.

Chandler, S. & J. Dodds. 1983. The effect of phosphate, nitrogen and sucrose on the production of phenolics and solasodine in callus cultures of Solanum laciniatum. Plant Cell Rep. 2: 205-208.

Cochran, H. L. 1943. Effect of stage of fruit maturity at time of harvest and method of drying on the germination of pimienta seed. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 43: 229-233.

De-Amato, F. 1978. Chromosome number variation in cultured cells and regenerated plants. In "Frontiers of plant tissue culture" (Thorpe, A, Eds.). International Association for plant tissue culture. Canada: p. 287-295.

De-Ekmankul, W. & E. Ellis. 1984. Rosmarinic acid production and growth characteristics of Anchusa officinalis cell suspension cultures. Planta Medica. 50: 346-350.

De-Ekmankul, W. & E. Ellis. 1985a. Effects of macronutrients on growth and rosmarinic formation in cell suspension cultures of Anchusa officinalis. Plant Cell Rep. 4(2): 46-49.

De-Ekmankul, W & E. Ellis. 1985b. Effects of auxins and cytokinins on growth and rosmarinic formation in cell suspension culture of Anchusa officinalis. Plant Cell Rep. 4(2):50-53.

Dicosmo, F & G. Towers. 1984. Stress and secondary metabolism in cultured plant cells. Recent. Adv. Phytochem. 18 : 97-142.

Dougall, D. K. 1977. Current problems in the regulation of nitrogen metabolism in plant cell cultures. In "Plant tissue culture and its biotechnological application". (Barz, W., E. Reinhard & M. Zenk. Eds. ). Springer -Verlag Berlin, Heidelberg: p. 76-84.

Dubois, M., A. Gilles & F. Smith. 1956. Colorimetric method determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28(3): 350-356.

Fowler, W. 1982a. Substrate utilisation by plant-cell cultures. J. Chem. Tech. Biotechnol. 32: 338-346.

Fowler, W., R. Watson & I. Lyons. 1982b. Substrate utilisation, carbon and nitrogen, by suspension cultured plant cells. Proc. 5th Int. Cong. Plant Tissue Culture: p.225-227.

Fowler, W. 1983. Commercial applications and economic aspects of mass plant cell culture. In "Plant biotechnology" (Mantell S.H. and H. Smith, Eds.). Society for experimental biology. Seminar series 18, Cambridge University Press, U.K.: p. 3-

37.

Fowler, W. & G. Stepan-Sarkissian. 1985. Carbohydrate source, biomass productivity and natural product yield in cell suspension cultures. In "Primary and secondary metabolism of plant cell culture" (Newmann, H., W. Barz & E. Reinhard, Eds.). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg: p. 66-73.

Fossard, R. A. 1976. Tissue culture for plant propagators. The University of New England. Australia. p. 53-94.

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 shikonin derivatives. Plant Cell Rep. 1: 61-63.

Fujita, Y., S. Takahashi & Y. Yamada . 1984. Selection of cell line with high productivity of shikonin derivatives through protoplast of Lithospermum erythrorhizon. Proceeding 3rd European confrens on Biotechnology. Weinheim,Verlag Chemie.1: 161-166.

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

Fujiwake, H., T. Suzuki & K. Iwai. 1982a. Capsaicinoid formation in the protoplast from the placenta of Capsicum fruits. Agric. Biol. Chem. 46(10): 2591-2592.

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

Furuya, T., T. Yashikawa , T. Ishi & K. Kajii. 1983. Regulation of saponin production in callus cultures of Panax ginseng. Planta Medica. 47: 200-204.

Gizard, D. J. 1981. Análisis de semillas y determinación de las posibles causas de anormales en la germinación de una línea de chile serrano : (Capsicum annum L.). Tesis. Tecnológico de Monterrey, México. 72p.

Goodwin, T.W. & E.I.Mercer. 1983. Introduction to plant biochemistry. second edition. Program press.p. 328-361.

Govindarajan, V. S. 1985. Capsicum: production, technology, chemistry and quality. I. History, botany, cultivation and primary processing. CRC. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 22(2): 109

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.

Hahlbrock, K. & E. Kuhlen. 1972. Relationship between growth of parsley and soybean cells in suspension cultures and changes in the conductivity of medium. Planta.108: 271.

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.

Hall, R. D., M. Holden & M. Yeoman . 1987. The accumulation of phenylpropanoid and capsaicinoid in cell cultures and whole fruit of chilli pepper, Capsicum frutescens. Plant Cell Tissue Organ cult.8(2): 163-176.

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.). Cambridge U.K: p. 122-127.

Hugh, J. 1984. Phenylalanine ammonia-lyase; regulation of its induction, and its role in plant development. Phytochem.23(7); 1349-1359.

Innerarity, L., E. Smith & S. Wender . 1972. Indolacetic ac. inhibition of a phenylalanine ammonia-lyase preparation from suspension cultures of wr-132 tobacco. Phytochem.11(1); 83-88.

Iwai, K., R. Lee , M. Kobashi & T. Suzuki . 1977a. Formation of pungent principles in fruits of sweet pepper; Capsicum annuum L.var. grossum during post-harvest ripening under continuous light. Agric. BIOT. Chem.41(10): 1873-1876.

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

Iwai, 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 annum var. annuum Karayatsubusa at different growth stages after flowering. Agric. Biol. Chem. 43(12): 2493-2498.

Jerenitsch, J. 1981. Pungent principle composition in fruits of defined strains of Capsicum. Consequences relating to quality requirements and taxonomic aspects. Sci. Pharm. 49:321.

Kinersley, A.M. & D.K. Dougall. 1981. Increase in anthocianin yield from wild carrot cell cultures by a selection system based on cell aggregate size. Planta. 149: 200- 204.

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

Knobloch, K.H., G. Bast & J. Berlin. 1982. Medium- and light- induced formation of serpentine and anthocyanins in cell suspension cultures of Catharanthus roseus. Phytochem. 21(3): 591-594.

Knobloch, K. H. & 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.

Knobloch, K. , G. Beutnagel & J. Berlin. 1984. Influence of accumulated phosphate on culture growth and formation of cinnamoyl putrescines in medium-induced cell suspension cultures of Nicotiana tabacum. Planta. 153: 582-585.

Kubek, J. & M. Shuler. 1980. The effect of variations in carbon and nitrogen concentrations on phenolics formation in plant cell suspension cultures. J. Natu. Prod. 43(1): 87-96.

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

Leete, E. & M.C. Loudon .1968. Biosynthesis of capsaicin and dihydrocapsaicin in Capsicum frutescens. J. Amer. Chem. Soc. 90: 6837-6841.

Lego, C. 1984. HPLC in the flavor/spice industry. Food Technol. 38(4): 84-87.

Lindberg, O. & L. Ernster . 1957. Determination of organic phosphorus compounds by phosphate analysis. In "Meth. of Biochem. Anal.". Vol. 3. p. 1-19.

Lindsey, K. , M. Yeoman, G. Black & F. Mavituna. 1983a. A novel method for the immobilisation and culture of plant cells. Febs Lett. 155(1): 143-149.

Lindsey, K. & M. Yeoman . 1983b. Novel experimental systems

for studying the production of secondary metabolites by plant tissue cultures. In "Plant Biotechnology" (Mantell S & H. Smith, Eds.) Semin. Serv. Vol. 18. Soc. Exp. Biol. London: p. 39-65.

Lindsey, K. & M. Yeoman. 1983c. The relationship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell cultures. J. Exp. Bot. 34: 1055-1065.

Lindsey, K. & M. Yeoman. 1984a. The synthetic potential of immobilised cells of Capsicum frutescens Mill. cv. annuum. Planta. 162: 495- 501.

Lindsey, K. & M. Yeoman. 1984b. The viability and biosynthetic activity of cells of Capsicum frutescens Mill. cv. annuum. Immobilized in reticulate polyurethane. J. Exp. Bot. 35(160): 1684- 1696.

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

Lindsey, K. 1986. Incorporation of (<sup>14</sup>C) phenylalanine and (<sup>14</sup>C) cinnamic acid into capsaicin in cultured cells of Capsicum frutescens. Phytochem. 25(12): 2793- 2801.

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

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. 180p.

Maga, J. A. 1975. Capsicum. CRC. Crit. Rev. Food Sci. and Nutr. 6: 177-199.

Majerus, F. & A. Pareilleux. 1986. Alkaloid accumulation in Ca-alginate entraped cells of Catharanthus roseus: Using a limiting growth medium. Plant Cell Rep. 5: 302-305.

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

Mantell, S.H., D.W. Pearson, L.P. Hazell & H. Smith. 1983b. The effect of initial phosphate and sucrose levels on nicotine accumulation in batch suspension cultures of Nicotiana tabacum L. Plant Cell Rep. 2: 73-77.

Maretzki, A., M. Thom & L. Nickell. 1974. Utilization and metabolism of carbohydrates in cell and callus cultures. In

"Tissue culture and plant science 1974" (Street, E., eds). Academic press. London and N.Y. p.329-361.

Martin, S. M. & D. Rose. 1976. Growth of plant cell (ipomoea) suspension cultures at controlled pH levels. Can. J. Bot. 54: 1264.

Mavituna, F. & M. Park. 1985. Growth of immobilised plant cells in reticulate polyurethane foam matrices. Biotechnol. Lett. 7(9): 637-640.

Mavituna, F., K. Wilkinson & P. Williams . 1987. A technique for rapid production of plant-cell suspension cultures from callus cultures. In "Plant and animal cells process possibilities" (Webb, C. & F. Mavituna, Eds.) Ellis Howood limited England. Series in Biochemistry and Biotechnology. p. 226-270.

Merillon, M., M. Rideau. & C. Chenieux . 1984. Influence of sucrose on levels of ajmalicine, serpentine, and tryptamine in Catharanthus roseus cells in vitro. Planta Medica. 50: 497-501.

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

Monserreusorn, Y., S. Kongsamut & D. Pezalla . 1982. capsaicin-A literature survey. CRC. Crit. Rev. Toxicol. 10: 321-339.

Morales, R. A. 1981. Determinación cuantitativa de ác. ascorbico y capsaicina en 20 variedades de chile. Tesis UNAM. Fac. Quím. 35p.

Morris, P., A. Scragg, N. Smart & A. Stafford . 1985. Secondary product formation by cell suspension cultures. In "Plant cell culture; a practical approach" (Dixon, R, Eds.). Oxford. IRL. Press: p.127-167.

Morris, P. 1986a. Long term stability of alkaloid productivity in cell suspension cultures of Catharanthus roseus. In "Secondary metabolism in plant culture" (Morris, P., A. Scragg & M. Fowler, Eds.). Cambridge University Press. U.K.: p. 252-257.

Morris, P. 1986b. Regulation of product synthesis in cell cultures of Catharanthus roseus. II. Comparison of production media. Planta Medica. 77(2): 121-126.

Muñoz, F. I. & B. C. Pinto. 1966. Taxonomía y distribución geográfica de los chiles cultivados en México. INIA. (15): 3-23.

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

Okasaki, M., F. Hino, K. Nagasawa & Y. Miura . 1982.

Effects of nutritional factors of scopoletin and scopolin in tobacco tissue cultures. *Agric. Biol. Chem.* 46(3): 601- 607.

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

Ozeki, Y. & A. Komamine . 1985. Changes in activities of enzymes involved in general phenylpropanoid metabolism during the induction and reduction of anthocyanin synthesis in a carrot suspension culture as regulated by 2,4 -D. *Plant Cell Physiol.* 26(5): 903-911.

Phillips, C. G. & J. F. Hubstenberger. 1985. Organogenesis in pepper tissue cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 4: 261-269.

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

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

Quintero, R. 1985. Introducción al programa sobre el desarrollo de la biotecnología en México. En "El cultivo de tejidos vegetales en México" (Robert, M. L. y V. M. Loyola, Eds.) CICY y CONACYT. México. p. 21.

Reinert, J. Y. Bajaj & B. Zbell. 1977. Aspects of organization-organogenesis and embryogenesis, cytodifferentiation. In "Plant tissue and cell culture" (Strett, E, Eds.) University of California Press. Botanical Monographs. 2: p. 338-335.

Robert, M.L & V.M. Loyola. 1985. El cultivo de tejidos vegetales en México. CICY y CONACYT. México. 167 p.

Robins, J., J. Payne & M. Rhodes . 1986. Cell suspension cultures of *Cinchona ledgeriana*; I. Growth and alkaloid production. *Planta Medica.* 77(3): 120-126.

Rokem, S. & G. Goldberg. 1985. Secondary metabolites from plant cell suspension cultures: Methods and yield production. In "Adv. Biotechnol. Proces." (Mizrahi, A. and L. Van Wezel, Eds.) 4: 241-474.

Sahai, O.P. & L.M. Shuler. 1987. Environmental parameters influencing phenolics production by batch cultures of *Nicotiana tabacum*. *Biotechnol. and Bioeng.* 26: 111-120.

Scragg, H. 1986. The economics of mass cell culture. In "Secondary metabolism in plant cell culture" (Morris, P., H.

- Scragg , A. Stafford & M. Fowler, Eds.) Cambridge.U.K. p.202-207.
- Schenk, R. U. & A. C. Hildebrandt . 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can. J. Bot. 50: 199-204.
- Shuler, M. 1981. Production of secondary metabolites from plant cell tissue: problems and prospects. Ann. N.Y. Acad. Sci. 369: 65-80.
- Smith, I., A. Quesnel , N. Smart , M. Misawa & G. Kurz . 1987. The development of a single-stage growth and indole alkaloid production medium for Catharanthus roseus (L) G. Don. suspension cultures. Enzyme Microb. Technol. 9: 466-488.
- Stafford, A., P. Morris & M. Fowler . 1986. Plant cell biotechnology; a perspective. Enzyme Microb. Technol. 8: 578-586.
- Stanzel, M., R. Sjolund & E. Komor. 1988. Transport of glucose, fructose and sucrose by Streptanthus tortuosus suspension cells. Planta. 174 : 201-209.
- Strett, E. 1977. Cell (suspension) cultures techniques. In "Plant tissue and cell culture" (Strett, E, Eds.) University of California Press. Botanical monographs. Vol. II. p. 161-190.
- Sunderland, N. 1977. Nuclear cytology. In "Plant tissue and cell culture" (Strett, E, Eds.). University of California Press. Botanical monographs. Vol. II. p. 161-190.
- Suzuki, T., H. Fujiwake & K. Iwai . 1980. Intracellular localization of capsaicin and its analogues, capsaicinoid, in Capsicum fruit I. Microscopic investigation of the placenta of Capsicum annuum var. annuum cv. annuum Karayatsubusa. Plant Cell Physiol. 21(5): 839-853.
- Suzuki, T., T. Kawada & K. Iwai . 1981a. Biosynthesis of acyl moieties of capsaicin and its analogues from valine and leucine in Capsicum fruits. Plant and Cell Physiol. 22(1): 23-32.
- Suzuki, T., T. Kawada & K. Iwai . 1981b. The precursors affecting the composition of capsaicin and its analogues in the fruits of Capsicum annuum var. annuum cv. Karayatsubusa. Agric. Biol. Chem. 45(2): 535-537.
- Suzuki, T. & K. Iwai . 1984a. Constituents of red pepper species; chemistry, biochemistry, pharmacology and food science of the pungent principle of Capsicum species. In "The alkaloids" (Brossi, A, Eds.). Academic Press. Orlando . Fla. 23: 227-300.
- Suzuki, H., T. Matsumoto & Y. Mikami . 1984b. Effects of nutritional factors on the formation of anthraquinones by Rubia cordifolia plant cell in suspension culture. Agric. Biol. Chem. 48(3): 603-610.

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

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

Todd, P., M. Bensinger & T. Biftu. 1975. TLC Screening techniques for the qualitative determination of natural and synthetic capsaicinoids. J. Chromatogr. Sci. 13: 577-579.

Tood, P. H., M.G. Bensinger & T. Biftu. 1977. Determination of pungency due to capsaicin by gas-liquid chromatography. J. Food Sci. 42: 660.

Thom, M., A. Marezki, E. Komor & S. Sakai. 1981. Nutrient uptake and accumulation by sugarcane cell cultures in relation to the growth cycle. Plant Cell Tissue Organ Cult. 1: 3-14.

Thorpe, A., P. Maier & S. Hasegawa. 1971. Phenylalanine ammonia-lyase activity in citrus fruit tissue cultured in vitro. Phytochem. 10: 711-718.

Ukaji, T. & H. Ashihara. 1986. Changes in levels of cellular constituents in suspension culture of Catharanthus roseus associated with inorganic phosphate depletion. Z. Naturforsch. 41c: 1045-1051.

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

Vining, C. 1986. Secondary Metabolism. In "Biotechnology. Microbial Products II. Vol. 4." (Rehm, J. & G. Reed, Eds.). Verlagsgangabe Weinheim Germany. p. 20-38.

Virus, R. & F. Gebhart. 1979. Pharmacologic actions of capsaicin: apparent involvement of substance P and serotonin. Life Sci. 25(15): 1273-1284.

Westcott, R. & G. Henshaw. 1976. Phenolic synthesis and phenylalanine ammonia-lyase activity in suspension cultures of Acer pseudoplatanus L. Planta. 131: 67-73.

Wiermann, R. 1981. Secondary plant products and cell tissue differentiation. In "The biochemistry of plants" (Conn, E.E., Eds.). Academic Press Inc. USA. 7: p. 85-113.

Wijnsma, R., R. Verpoorte, A. Harkes, V. Van, H. Ten & S. Baerhein. 1986. The influence of initial sucrose and nitrate

concentration on the growth of Cinchona ledgeriana cell suspension cultures and the production of alkaloids and anthraquinones. Plant Cell Tissue Organ Cult. 7: 21- 29.

Wylegalla, C., R. Meyer & K. Wagner. 1985. Nucleotide pools in suspension cultured cells of Datura innoxia. Planta. 166: 446-451.

Yamada, Y., F. Sato & M. Hagimori. 1978. Photoautotrophism in green cultured cells. In "Frontiers of plant tissue culture". (Thorpe, A., Eds.). Int. Assoc. For plant tissue culture. Canada. p. 453- 462.

Yamakawa, T., S. Kato, K. Ishida, T. Kodama & Y. Minoda. 1983. Production of anthocyanins by Vitis cells in suspension culture. Agric. Biol. Chem. 47(10): 2185-2191.

Yamamoto, O. & Yamada. 1986. Production of reserpine and its optimization in cultured Rauwolfia serpentina benth cells. Plant Cell Rep. 5: 50-53.

Yeoman, M. & A. Macleod. 1977. Tissue (Callus) culture-techniques. In "Plant tissue and cell culture" (Strett, E. Eds.). University of California Press. Botanical monographs. Vol II. 31-59.

Yeoman, M., M. Miedzybrodzka, K. Lidsey & Mc. Lauchlan. 1980. The synthetic potential of cultured plant cells. In "Plant cell cultures; Results and Perspectives" (Ciferri, O. & B. Persi, Eds.). Elsevier. Amsterdam. New York. p. 327-343.

Zamski, E., O. Shoham, D. Palevitch & A. Levy. 1987. Ultrastructure of capsaicinoid secreting in pungent and nonpungent red pepper (Capsicum annuum L.) cultivars. Bot Gaz. 148: 1-6.

Zenk, H., H. Shagi-El & U. Scholte. 1975. Anthraquinone production by suspension cultures of Morinda citrifolia. Planta Medica. Supplement: 79-101.

Zenk, H.M., H. Shagi-El, H. Arens, J. Stockigt, W. Weiler & D. Deus. 1977. Formation of the alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension cultures of Catharanthus roseus. In "Plant Tissue culture and biotechnological applications" (Barz, W. E. Reinhardt) ed. p. 1-11.