



**Universidad Nacional Autónoma de México**  
**Facultad de Estudios Superiores Zaragoza**

---

**Evaluación de cuatro fuentes de carbono para la  
Obtención de cultivos celulares prolíferos de  
Acícula y tallos de *Taxus globosa***

**Tesis**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**Licenciado en biología**

PRESENTA:

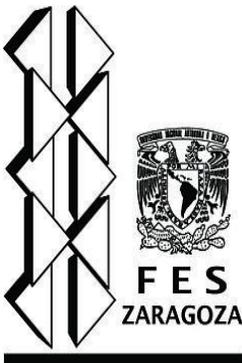
**Barrios Vidal Jorge Fernando**

DIRECTORA DE TESIS:

**Ing. Ma. Teresa de Jesús Olivera Flores**

ASESORA INTERNA:

**M.C. Bárbara Susana Luna Rosales**



Ciudad de México

2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## Índice temático.

Número del cuadro	Nombre del cuadro	Pág.
	<b>Resumen</b>	<b>7</b>
<b>I.</b>	<b>Introducción</b>	<b>8</b>
<b>II.</b>	<b>Marco teórico</b>	<b>11</b>
2.1	Clasificación y descripción botánica de <i>Taxus globosa</i>	11
2.2	Centro de origen y distribución geográfica	13
2.3	Usos de <i>Taxus globosa</i> e importancia farmacéutica	14
2.4	Aspectos generales del cultivo de tejidos vegetales	15
2.5	Cultivo de callos y células en suspensión	20
2.6	Evaluación de la proliferación de cultivos celulares	21
2.7	Cultivos celulares de <i>Taxus globosa</i>	22
2.8	Función de la fuente de carbono en cultivo de tejidos vegetales	25
2.9	Cultivos celulares con diferentes fuentes carbono en el género <i>Taxus</i>	26
2.10	Factores involucrados en la proliferación y la producción de taxanos	29
<b>III.</b>	<b>Justificación</b>	<b>32</b>
<b>IV.</b>	<b>Hipótesis</b>	<b>32</b>
<b>V.</b>	<b>Objetivos</b>	<b>33</b>
<b>VI.</b>	<b>Materiales y método</b>	<b>33</b>
6.1	Ruta crítica	34
6.2	Material biológico	35
6.3	Medio de cultivo	35
6.4	Inducción de callos	37
6.5	Mantenimiento	39
6.6	Proliferación de callos	39
6.7	Establecimiento de células en suspensión	41
<b>VII.</b>	<b>Resultados</b>	<b>43</b>
7.1	Mantenimiento de la planta donadora	43
7.2	Desinfección y siembra de los explantes	43
7.3	Mantenimiento	50
7.4	Oxidación	51
7.5	Presencia de callo verde	52
7.6	Proliferación de callos	55
7.7	Establecimiento de células en suspensión	64
<b>VIII</b>	<b>Discusión</b>	<b>69</b>
8.1	Desinfección e inducción de los explantes	71
8.2	Mantenimiento de los callos	73
8.3	Proliferación de los callos	75
8.4	Suspensión celular	77
<b>IX</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>78</b>
<b>X</b>	<b>Perspectivas</b>	<b>80</b>
<b>XI</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>81</b>
<b>XII</b>	<b>Anexos.</b>	<b>86</b>

## Listado de cuadros

Número del cuadro	Nombre del cuadro
1	Clasificación Botánica de <i>Taxus globosa</i>
2	Componentes del medio de cultivo para Cultivo <i>in vitro</i> de plantas
3	Reportes de cultivo celulares del género <i>Taxus</i>
4	Reportes de cultivos celulares de <i>Taxus globosa</i>
5	Reportes de cultivos celulares de diferentes especies utilizando diferentes fuentes de carbono
6	Reportes de cultivos celulares del género <i>Taxus</i> con diferentes fuentes de carbono
7.1	Composición del medio de cultivo
7.2	Tipos y concentraciones de fuente carbono en cada etapa.
8	Planificación para el mantenimiento de las plantas donadoras
9	Condiciones utilizadas para la fase de inducción de la etapa 1
10	Condiciones utilizadas en la Etapa 2
11	Condiciones utilizadas en la cinética de crecimiento de la etapa 3
12	Condiciones utilizadas en las células en suspensión para la etapa 4
13	Total de explantes sembrados en la fase de inducción.
14	Comparación de la inducción de callo proveniente de tallo para las tres siembras con prueba Tukey 95%.
15	Comparación de la inducción de callo proveniente de tallo para las tres siembras con prueba Tukey 95%.
16	Comparación de la inducción de callo proveniente de tallo vs callo proveniente de acícula para las tres siembras con prueba Tukey 95%.
17	Comparación de la inducción de callo proveniente de acícula y tallos en diferentes condiciones de luz para las tres siembras con prueba Tukey 95%.
18	Comparación de las cinéticas de crecimiento de diferentes concentraciones de azúcar de callos provenientes de acícula prueba Tukey 95%
19	Comparación de las cinéticas de crecimiento de diferentes concentraciones de azúcar de callos provenientes de tallos prueba Tukey 95%
20	Comparación de las cinéticas de crecimiento de diferentes concentraciones de azúcar de callos provenientes acícula vs callos provenientes de tallos prueba Tukey 95%
21	Comparación de las cinéticas de las suspensiones celulares de peso fresco de callos provenientes de tallos prueba Tukey 95%.
22	Comparación de las cinéticas de las suspensiones celulares de peso seco de callos provenientes de tallos prueba Tukey 95%.
23	Comparación de las cinéticas de las suspensiones celulares de peso fresco de callos provenientes de acícula prueba Tukey 95%
24	Comparación de las cinéticas de las suspensiones celulares de peso seco de callos provenientes de acícula prueba Tukey 95%
25	Comparación de las cinéticas de las suspensiones celulares de peso fresco de callos provenientes de acícula vs callos provenientes de tallo prueba Tukey 95%.
26	Comparación de las cinéticas de las suspensiones celulares de peso seco de callos provenientes de acícula vs callos provenientes de tallo prueba Tukey 95%.

## Listado de figuras

Número de la figura	Nombre
1	Anatomía de <i>Taxus globosa</i>
2	Distribución potencial de <i>Taxus globosa</i> , tomado de contreras 2010
3	Fases de la cinética de crecimiento
4	Ruta experimental seguida en este proyecto
5	Esquema de la ruta de biosíntesis de taxol en <i>Taxus</i> spp. Modificado de: Walker y Croteau (2001).
6	Ruta Experimental seguida en este proyecto
7	Planta madre de <i>Taxus globosa</i>
8	Método de desinfección que fue probado en los explantes antes de la siembra en los medios de cultivo para la inducción de callo
9	Etapa 4 establecimiento de las células en suspensión
10	Desarrollo del árbol durante el programa fitosanitario
11	Gráfico del porcentaje de contaminación registrado en cada una de las siembras
12	Gráfico del número de explantes de tallo con respuesta después de tres meses de la fecha de inducción.
13	Gráfico del número de explantes de acícula con respuesta después de tres meses de la fecha de inducción.
14	Formación del callo a partir del tejido madre visto en el microscopio 10x
15	Callo resultante de que fue obtenida después de la inducción
16	Gráfico de la escala de oxidación y presencia de callos verdes que presento durante el proceso de mantenimiento.
17	Gráfico del registro semestral del porcentaje de oxidación en los callos de tallo.
18	Gráfico del registro semestral del porcentaje de oxidación en los callos de acícula
19	Gráfico del registro mensual del porcentaje de presencia de callos verdes en tallos.

<b>20</b>	Gráfico del registro mensual de la presencia de callos verdes en acícula
<b>21</b>	Vista de los callos de tallo observados en microscopio electrónico 10x.
<b>22</b>	Vista de los callos de tallo observados en microscopio electrónico 10x
<b>23</b>	Gráfico de la cinética de crecimiento en condiciones control
<b>24</b>	Callos de acícula y tallo vistas al microscopio 10x
<b>25</b>	Gráfico de la cinética de crecimiento en tratamientos de glucosa.
<b>26</b>	Gráfico de la cinética de crecimiento en tratamientos de glucosa
<b>27</b>	Callo de acícula sometido a diferentes concentraciones de glucosa
<b>28</b>	Callos de tallo sometido a diferentes concentraciones de glucosa
<b>29</b>	Gráfico de la cinética de crecimiento de tallo sometido a fructosa
<b>30</b>	Gráfico de la cinética de crecimiento de acícula sometido a fructosa
<b>31</b>	Callos acícula sometidos en diferentes concentraciones de
<b>32</b>	Callos tallos sometidos en diferentes concentraciones de fructosa
<b>33</b>	Gráfico de la cinética crecimiento de tallo sometido a maltosa
<b>34</b>	Gráfico de la cinética de crecimiento acícula sometido a maltosa
<b>35</b>	Callos de acícula sometidos a diferentes concentraciones de maltosa
<b>36</b>	Callos de tallo sometidos a diferentes concentraciones de maltosa
<b>37</b>	Cinética de crecimiento de tallo con las concentraciones optimas de azúcar
<b>38</b>	Gráfico de la cinética de crecimiento de acícula con las concentraciones optimas de azúcar
<b>39</b>	Gráfico de la cinética de crecimiento de tallo peso seco
<b>40</b>	Gráfico de la cinética de crecimiento de tallo de peso seco
<b>41</b>	Gráfico de la cinética de crecimiento acícula de peso fresco
<b>42</b>	Gráfico de la cinética de crecimiento de acícula de peso seco

<b>43</b>	Suspensiones celulares con diferentes grados de oxidación en las diferentes explantes y diferentes concentraciones y azúcar.
-----------	--

**Abreviaturas:**

<b>Abreviatura</b>	<b>Nombre</b>
<b>A</b>	Acícula
<b>AIA</b>	Ácido indol acético
<b>AIB</b>	Ácido indol butírico
<b>ANA</b>	Ácido naftalenacético
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico,
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>Ag+</b>	Ion de plata
<b>AG<sub>3</sub></b>	Ácido giberélico
<b>B5</b>	Sales basales Gamborg
<b>BA</b>	Benciladenina
<b>BAP</b>	Bencilaminopurina
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de Carbono
<b>FP</b>	Fotoperiodo
<b>KIN</b>	Kinetina
<b>HCl</b>	Ácido Clorhídrico
<b>MS</b>	Sales Murashige and Skoog
<b>MJ</b>	Metil Jasmonato
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PIC</b>	Picloram
<b>PVP</b>	Polivinilpirrolidona
<b>PPO</b>	Polifeniloxidasas
<b>PO</b>	Peroxidasas
<b>O</b>	Oscuridad
<b>T</b>	Tallo
<b>TXL</b>	Medio líquido para Taxus
<b>TXS</b>	Medio sólido para Taxus
<b>WPM</b>	Medio Woody Plant Medium
<b>2,4-D</b>	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

## **Resumen.**

*Taxus globosa* es un especie rara en estatus de amenazada según la NOM-059-SEMARNAT-2010, esta especie de gimnosperma tiene una gran importancia en la industria farmacéutica ya que de ella se extrae el paclitaxel (fármaco utilizado para tratar diferentes tipos de cáncer y fabricar taxol®) que se produce en los troncos de este arbusto, sin embargo, una alternativa para la obtención de este fármaco es con ayuda del cultivo de tejidos vegetales, produciendo cultivos celulares de acículas y tallos con el fin de extraer el paclitaxel. En este proyecto se probaron diferentes fuentes de carbono para observar su efecto en la inducción, mantenimiento, proliferación de callos y establecimiento de células en suspensión, se utilizó sacarosa 3% como control y fructosa, glucosa y maltosa en tres concentraciones diferentes en cada una para inducir callos a partir de explantes de acícula y tallo. Los resultados obtenidos mostraron una mayor producción de callos provenientes de tallos en condiciones de luz con la sacarosa al 3% que con las acículas. Para el mantenimiento de los callos la sacarosa 3% seguido de la maltosa 3% para ambos cultivos de acícula y tallo fueron los tratamientos en donde no se presentó una mayor oxidación y donde se presentaron una mayor presencia de callos verdes. Se hizo un barrido utilizando fructosa al 6, 8 y 10%, glucosa al 0.5, 1 y 3% y maltosa al 3, 4.5 y 7 %, en donde se observó que las concentraciones bajas potencializan la proliferación celular, sin embargo, el grupo con mejores resultados fue la fructosa al 6% tanto para acícula como para tallo. En las suspensiones celulares con las concentraciones de sacarosa y maltosa al 3% fructosa al 6% y glucosa al 0.5% no se presentó un incremento considerable en cualquiera de los casos, pero se puede observar que existe una tendencia de crecimiento en los cultivos sometidos a fructosa al 6% en acícula y tallo.

## **I. Introducción.**

De acuerdo con Argueta *et al.*, (2012), “La etnobotánica es el campo interdisciplinario que comprende el estudio y la interacción del conocimiento tradicional, significado cultural, manejo, y usos tradicionales, de elementos de la flora y la herbolaria, en este mismo contexto se hace referencia al conocimiento y uso terapéutico adquirido a lo largo del tiempo para el reconocimiento de plantas cuyos componentes activos son utilizados en el tratamiento de enfermedades, así como la receta o las dosis que deben utilizarse”. Sin duda, la etnobotánica es de suma importancia para registrar aquellas plantas que tengan cualidades medicinales y que su estudio permita la elaboración de nuevos fármacos.

Las plantas medicinales han sido un recurso muy importante en la sociedad debido a la variabilidad de actividad biológica que presentan los compuestos activos que algunas plantas pueden presentar en beneficio del hombre. Los principios activos se deben precisamente a los compuestos químicos de algunas plantas que las hacen útiles como medicamento, y pueden encontrarse en todo el individuo o sólo en algunas de sus estructuras (Ocegueda, 2005).

De acuerdo con estadísticas de la OMS, las plantas son utilizadas por el 80% de la población mundial para satisfacer o complementar sus necesidades médicas (Ocegueda, 2005). Sin embargo, esta demanda también puede afectar la diversidad y las comunidades de las plantas que son aprovechadas.

Es por ello por lo que en la actualidad la biotecnología vegetal aplica diversas técnicas de estudio y utiliza herramientas tecnológicas para poder cumplir con las necesidades básicas de la sociedad como; alimentación, medicamentos, cosméticos, entre otros, utilizando alternativas sustentables para el aprovechamiento de las plantas.

Una de estas herramientas biotecnológicas es el cultivo de tejidos vegetales el cual es utilizado en el mejoramiento genético, producción intensiva de plantas, investigación básica y en la producción de metabolitos secundarios como bioactivos de interés, entre otras aplicaciones. Este conjunto de técnicas utiliza diferentes

áreas científicas tales como la biología, bioquímica, fitoquímica, ingeniería genética, entre otras, así como técnicas de la investigación y técnicas ingenieriles. El cultivo de tejidos, órganos y células vegetales consiste en cultivar en medios nutritivos y de forma aséptica partes de raíces, hojas, tallos, flores, polen y óvulos, para la proliferación o la multiplicación de las plantas de una manera rápida, eficaz y barata para su producción y comercialización, además, puede preservar especies amenazadas de plantas de interés económico, científico y cultural.

La reproducción de plantas se obtiene gracias a las diferentes respuestas morfogénicas (embriogénesis somática, organogénesis) y la obtención de cultivos celulares también se obtienen gracias a la respuesta de los explantes para lograr callogénesis, proliferación de células y protoplastos; en ambos casos la respuesta morfogénica depende de varios factores intrínsecos de la planta donadora (genotipo, edad, estacionalidad) y factores externos (medio de cultivo, condiciones de incubación). Sin duda el medio de cultivo es un factor importante que contiene los reguladores de crecimiento, que son moléculas orgánicas (dando efectos similares a las hormonas) que estimulan a las células y modulan la expresión genética dando lugar a las diferentes respuestas morfogénicas (Hurtado y Merino, 1987; Evans *et al.*, 2003; George, 2008).

El cultivo de tejidos vegetales ha resultado una buena herramienta en el estudio de plantas medicinales, ya que permite tener control sobre varios factores (medios de cultivo, elicitores, biotransformación) y se pueden establecer cultivos de callos o células en suspensión con cierta facilidad y con ello realizar estudios sobre la producción de metabolitos secundarios.

En México existe gran tradición en la utilización de plantas con fines medicinales y hay una gran diversidad de plantas con bioactivos, una de éstas es el tejo mexicano (*Taxus globosa*), que posee propiedades anticancerígenas. Esta especie endémica de México es muy peculiar con respecto a su biología, ecología y uso medicinal. Produce un compuesto activo (metabolito secundario) conocido como paclitaxel (Taxol®), el cual es utilizado como fármaco para el tratamiento del cáncer de mama, pulmón, ovario, próstata y sarcoma de Kaposi relacionado con el SIDA.

Químicamente es un diterpeno polioxigenado que se sintetiza a partir del isopentil difosfato. Se forma del anillo de taxano y cadena lateral derivada de fenilalanina (Barrales *et al.*, 2015).

El Taxol se encontró por primera vez en extractos de la corteza de árboles de *Taxus brevifolia* y actualmente se extrae de otras especies de *Taxus*. *Taxus globosa* es una especie longeva, centenaria, con una distribución puntual y la cual ha sido sobre explotada, lo que ha llevado a que la especie de *Taxus globosa* se encuentre en la NOM-059-SEMARNAT-2010. (Soto *et al.*, 2000 y Shmeluck, 2013). Algunos han reportado que se puede obtener entre 0.0013-0.027 % de taxol en peso seco, a partir de material vegetal *in vivo*.

La extracción de Taxol es laboriosa y poco productiva. El rendimiento en varias muestras de acículas de *Taxus* ha sido muy baja ya que a partir de 1 kg de corteza se logran obtener de 300 a 400 mg de principio activo; en otros casos se ha reportado significativamente menor, conformando un promedio de 100 mg/kg, es decir 0,01% de taxol (100 ppm). Debido a los bajos rendimientos (0.01 a 0.06% de peso seco), se han desarrollado varios intentos para producir toxoides a través de callos o cultivo de células como fuentes alternativas potenciales. El contenido promedio de paclitaxel de tejidos *in vitro* de *Taxus* es de 0.013, 0.050 y 0.200 % de peso seco (Barrales y Ramírez, 2013).

Una de las limitantes en los cultivos celulares de las diferentes especies de *Taxus* es la baja proliferación celular. Por ello es indispensable la obtención de cultivos celulares prolíferos. Se sabe que la fuente de carbono es indispensable para los cultivos *in vitro* de plantas, ya que de ella las plantas pueden suministrarse de energía y cumplir con sus funciones metabólicas, otro beneficio de la fuente de carbono es que potencializa la proliferación de los cultivos celulares y ofrecen una optimización en las condiciones de cultivo.

Es por lo anterior que la presente tesis se planteó como objetivo obtener cultivos de callos y células en suspensión de tallos y acículas de *Taxus globosa* prolíferos probando diferentes fuentes de carbono y concentraciones y con ello generar un protocolo para la obtención de estos cultivos.

## II. Marco teórico

### 2.1 Clasificación y descripción botánica de *Taxus globosa*

*Taxus globosa* es una gimnosperma perteneciente a la familia Taxaceae, es comúnmente conocida con nombres como: Tejo mexicano, Árbol de la muerte, Romerillo o Mexican yew en América del norte (Zavala, 2001); a continuación, se presenta su clasificación botánica (cuadro 1).

Cuadro 1: Clasificación Botánica de <i>Taxus globosa</i>	
<b>Reino:</b>	<u>Plantae</u>
<b>División:</b>	<u>Tracheophyta</u>
<b>Clase:</b>	<u>Equisetopsida</u>
<b>Orden:</b>	<u>Pinales</u>
<b>Familia:</b>	<u>Taxaceae</u>
<b>Género:</b>	<u><i>Taxus</i></u>
<b>Especie:</b>	<b><i>Taxus globosa</i> S.</b>

(Trópicos, 2019).

Árbol bajo o arbusto, de 6 a 18 m de alto, con un tronco erecto de 30 a 50 cm de diámetro, muy ramificado, con las ramas colgantes, de corteza escamosa de color café claro. Las hojas están distribuidas de manera espiral, se presentan de forma aplanadas, lineares a linear-lanceoladas, de 2 a 3.7 cm de largo y de 2 a 3 mm de ancho, con una sola vena media engrosada, de color verde oscuras en el haz, más claras en el envés, con hileras de estomas en el envés. La parte reproductiva se caracteriza por presentar, estróbilos masculinos axilares, ubicados en la parte inferior de las ramas, mientras que los estróbilos femeninos ausentes; pues los óvulos son solitarios, sésiles, ubicados en las axilas de las hojas, rodeados por varias brácteas membranosas. Las semillas son ovoides y sin ala de 5-7 mm de largo por 4 mm de ancho, de color café, cubiertas parcialmente por un arilo carnoso de color rojo (Luna, 2003 y García, 2010).

Los árboles de *T. globosa* tienen un alto crecimiento de diciembre a marzo o de febrero a mayo, según el sitio y las condiciones climáticas; se ha observado que ocurre la polinización durante febrero y marzo. La fructificación ocurre de mayo a agosto en algunas localidades del norte del país o de julio a noviembre en otras del centro. Le toma a la planta cerca de cien años alcanzar dimensiones de diámetro del tronco de 25 cm y una altura 6 a 9 m (Soto *et al.*, 2000)

Se han hecho estudios de las características de las semillas, y ha determinado que presentan variables morfológicas que hacen que se dificulte la germinación de las semillas que ya presentan un embrión subdesarrollado y con ellos un estado de latencia que dificulta la germinación (fig.1). (Ramírez, 2011).

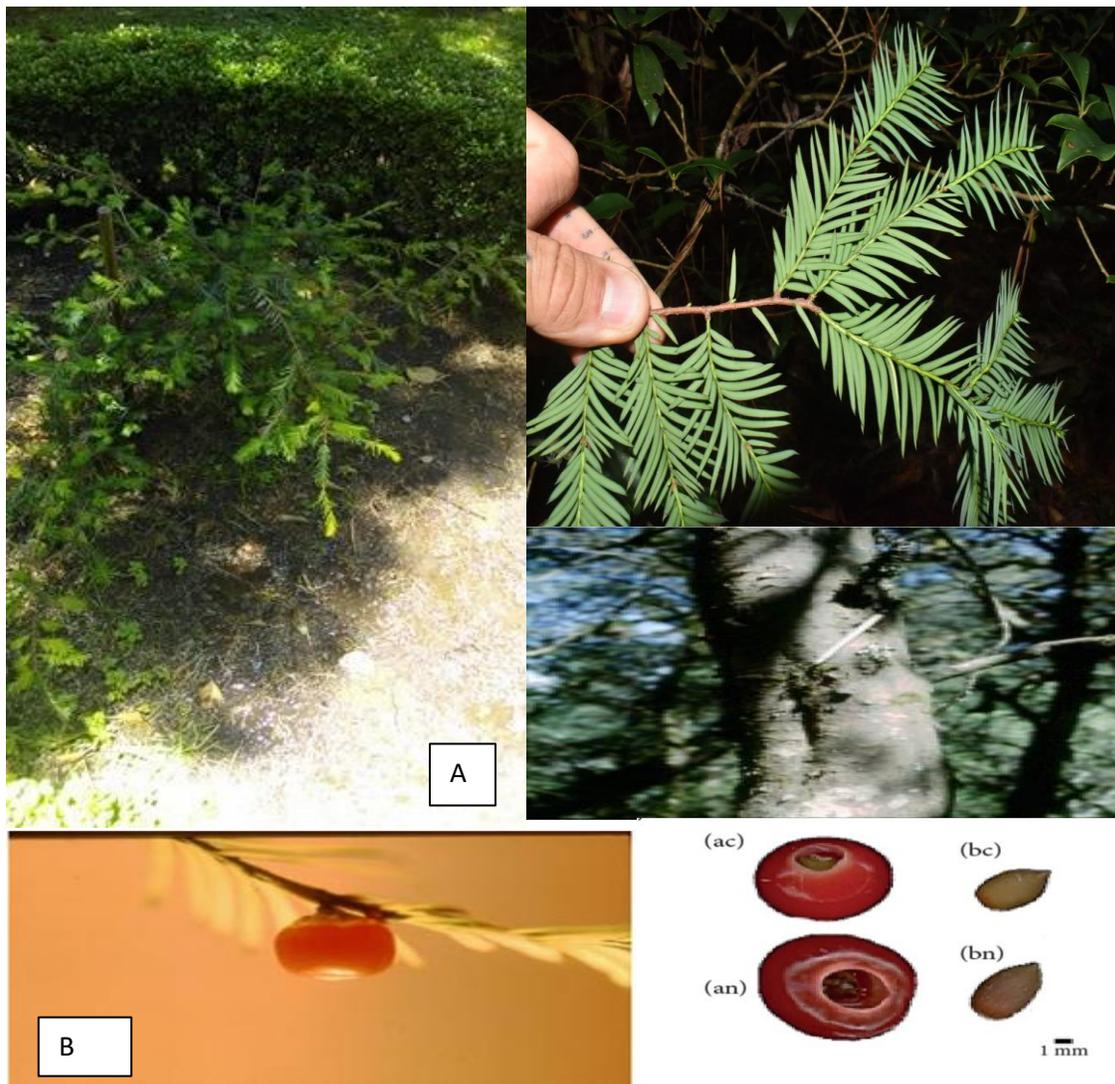


Figura1: Características morfológicas de *Taxus globosa*, A) estructuras vegetativas, arbusto

pequeño con ramas colgantes en donde se encuentran las acículas y tallos. B) estructuras reproductivas, semillas cubiertas por un arilo.

## **2.2 Centro de origen y distribución geográfica**

El género *Taxus* se presenta en varias partes del mundo, las especies de *Taxus* se distribuyen en Norteamérica, Europa, Asia, Oceanía (Malasia) y tal vez norte de África y las Islas Azores, se sabe que su distribución es más amplia en Europa y Asia que en América (Zavala *et al.*, 2001).

Los lugares donde habitan las plantas de *Taxus* en el mundo son en zonas montañas, cañadas, barrancas y otros lugares sombríos, o laderas con exposición al norte y por tanto húmedas gran parte del año, ya sea por la precipitación pluvial o por las nieblas frecuentes (Zavala *et al.*, 2001).

Esta especie tiene una distribución discontinua y restringida a micro-hábitats muy particulares y es considerada como rara en las categorías oficiales de conservación de especies en México, generalmente se encuentra en cañadas o laderas, con exposición húmeda y en altitudes que oscilan entre los 1800 y los 2300 msnm, en bosques mesófilos de montaña o de coníferas, bosques templados, tales como los de abetos, pinos, encinos o bosques nublados; la distribución potencial en los estados de la República que se encuentran los ejemplares de *Taxus globosa* son: al norte en Tamaulipas y Nuevo León; al centro en San Luis Potosí, Hidalgo, Querétaro y Puebla y en el sur en Oaxaca y Chiapas; asimismo, hay poblaciones en Honduras, Guatemala y El Salvador (fig. 2) (Robles, 2015).

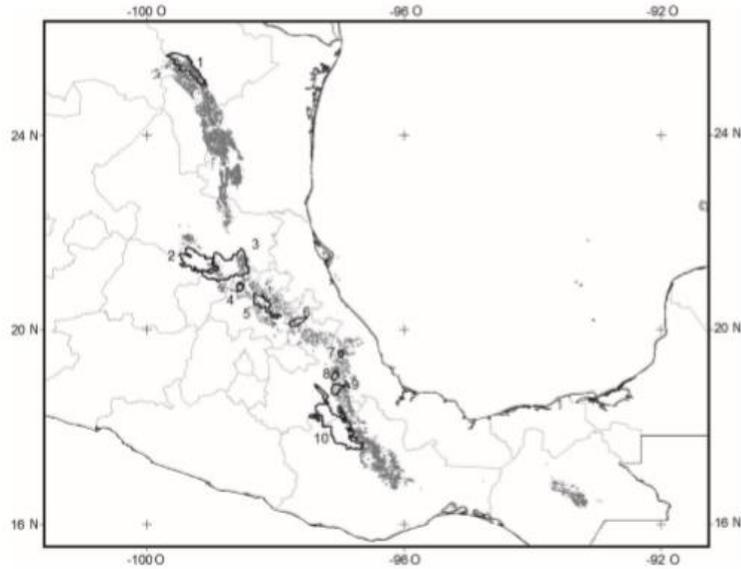


Figura 2. Distribución potencial de *Taxus globosa* en México, tomado de contreras 2010

### 2.3 Usos e importancia farmacéutica y económica del género *Taxus*.

El uso económico de las especies de *Taxus* (tejo) en América del Norte se remonta a las civilizaciones precolombinas. Las maderas de las diversas especies de América del Norte se utilizaron para hacer armas, herramientas, objetos culinarios, equipos deportivos, así como objetos de arte y devocionales. *Taxus canadensis* del este de América del Norte y *Taxus brevifolia* del Pacífico Noroeste fueron utilizados con fines medicinales por varios pueblos indígenas para enfermedades como el reumatismo, coágulos, escorbuto, parálisis, gonorrea y enfermedades pulmonares. (Shemluck, 2003).

Se sabe que en México se utiliza esta especie como planta de ornato en Hidalgo, planta maderable, curtiente y se usa en la elaboración de carbón. (Zavala *et al.*, 2001). Aunque tiene una mayor importancia en la industria farmacéutica ya que, el género *Taxus* contienen taxanos, de los cuales presenta mayores concentraciones de taxol (paclitaxel), y se ha reportado que las especies de América presentan las mayores concentraciones del principio activo obtenidos; ya que se ha logrado obtener de 1 kg de corteza, 300 a 400 mg de principio activo (García *et al.*, 2011, Barrales y Ramírez, 2013).

Paclitaxel es un valioso fármaco que se utiliza ampliamente en el tratamiento de los cánceres de mama, ovario y pulmón, así como en el sarcoma de Kaposi relacionado

con el SIDA. El compuesto se aisló originalmente de la corteza del árbol de tejo pacífico (*Taxus brevifolia*), que es una especie que crece lentamente y no es abundante en la naturaleza, misma situación que ocurre en *Taxus globosa* y por eso se han saqueado de sus ambientes naturales para lograr obtener este compuesto, sin embargo, para obtenerlo es un proceso poco efectivo.

La escasez de suministro del medicamento desde su fuente original de la planta ha provocado enormes esfuerzos para explorar fuentes alternativas de suministro. En particular, el uso de cultivos de células y tejidos de *Taxus* es una alternativa prometedora para la producción en masa de paclitaxel. (Zhang y Wu, 2002).

#### **2.4 Aspectos generales del cultivo de tejidos vegetales**

El cultivo de tejidos vegetales involucra diferentes técnicas en donde se utiliza material vegetal diverso conocido como explante, incluyendo a los protoplastos (células desprovistas de su pared celular), células, tejidos, órganos y plantas completas, entre otros, los cuales son sembrados en medios nutritivos e incubado bajo condiciones controladas mediante estas técnicas, es posible obtener plantas libres de patógenos en un medio nutritivo aséptico (estéril) en condiciones ambientales controladas.

Inicialmente el cultivo *in vitro* de plantas fue utilizado como contribución positiva y significativamente en los programas de propagación, conservación y mejoramiento de las especies vegetales, tanto para estudios básicos como aplicados, así como para propósitos comerciales. Además de contribuir a la propagación acelerada de plantas, se ha convertido en una técnica básica y ventajosa para la biotecnología moderna, incluyendo la producción de plantas transgénicas (Valdez *et al.*, 2017). En la actualidad esta técnica se utiliza para los siguientes fines: (Muñoz, 2006).

- Propagación masiva de plantas, especialmente para especies de difícil propagación por otros métodos convencionales, o en vías de extinción.
- Clonación de individuos de características agronómicas muy deseables durante todo el año.
- Obtención de plantas libres de virus.

- Producción de semillas sintéticas.
- Conservación de germoplasma (conjunto de individuos que representan la variabilidad genética de una población vegetal).
- Obtención de metabolitos secundarios.
- Producción de nuevos híbridos.
- Mejora genética de plantas (incluyendo obtención de plantas transgénicas).
- Germinación de semillas.
- Producción de haploides.
- Estudios fisiológicos y anatómicos diversos.

El cultivo de tejidos vegetales se basa en la totipotencialidad celular que es la habilidad de una célula vegetal en dividirse en diferentes tipos celulares (diferenciarse) para poder formar tejidos y órganos y con ellos dar como resultado a una planta completa. Esto es gracias a que la célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o su posición en ella (Pérez *et al.*, 1999).

El éxito del cultivo de tejidos vegetales depende de los siguientes factores:

1. **Explante y tipo de cultivo:** la elección del explante determina por su tipo celular, las condiciones fisiológicas y bioquímicas que generan un tipo de cultivo determinado ya sea por cultivos organizados o desorganizados.

Cultivo de estructuras organizadas: Aquellas en donde se toma un órgano o un conjunto de células meristemáticas ya sea de hojas o yemas apicales para obtener de una planta completa puede ser de manera directa o indirecta, estas pueden ser utilizadas como se presenta a continuación:

- cultivo de meristemas apicales
- cultivo de nudos
- cultivo de brotes y yemas
- de raíces aisladas

-cultivo de embriones

Cultivo de estructuras no organizadas: Se refiere al cultivo de células no diferenciadas que provienen de un explante para la obtención de un conjunto de células en división celular en fase mitótica que generan agregados celulares estos pueden ser como se menciona a continuación:

-cultivo de callos

-cultivo de células en suspensión

-cultivo de protoplastos

-cultivo de anteras y polen. (George *et al.*, 2008)

2: **Medio de cultivo:** Los medios de cultivo son una mezcla de compuestos químicos que le ayudarán a la planta o al explante durante su desarrollo a continuación se presentan las características que presentan cada componente (cuadro 2).

<b>Cuadro 2: Componentes del medio de cultivo para Cultivo <i>in vitro</i> de plantas</b>	
<b>Sales basales</b>	Macroelementos (N, P, K, Ca, Mg, S) y microelementos (Fe, Co, Zn, Ni, B, Al, Mn, Mo, Cu, I), en una proporción adecuada según los diferentes medios conocidos como MS, B5, N6, etc.
<b>Hormonas y reguladores del crecimiento</b>	Auxinas: Promueven la elongación celular, la formación de callos y raíces adventicias, inhiben la formación de brotes axilares adventicios y, a veces, inhiben la embriogénesis. Citoquininas: Promueven la división celular, regulan el crecimiento y el desarrollo de los tejidos vegetales. Giberelinas Estimula la maduración de semillas, el alargamiento, además, estimulan la floración. Otras: Ácido abscísico, etileno. Estas hormonas son consideradas como inhibitorias del crecimiento y son muy poco utilizadas, salvo el ácido abscísico que se utiliza en la maduración de embriones somáticos.
<b>Fuente de carbono</b>	Generalmente se usa sacarosa. La fuente de carbono se necesita ya que los explantes no son completamente autótrofos, y no pueden cubrir sus necesidades con la poca fotosíntesis que pueden realizar <i>in vitro</i>
<b>Otros compuestos orgánicos</b>	En este grupo están las vitaminas, aminoácidos, extractos de frutas y levadura, antioxidantes, entre otros. Las vitaminas más utilizadas en cultivo de tejidos son la tiamina, riboflavina, ácido nicotínico, piridoxina y el mio inosito. Estas vitaminas actúan como coenzimas, participan en el metabolismo energético, estimulan la formación de raíces y algunas de ellas actúan como segundos mensajeros. El aminoácido que se utiliza generalmente es la glicina, sin embargo, la L-prolina, glutamina, el ácido glutámico y la asparagina también son aminoácidos que se utilizan por promover la embriogénesis somática. Agregar antioxidantes y los extractos de frutas.
<b>Materiales inertes y de sostén</b>	Se usa agar, agarosa, otros polisacáridos, carbón activado, entre otros.
<b>pH</b>	Se utiliza un pH de 5.7 para ayudar al cultivo a asimilar los nutrientes del medio, y poder gelificar el medio de cultivo

(Pérez, 1998; Ramachandra y Ravishankar, 2002).

### 3: **Condiciones artificiales del cultivo:**

Los factores físicos que ayudan al cultivo en su desarrollo.

-Temperatura de 20-28°C y

-Fotoperiodo de 16 horas luz/8hrs oscuridad con una intensidad lumínica de 500 a 3000 lux

-Humedad relativa de 60-70%.

#### **2.5 Cultivo de callos y células en suspensión.**

Un callo consiste en una masa amorfa surgida de la proliferación de células del parénquima. Frecuentemente es el resultado de una herida, un callo se forma en el corte de un tallo, raíz, hoja, entre otros. La característica general del crecimiento de callos abarca una compleja relación entre el material usado para iniciar los callos, la composición del medio, y las condiciones experimentales durante el período de incubación. Algunos desarrollos de callos son fuertemente lignificados y duros en textura, después que el callo ha crecido asociado al tejido original por un tiempo, se vuelve necesario pasarlo a un medio fresco (George, 2008).

Las suspensiones celulares consisten en células libres y agregados celulares distribuidos en un medio líquido en movimiento, beneficiando a las células ya que están en mayor contacto en el medio de cultivo potencializando el crecimiento y la división celular; dando como resultado a la formación de agregados celulares y el mantenimiento de las células en mayor tiempo. Estas suspensiones pueden ser permanentes mediante el suministro continuo de nutrientes y tener una adecuada aireación o intercambio de gases (Smith, 1986).

## 2.6 Evaluación de la proliferación de cultivos celulares.

Existen numerosos métodos para determinar el crecimiento de las suspensiones celulares. Y se enlistan a continuación.

- Número de células
- Volumen celular
- Cuantificación de peso fresco y peso seco
- Turbidez
- Índice mitótico
- *Desarrollo de los cultivos celulares en suspensión*

En los cultivos cerrados, el 'crecimiento' de las suspensiones celulares comprende varias fases representadas:

La *fase de retraso* se observa cuando en un medio fresco se subcultivan suspensiones celulares que están en la fase estacionaria; los cultivos crecen lentamente durante 1 a 3 días. La fase de retraso no se presenta, o es muy corta, si se subcultivan suspensiones que están en el periodo de crecimiento

En la *fase exponencial (o fase logarítmica)*, la tasa específica de crecimiento, o sea, el aumento de la biomasa por unidad de concentración de esta es constante y medible.

En la *fase lineal*, la tasa específica de crecimiento declina uniformemente con el tiempo. Esta declinación aumenta en la fase de desaceleración progresiva, para alcanzar finalmente la *fase estacionaria*, en la cual no hay aumento neto en la síntesis de biomasa o en el número de células.

Y por último la *fase de decaimiento* que es cuando las células se acaban los nutrientes del medio y comienza la muerte celular, es un indicativo de que se debe agregar medio fresco para el manteamiento de las células en suspensión (Roca y Mroginski, 1993). Cada de estas fases se grafican a través de una curva comparando biomasa y tiempo (fig. 3).

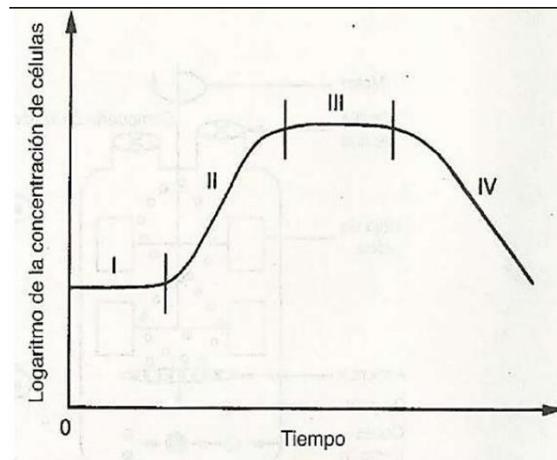


Figura. 3. Fases de la cinética de crecimiento tomado de Roca y Mroginski, 1993.

## 2.7 Cultivos celulares empleadas en el género *Taxus*.

Como reportan Cusido y colaboradores (2014) entre las especies de *Taxus* empleadas para obtener cultivos celulares prolíferos para y así la obtención de taxanos se encuentran: *T. baccata*, *T. media* (híbrido de *T. baccata* y *T. cuspidata*), *T. cuspidata*, *T. brevifolia*, *T. chinensis*, *T. canadensis* y, más recientemente, *T. globosa* (cuadro 3).

Los cultivos celulares de *Taxus globosa* se utilizan en gran medida para la obtención de paclitaxel, estudio de modelos biológicos, transformación genética y utilización de elicitores. Siendo una alternativa para la obtención de este fármaco y preservación de la especie (cuadro 4).

**Cuadro 3: Reportes de cultivo celulares del género *Taxus***

No.	Autor.	Especie	Resultados
1	Fett-neto <i>et al.</i> , 1994	<i>Taxus cuspidata</i>	Observaron el efecto de varias concentraciones de fenilalanina, ácido benzoico, N-benzoilglicina, serina, glicina, alanina y ácido 3-amino-3-fenil-propiónico en la acumulación de taxol en cultivos de 2 años de edad en suspensiones celulares de <i>Taxus cuspidata</i> , línea celular FCLIF y en 7 cultivos de callos en desarrollo de <i>T. cuspidata</i> . La alanina y el ácido 3-amino-3-fenil-propiónico se analizaron solo en cultivos de callos y no afectaron la acumulación de taxol. En presencia de fenilalanina, ácido benzoico, N-benzoilglicina, serina y glicina se observaron aumentos o tendencias significativas hacia el aumento de la acumulación de taxol en el callo y las suspensiones.
2	Jairu <i>et al.</i> , 1999	<i>Taxus chinensis</i>	Indujeron callos de tallos en diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento (2,4-D, BA y ANA) en sales MS, el mejor medio que se obtuvo una mayor respuesta en formación de callo fue el medio con MS +1mg/L de 2,4-D y se cambió a un medio para su subcultivo que diera mayor producción de callo en peso fresco, el cual fue en MS+ 0.5mg/L ANA+0.5mg/L BA.
3	Linden y Phisalaphong 2000	<i>Taxus canadensis</i>	Emplearon una combinación metil jasmonato con quitina y un elicitante derivado de quitosano, para observar la formación de paclitaxel en suspensión celular de <i>Taxus canadensis</i> . La inducción de la biosíntesis de paclitaxel se mejoró cuando se añadió la mezcla a los 8 días después de la transferencia del cultivo dando como resultado que, el aumento de la respuesta de la biosíntesis de paclitaxel a la concentración la mezcla fue aproximadamente entre 0 y 200 µM, usando quitina coloidal u oligosacáridos de quitina y quitosano como inductores. Las concentraciones de la mezcla superiores a 200 µM fueron inhibitorias. En estudios cinéticos, el crecimiento del cultivo y la utilización del sustrato se inhibieron cuando los cultivos se obtuvieron con MJ 100 µM y con 0,63 mg l-1 N-acetilquitohexaosa y con MJ 100 µM solo; los rendimientos de paclitaxel fueron 10 veces mayores en esta última condición que en la anterior.
4	Zhang <i>et al.</i> , 2002	<i>Taxus yunnanensis</i>	Inocularon células de diferentes edades de cultivo (12–24 días) a varias densidades (50–250 g de peso fresco), y fue tratado en el día 7 con una mezcla de elicitores, Incluyendo Ag +, quitosano y metil jasmonato. Observaron que la productividad de la biomasa aumentó con el tamaño del inóculo en la fase exponencial, pero disminuyó posteriormente. El rendimiento y la productividad de taxol aumentó con el tamaño del inóculo, mientras que el rendimiento específico de taxol (por célula) fue dependiendo principalmente de la edad del inóculo, con un óptimo de 20 días, durante la fase estacionaria temprana. La producción de biomasa fue de 39.8 mg / l por día y la productividad de taxol que fue de, 1.9 mg / l por día.
5	Husain 2013.	<i>Taxus wallichiana</i>	Se establecieron cultivos para la organogénesis y la callogénesis con explantes de tallo para callos y brotes para organogénesis. El medio con 2mg/l de 2,4-D + 5mg/L de carbón activado indujo el callo a las 2 semanas de la inducción y para la elongación de brotes fue con el medio MS + 2mg/L BAP y con el medio MS + 1mg/L AIB después de 3-4 subcultivos, después de 60-80 se pusieron en un medio MS+3.5 AIB para obtener raíces.
6	Ramírez 2015	<i>Taxus x media</i> y <i>Taxus globosa</i>	Observo que los callos crecen mejor en el medio WPM con 2mg PIC, KIN 0.1 mg, GA3 0.5mg, en la fase estacionaria <i>T. globosa</i> da los niveles altos de taxanos, los elicitores funcionan mejor en <i>T. media</i> .
7	Sarmadi <i>et al.</i> , 2019	<i>Taxus baccata</i>	Observaron que el crecimiento y la viabilidad de los callos dieron como resultado niveles mejorados de peso fresco y peso seco agregando concentraciones del 1% hasta 3% (p / v) PEG. Los contenidos más altos de 10-deacetil baccatina III y taxol se obtuvieron en las concentraciones del 2% y 3% de PEG, respectivamente. La concentración de PEG al 3% aumentó la producción de taxol en 2,5 veces más que en condiciones control.

**Cuadro 4: Reportes de cultivos celulares de *Taxus globosa***

No.	Autor.	Explante	Objetivo morfogénico	Resultados
1	Arandal 2009	Acícula y tallo	Callo para células en suspensión	Logró establecer un método de desinfección utilizando diferentes agroquímicos en diferentes concentraciones y tiempos de exposición, determinó que las sales B5 son las adecuadas para los medios líquidos y sólidos y estandarizó las condiciones para transformación genética usando el sistema de biobalística y <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y determinó las dosis letales de higromicina y glifosato de amonio
2	Barradas 2010	Tallo, hoja y tejido meristemático	Callo para células en suspensión	Obtuvo líneas celulares para probar la resistencia a la oxidación y producción de callo y cuantificación de taxanos en cultivos elicitados en diferentes concentraciones de metil jasmonato; logro obtener una mayor producción de callos provenientes de tallos y en esta misma línea obtuvo las mayores producciones de callos y una concentración de baccatina III en los cultivos elicitados con 1 µM metil jasmonato.
3	Barrales et al., 2011	Acícula	Callo	Probó diferentes concentraciones y reguladores de crecimiento para la obtención de callos y obtuvo una mayor cantidad de callo con una combinación de Picloram 4.14 µM + 0.4% de PVP, y realizó extracciones en cultivos celulares y hojas in situ; logró obtener concentraciones mayores de taxol y 10-acetil baccatina en cultivos celulares.
4	Martínez 2011	Acícula y tallo	Callo para células en suspensión	Realizó cultivos celulares para obtener paclitaxel y otros taxanos: observó el efecto del Nitrato de plata (AgNO <sub>3</sub> ) en diferentes concentraciones para disminuir la oxidación, determinó que una concentración de 2mg/L es la adecuada para contrarrestar la oxidación, y adicionó metil jasmonato en cultivos en suspensión para obtener una mayor concentración de paclitaxel.
5	Padilla 2013	Acícula y tallo	Callo para células en suspensión	Observó el efecto de la insulina en diferentes concentraciones sin tener respuestas significativas, estableció las concentraciones de los reguladores de crecimiento (ANA, AIA, AIB y BA) para la mayor multiplicación de los cultivos en suspensión, y obtuvo cultivos transformados genéticamente con el sistema de biobalística.
6	Tapia 2013	Acícula y tallo	Callo para células en suspensión	Se analizó la producción de callos en diferentes explantes y sales basales y se analizó la concentración de taxanos en cultivos celulares con o sin la presencia de metil jasmonato como elicitador. Se obtuvo una mayor producción de callos y de taxanos en cultivos con sales WPM con metil jasmonato.
7	Ozuna 2015	Acícula y tallo	Suspensión celular	Se probó diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento para la obtención de taxanos en cultivos elicitados con metil jasmonato, se produjo una mayor cantidad de paclitaxel con la combinación de 2,4-D+ BA.
8	Paz 2015	Acícula y tallo	Callo para células en suspensión	Probó los efectos del ácido cítrico y ascórbico para disminuir la oxidación de los explantes y establecer un protocolo de micropropagación e inducción de callos, obtuvo brotes a partir de yemas axilares con concentraciones altas de citoquininas e indujo callos con ayuda de 2,4-D, por último, redujo la oxidación de los cultivos celulares usando 1g/L de carbón activado y 2 mg/L de ácido ascórbico.
9	Campos 2017	Acícula y tallo	Suspensión celular	Cuantificó la concentración de paclitaxel en cultivos celulares elicitados con metil jasmonato y ácido salicílico en diferentes concentraciones y logró obtener las mayores concentraciones de paclitaxel en los cultivos elicitados con ácido salicílico y determinó que el acetato de etilo es el mejor disolvente para obtener paclitaxel.
10	Álvarez 2019	Acícula y tallo	Callo para células en suspensión	Determinó el momento de síntesis de paclitaxel en los cultivos celulares durante la cinética de crecimiento, realizó extracciones en diferentes condiciones de luz y diferentes tipos de explante y elicitó con metil jasmonato y ácido salicílico y una combinación de ambos

## **2.8 Función de la fuente de carbono en cultivo de tejidos vegetales.**

Los carbohidratos son biomoléculas que se encuentran en gran cantidad en los seres vivos, constituyen la mayor parte de la materia orgánica de la tierra y energéticamente participan para las plantas en las siguientes funciones:

- 1.- Son almacenes de energía, combustibles e intermediarios metabólicos: en las plantas las células almacenan almidón y éste se reduce para generar glucosa y el ATP es liberado como azúcar fosforilado.
- 2.- Los azúcares de ribosa y dextrosa forman parte de la molécula de ARN estructural y ADN, que les da flexibilidad conformacional, les ayudan en el almacenamiento y expresión de la información genética.
- 3.- Forman polisacáridos que son parte fundamental en la pared celular; por ejemplo, la celulosa.
- 4.- Están unidos con las proteínas para formar glucoproteínas.

La glucosa es sintetizada en la fotosíntesis a partir de agua y CO<sub>2</sub> y es almacenada como almidón o convertida en celulosa para dar generación a la pared celular.

Los azúcares van a ser los carbohidratos que se les conoce como monosacáridos y disacáridos. Los primeros son los azúcares que no se pueden hidrolizar hacia carbohidratos más simples. Pueden clasificarse como triosas, tetrosas, pentosas, hexosas o heptosas, dependiendo del número de átomos de carbono, y como aldosas o cetosas, dependiendo de si tienen un grupo aldehído o cetonas, por ejemplo, la glucosa, la fructosa y la galactosa. Los disacáridos son productos de condensación de dos unidades de monosacárido, se unen mediante un enlace covalente conocido como enlace glucosídico, tras una reacción de condensación que implica la pérdida de un átomo de hidrógeno de un monosacárido y un grupo hidroxilo del otro monosacárido, con la consecuente formación de una molécula de H<sub>2</sub>O y la unión éster por ejemplo la sacarosa, maltosa, lactosa y trehalosa (Melo, 2007, Nelson y Cox, 2009).

Para el cultivo de tejidos vegetales estos se han utilizado en el medio de cultivo y tienen la función principal de ser fuente de energía, para el desarrollo crecimiento de la planta y la diferenciación celular; además pueden actuar como agentes osmóticos que respaldan la ganancia óptima en el peso fresco de las células cultivadas; también se han utilizado en el desarrollo de cultivos autotróficos que es cuando se agrega una fuente de carbono para la diferenciación y el desarrollo de cloroplastos. Gracias a esto, se pueden tener ventajas en el cultivo *in vitro* de plantas como: (a) Obtención de líneas celulares con una alta tasa de crecimiento intrínseca; (b) Modificaciones al medio para obtener un mejor crecimiento; (c) Modificación de variables de proceso; y (d) Escalamiento de cultivos celulares en biorreactores (Jain *et al.* 1996 y Gómez *et al.*, 2014).

Así mismo la respuesta morfogénica bajo condiciones *in vitro*, depende del tipo de carbohidratos que se utiliza, la concentración utilizada en el medio de cultivo y sobre todo el tipo de especie utilizada. También la utilización de diferentes carbohidratos en cultivo de tejidos vegetales puede apoyar en la formación de la embriogénesis somática, potencializa la organogénesis, apoya en la regeneración *in vitro* de plantas completas y ayuda en el enraizamiento y la inducción de callos (Cuadro 5).

## **2.9 Cultivos celulares con diferentes fuentes de carbono en el género *Taxus*.**

Los estudios del cultivo de tejidos vegetales en el género *Taxus* también han ensayado con las fuentes de carbono para ver el efecto, sobre la producción de biomasa callosa, en contrarrestar el fenómeno de oxidación (un fenómeno intrínseco muy común en los cultivos de *Taxus*, provocando la muerte celular y alteración en la síntesis de paclitaxel), la producción de paclitaxel en los cultivos celulares y los procesos de asimilación de azúcares provenientes del medio de cultivo a las células (Cuadro 6).

**Cuadro 5: Reportes de cultivos celulares de diferentes especies utilizando diferentes fuentes de carbono**

No	Autor.	Especie	Explantante	Fuente de carbono	Resultados
1	Vake y Molt 1986	<i>Pinus taeda</i>	Tallo	Xilosa, arabinosa, ribosa, glucosa, fructuosa, sacarosa, manosa, sacarosa, maltosa, trehalosa, meliosa, lactosa, celobiosa, rafinosa y polisacárido de almidón 0.5%	Sacarosa, ribosa y galactosa incrementan el peso fresco y seco de los callos en un 75%
2	Devi 1997	<i>Daucus carota</i>	Peciolo	Sacarosa, glucosa, fructuosa, galactosa, manosa, maltosa, rafinosa, estaquiosa, lactosa, melobiosa, celobiosa, trehalosa 2%	Observaron que a los 13 días el tejido puede crecer en glucosa, fructosa, manosa, maltosa y sacarosa. La tasa de crecimiento del tejido en glucosa, fructosa, manosa y estaquiosa aumenta en presencia de 2,4-D. El retraso en el crecimiento de la estaquiosa disminuye por la presencia de 2,4-D. En presencia de 2,4-D, la lactosa, la celobiosa y la melibiosa apoyan el crecimiento limitado del tejido.
3	Jain 1997	<i>Oryza sativa</i>	Embriones cigóticos	Celobiosa, fructosa, glucosa, lactosa, maltosa, manitol, sorbitol o sacarosa, se usó a 88 mM	Obtuvieron al usar sacarosa en el medio un aumento en el peso fresco del callo. Indujo la formación de brotes en el 24-66% de los callos derivados de protoplastos en todas las variedades, la glucosa indujo la regeneración de brotes en el 24-51% en TAIPEI 309. La fructuosa indujo la regeneración de brotes en el 23-25% de las colonias derivadas de protoplastos de Jaya y Pusa Basmati.
4	Maataoui 1997	<i>Albizzia julibrissin</i>	Raíces	Sacarosa, fructuosa, glucosa, galactosa, maltosa, lactosa, arabinosa y xilosa 3%	Observaron que, agregando fructuosa, sacarosa y glucosa al medio de cultivo se estimulan la formación de callo, mientras que la maltosa, lactosa y xilosa dan formación de brotes y la galactosa es tóxica para los explantes.
5	Blan et al., 2002	<i>Hevea brasiliensis</i>	Tegumentos internos de semillas inmaduras	Sacarosa, fructuosa, glucosa y maltosa 3%	Utilizaron en el medio de cultivo sacarosa y maltosa y observaron un incremento en peso fresco, sin embargo, en el peso seco la sacarosa y la fructuosa se observó un aumento de peso seco. Se metabolizan más rápido la glucosa y la fructuosa. Las células aprovechan más la sacarosa y la maltosa del medio de cultivo demostrando una viabilidad alta en los cultivos.
6	Mohamad et al., 2006	<i>Goniothalamus umbrosus</i>	Semillas	Sacarosa, fructuosa y glucosa 3%	Observaron que al usar sacarosa dio un crecimiento y producción de estirilpirona, la fructuosa aumenta la masa callo pero disminuye la estirilpirona y la glucosa dio resultados inhibitorios en la masa callosa y síntesis de estirilpirona
7	Rahpeyma et al., 2014	<i>Corylus avellana</i>	Cotiledones de semilla	Sacarosa 3%, glucosa 3%, fructosa 3% y una combinación igual de sacarosa 1.5% + glucosa 1.5%	Observaron que la producción de taxol aumentó durante el período de cultivo y el nivel máximo de 4,2 µg / g de peso seco se obtuvo el día 10 al combinar 3 µM de fenilalanina y 0,05 y 0,1 mM de Valina en medios suplementados con fructosa (3%).
8	El-Shafey et al., 2016	<i>Rumex vesicarius</i>	Hojas cotiledóneas e hipocótilo	3% de sacarosa, galactosa, glucosa, fructuosa y manosa	Observaron que la utilización de sacarosa y fructuosa en el medio de cultivo dan una mayor cantidad de biomasa de callo y obtuvieron extractos y observaron la fructuosa dio una mayor cantidad de flavonoides.

**Cuadro 6: Reportes de cultivos celulares del género *Taxus* con diferentes fuentes de carbono**

No.	Autor.	Especie	Explante	Fuente de carbono	Resultados
1	Feet <i>et al.</i> , 1994	<i>Taxus cuspidata</i>	Tallos	Sacarosa, glucosa y fructuosa 0,1,2%	Analizaron la asimilación de azúcar en los medios de cultivo y en las células observando que después de aproximadamente 6 días, la sacarosa fue absorbida o hidrolizada; la glucosa y fructosa en el medio aumentan su concentración desde el día 0 hasta el día 6 y luego comenzaron a disminuir. la glucosa se consumió después de 12 días de cultivo, mientras que la fructosa se eliminó completamente después de 18 días de cultivo y mostró una tasa de absorción más lenta.
2	Wickremesinh <i>et al.</i> ,1994	<i>Taxus x media</i>	Tallos	1%, 2%, 4%, 6% y 8% de sacarosa 2 % y 4% de fructuosa y glucosa	Observaron el aumento de los callos y determinaron la cantidad de azúcar que asimilan las células en el medio de cultivo obteniendo un incremento de 80-110mg/L de biomasa utilizando fructosa, en los medios de cultivo combinados de azúcares la sacarosa se hidroliza rápidamente, la glucosa se aprovecha a mayor velocidad y la fructosa es la última en aprovecharse.
3	Kim <i>et al.</i> ,1995	<i>Taxus brevifolia</i>	Tallos juveniles	sacarosa, glucosa, fructosa, lactosa, galactosa, manitol y sorbitol. 8%	Se observó la producción de paclitaxel en células en suspensión y se observó que sacarosa, lactosa, galactosa, glucosa y fructosa estimulan el crecimiento celular en una medida similar 14-16 g/L de peso seco. La fructuosa 8% dio una mayor producción de taxol siempre y cuando se modifican las sales basales B5 y WPM
4	Yari <i>et al.</i> , 2011	<i>Taxus brevifolia</i>	Tallos juveniles	Sacarosa, glucosa y fructuosa 0.5% y 1%	Se evaluó el efecto que tienen las fuentes de carbono (0.5% de sacarosa y glucosa y 1% de fructosa) sobre la producción de callos, oxidación y la producción de paclitaxel y se observó que evitan el oscurecimiento de los callos, a 1% de glucosa y 0.5% de fructosa y sacarosa aumentan la producción de paclitaxel.
5	Sarmadi <i>et al.</i> , 2018	<i>Taxus baccata</i>	Tallos juveniles	Sacarosa 3% Glucosa 0.5, 1, 2, 3%	Probaron el efecto de la glucosa + ácido salicílico y ácido ascórbico en la producción de callo y síntesis de taxanos. Concentraciones altas de glucosa disminuyen el peso y la oxidación. Al agregar ácido salicílico incrementa la viabilidad de los callos, la glucosa promueve el estrés osmótico, pero aumenta la concentración de paclitaxel, al 2% aumentó la concentración de taxanos al 80% pero con ácido salicílico aumenta el doble su concentración.

## **2.10 Factores involucrados en la proliferación y en la producción de taxanos.**

Se ha demostrado que el paclitaxel y los taxoides se producen en varios sistemas de cultivo de tejidos, como callos, suspensiones celulares, brotes, raíces vellosas y cultivos embrionarios. Hoy en día, los cultivos en suspensión representan el sistema más efectivo para la producción in vitro de paclitaxel. Los cultivos de células de *Taxus* podrían proporcionar cantidades suficientes de paclitaxel o de otros taxoles (Jatziri, 1996).

Las condiciones utilizadas para el establecimiento de cultivos de callos y suspensiones celulares son la utilización adecuada de sales basales y compuestos orgánicos, reguladores de crecimiento y factores físicos que determinan el éxito de los cultivos.

Un paso fundamental para obtener los cultivos celulares es establecer cultivos de callos friables de rápido crecimiento, a partir de explantes jóvenes de individuos con una edad de 3-4 años suplementados con medios basales como Gamborg (B5) (Gamborg, 1968), Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962) y Woody Plant Medium (WPM) (Lloyd y McCown, 1981) que se han reportado para la utilización en la inducción y el mantenimiento de los cultivos celulares del género *Taxus*.

Los suplementos orgánicos tales como hidrolizado de caseína, polivinilpirrolidona, ácido ascórbico glicina, arginina, prolina y los reguladores el crecimiento de las cuales: el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2-4 D), Picloram, ácido naftalenacético (ANA), ácido indolacético (AIA), ácido indolbutírico (AIB), benciladenina (BA), kinetina, ácido giberélico (AG3) se utilizan para estimular la proliferación celular (Jatzirí, 1996).

El callo de *Taxus* crece lentamente durante los subcultivos iniciales y en los próximos 6 a 10 meses, el callo se vuelve marrón y el crecimiento se detiene. Sin embargo, se ha demostrado que uno o dos años más tarde, es posible seleccionar,

entre el callo marrón y las células blancas-amarillas, con una alta proliferación (Jatziri 1996). Las líneas celulares para producir taxanos dependen mucho más de las condiciones de cultivo y los inductores empleados que en las condiciones de la planta y los cultivos (Cusido, 2014).

## 1. Formación de los taxanos.

La ruta biosintética involucrada en la formación de paclitaxel y taxoides (figura 4) está estrechamente relacionados con una cadena lateral en C-13 y se puede dividir en tres pasos biosintéticos principales, que incluyen: la formación del esqueleto de anillo de taxa; la síntesis de la cadena lateral; y finalmente la esterificación del sistema de anillo de taxano con la cadena lateral.

El esqueleto del anillo de taxano diterpeno se deriva del mevalonato a través de la vía del isopreno. La cadena lateral de paclitaxel se forma a partir de fenilalanina a través de  $\beta$ -fenilalanina y fenilisoserina. La benzoilación del nitrógeno de fenilisoserina se produce como último paso después de la unión de la cadena lateral a la posición C-13 de la bacatina III (Jatziri, 1996).

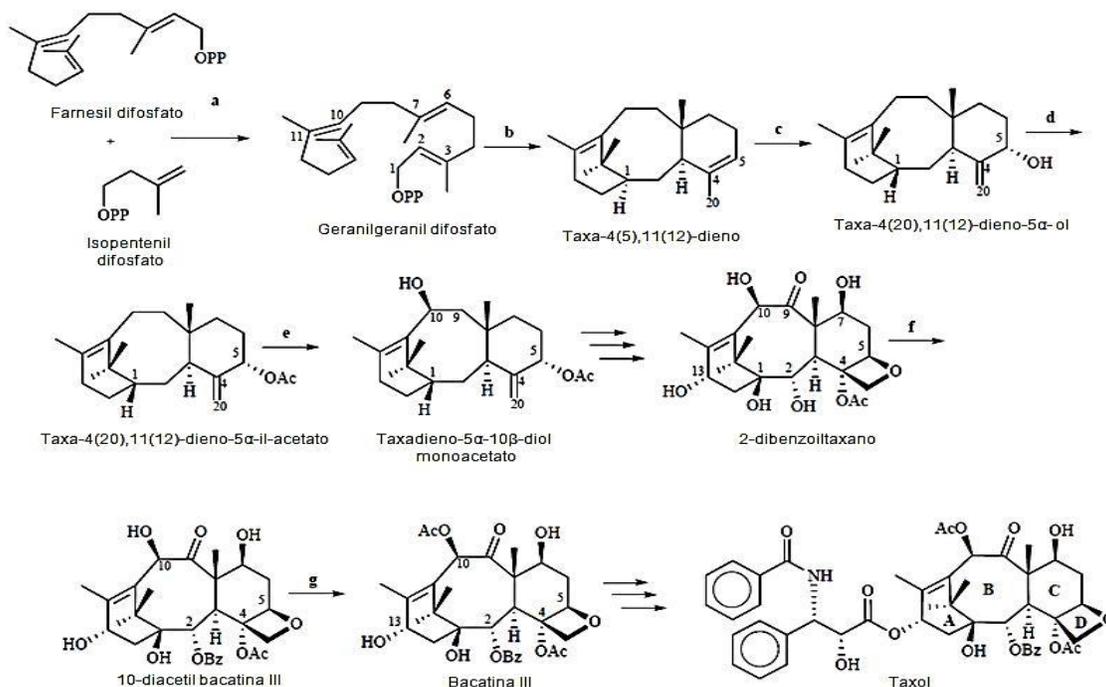


Figura.4. Esquema de la ruta de biosíntesis de taxol en *Taxus* spp. Modificado de: Walker y Croteau, (2001). Tomado de Barrales-Cureño y De la Rosa Montoya, 2014

La optimización de las condiciones de inducción y crecimiento de callos puede ser un proceso tedioso, ya que la respuesta al tratamiento de inducción y crecimiento varía según el tipo de explante y la especie de la planta madre. Los cultivos requieren que cada proceso sea optimizado por separado. La optimización del rendimiento del metabolito secundario de la planta también es un procedimiento difícil y laborioso, ya que en la mayoría de los casos las mejores condiciones para el crecimiento son diferentes a los de producción de compuestos bioactivos y es recomendable trabajar con un sistema de dos etapas en el que las células de la planta están primero cultivadas en un medio optimizado para el crecimiento y luego transferido a un medio de producción (Cusido, 2014).

## **2. Alternativas para la producción de taxanos**

Uso de elicitores: La elicitación es un proceso para inducir o mejorar la síntesis de metabolitos secundarios, es uno de los métodos establecidos más efectivos y mejorar la producción de metabolitos secundarios en plataformas de células vegetales. Existen elicitores abióticos y bióticos, tales como vanadil (IV) sulfato, sales de lantano, ácido araquidónico, jasmonatos de ácido salicílico y extractos de hongos, solos o en combinación etc., han sido en gran medida eficaz en aumentar la producción de taxanos

Transformación genética de células de *Taxus*: La introducción de genes que codifican las enzimas involucradas en los pasos finales de la biosíntesis del taxol bajo el control de un promotor fuerte es probable que produzca altos rendimientos de los taxanos objetivo en células cultivadas de *Taxus* (Cusido, 2014).

### **III. Justificación:**

*Taxus globosa* es una gimnosperma de alto valor farmacéutico debido a que de esta especie se puede obtener un anticancerígeno muy demandado conocido como paclitaxel (taxol), sin embargo, debido a su gran demanda y al ser una especie endémica de México, con una distribución muy discontinua y escasa, ha sido depredada por lo que se encuentra en la NOM-059-SEMARNAT-2010 en categoría de riesgo.

Una alternativa para obtener este fármaco es el cultivo de tejidos vegetales a través de cultivos celulares como callos y células en suspensión; sin embargo, los cultivos de *Taxus globosa* tienen la desventaja de presentar altas oxidaciones, lo que afecta el crecimiento ya de por sí lento de la masa celular y su proliferación, causando la muerte celular y, por lo tanto, afectando en la ruta biosintética del paclitaxel.

La fuente de carbono como se indica en los antecedentes optimiza la proliferación de los callos con menor grado de oxidación en otras especies del género *Taxus*, es por eso que el evaluar el efecto de la sacarosa, maltosa, glucosa y fructosa en el medio de cultivo, puede ser una alternativa para obtener cultivos celulares prolíferos y observar su efecto en el aumento de peso fresco, la presencia de callo verde y contrarrestar la oxidación; con esto optimizar las condiciones de cultivo y generar un protocolo para la obtención de callo y células en suspensión prolíferos y con cloroplastos diferenciados de *Taxus globosa*.

### **IV. Hipótesis.**

Diferentes fuentes de carbono (sacarosa, maltosa, glucosa y fructosa) tienen un efecto en la inducción de la callogénesis, en la oxidación y el peso fresco de los cultivos celulares de acícula y tallo de *Taxus globosa*; por lo que se espera que la fructosa tenga un efecto sobre la proliferación celular y la glucosa y maltosa tengan un efecto sobre la oxidación y diferenciación de cloroplastos.

## **V. Objetivos**

### **Objetivo general**

Evaluar el efecto de cuatro fuentes de carbono (sacarosa, maltosa, glucosa y fructosa) para obtener cultivos celulares proliferos a partir de acícula y tallo de *Taxus globosa*.

### **Objetivos particulares**

1. Inducir la formación de callos utilizando dos tipos de explante y cuatro fuentes de carbono en diferentes condiciones de luz.
2. Evaluar el efecto de las diferentes fuentes de carbono en la oxidación y generación de callo verde en cultivos acícula y tallo.
3. Evaluar la proliferación de callos de acícula y tallo cultivados en diferente tipo y concentración de fuente de carbono a través de cinéticas de crecimiento de peso fresco.
4. Establecer cultivos en suspensión de células de *Taxus globosa* en diferentes medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono.
5. Evaluar la proliferación de las suspensiones celulares de acícula y tallo desarrolladas en concentraciones óptimas a través de cinéticas de crecimiento de peso fresco y peso seco.

## **VI. Materiales y Método**

### **6.1 Ruta crítica**

El desarrollo experimental del presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química para el cumplimiento de los objetivos se siguió la ruta crítica presentada a continuación (fig. 5)

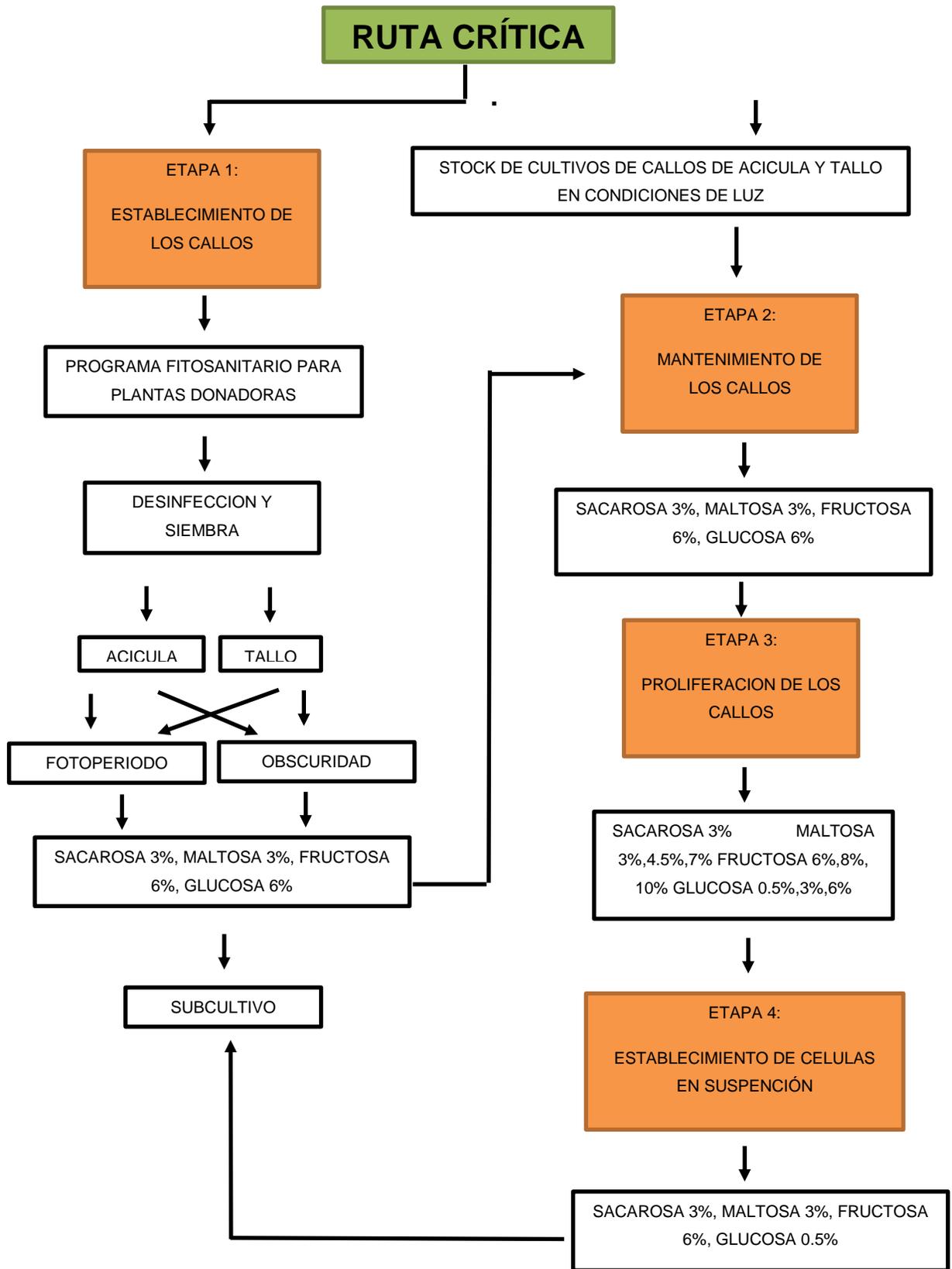


Fig. 5. Ruta experimental seguida en este proyecto

## 6.2 Material biológico

Se utilizaron acículas y tallos de plantas de *Taxus globosa*, mantenidas en las instalaciones del conjunto E en la facultad de Química UNAM. Dichas plantas estuvieron sometidas a un programa fitosanitario y de fertilización periódica (fig. 6).

También se utilizaron callos provenientes de explantes de tallo y acícula inducidas con anterioridad, de un año; estos cultivos fueron subcultivados en el medio correspondiente (cuadro 7.1) y se utilizaron para los experimentos de proliferación celular, mantenimiento y células en suspensión.



Fig. 6. Planta madre de *Taxus globosa*

## 6.3 Medio de cultivo.

Todos los experimentos que se muestran en la ruta crítica se realizaron utilizando medio de cultivo B5 suplementado con aminoácidos, antioxidantes, y reguladores de crecimiento vegetal (cuadro 7.1 y 7.2); se utilizaron dos tipos de medio de cultivo dependiendo la etapa de la ruta crítica, sólo se le cambió la fuente de carbono en los diferentes ensayos y los reguladores de crecimiento en los diferentes tipos de medio de cultivo y se adicionaron antibióticos en la inducción.

Todos los medios de cultivos se prepararon a partir de soluciones concentradas y se ajustaron a un pH de 5.7 utilizando NaOH o HCl 1 N según fue necesario. Los medios de cultivos se esterilizaron en una autoclave vertical a 122°C, y a una presión de 1.2 kg/cm<sup>2</sup> durante 18 minutos. Todos los medios de cultivo se sirvieron

dentro de la campana de flujo laminar para agregar el antibiótico y/o el nitrato de plata cuando el medio tuviera una temperatura de aproximadamente 40°C.

<b>Cuadro 7.1. Composición del medio de cultivo</b>		
<b>Componente</b>	<b>Medio sólido (TxS)</b>	<b>Medio líquido (TxL)</b>
<b>Sales B5 I-V</b>	100%	
<b>Vitamina Kao</b>		
<b>Vitamina Nitsh</b>		
<b>Ácido aspártico</b>	0.1275g	
<b>Arginina</b>	0.175g	
<b>Glicina</b>	0.07g	
<b>Prolina</b>	0.112g	
<b>PVP</b>	1g	
<b>Picloram</b>	1 mg	
<b>Kinetina</b>	1.1 mg	
<b>BA</b>		1 mg
<b>ANA</b>		2.5 mg
<b>AIA</b>		2.5 mg
<b>AIB</b>		2.5 mg
<b>Fuente de carbono</b>	*	
<b>pH</b>	5.7	
<b>Gelzan</b>	3.5 g	
<b>Nitrato de plata</b>	3 mg	
<b>Cefotaxime</b>	1ml (aplicado en la etapa 1)	

<b>Cuadro 7.2. Tipos y concentraciones de fuente carbono utilizados en cada etapa.</b>										
<b>Etapas</b>	<b>Tratamiento</b>									
<b>I: Inducción de callos</b>	Sacarosa 3%			Maltosa 3%			Fructosa 6%		Glucosa 6%	
<b>II: Mantenimiento de callos</b>	Sacarosa 3%			Maltosa 3%			Fructosa 6%		Glucosa 6%	
<b>III: Proliferación de callos</b>	Sacarosa 3%			Maltosa 3%			Fructosa 6%		Glucosa 0.5%	
				4.5%	7%	6%	8%	10%	3%	6%
<b>IV: Establecimiento de células en suspensión</b>	Sacarosa 3%			Maltosa 3%			Fructosa 6%		Glucosa 0.5%	

## 6.4 Inducción de callos

- Mantenimiento de las plantas donadoras

Las plantas donadoras de donde se obtuvieron los explantes fueron de *Taxus globosa* de aproximadamente 8 años, estos se mantuvieron con riegos y fertilización periódicas.

Se utilizó un individuo proveniente de estacas enraizadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INAFAP-Coyoacán) y éste fue plantado en los jardines del conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM.

El arbusto se mantuvo en un programa de fertilización, durante 10 meses (cuadro 8)

**Cuadro 8: Programa fitosanitario y de riego de las plantas donadoras de explantes de Tejo mexicano**

Acción	Frecuencia
Riegos	1 vez a la semana
Fertilización con sales MS 25%+ 100 % de vitamina MS modificadas + 0.5 mg de BA.	Cada 15 días.

- Desinfección y siembra de explantes

El material biológico utilizado en la siembra provino del árbol plantado en los jardines del Conjunto de la Facultad. Se cortaron ramas de aproximadamente 5 cm de longitud con acículas de color verde claro, con apariencia saludable y libre de patógenos y enfermedades. Éstos se desinfectaron con el método propuesto por (Arandara 2009) modificando la concentración de Vanish® y los tiempos de exposición de los agroquímicos para evitar la muerte de los explantes. En el siguiente diagrama se presentan los pasos del método de desinfección que se utilizaron. El lavado de explantes con detergente y Vanish® se realizó fuera de

campana, mientras que todos los demás pasos se realizaron dentro de la campana de flujo laminar.

Cabe mencionar que todos los materiales y agua utilizados durante la desinfección fueron previamente autoclaveados durante 30 minutos.

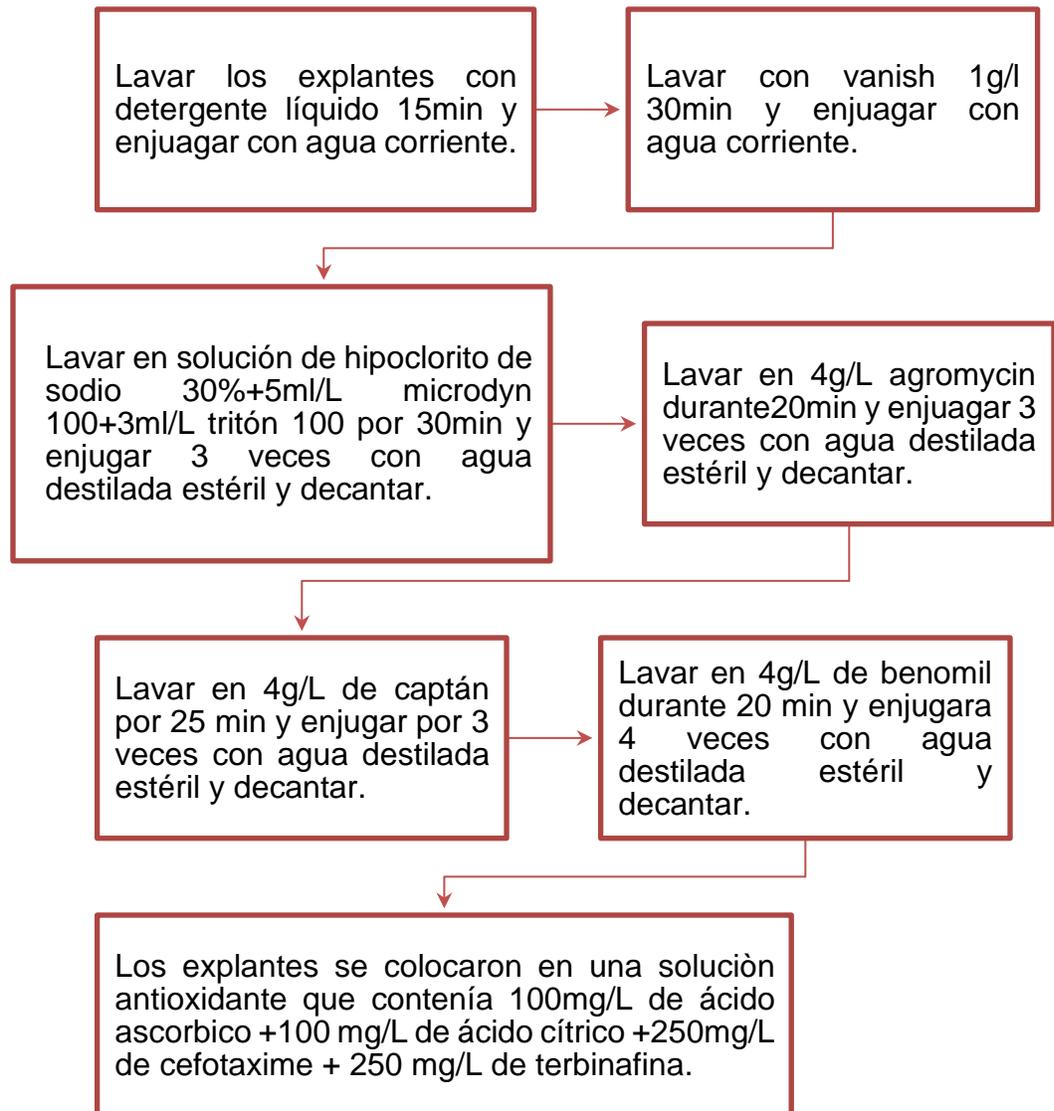


Figura 7. Método de desinfección que fue probado en los explantes antes de la siembra en los medios de cultivo para la inducción de callo (Arandaral ,2009).

Una vez sometidos los explantes al proceso de desinfección, con ayuda de pinzas y bisturí se separaron las acículas (A) de los tallos (T) y a éstos se les hicieron heridas para inducir la formación de callo. Se colocaron los explantes en las cajas Petri con los diferentes medios de cultivo con los tratamientos y repeticiones correspondientes (Cuadro 9) y se incubaron en cuartos de ambiente controlado con una temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y en dos diferentes condiciones de luz: fotoperiodo (FP) de 16 horas luz / 8 horas oscuridad y oscuridad total(O)

<b>Cuadro 9: Condiciones utilizadas para la fase de inducción de la Etapa 1</b>																
	Fuente de carbono / concentración															
	Sacarosa 3% (control)				Maltosa 3%				Fructosa 6%				Glucosa 6%			
<b>Tratamiento</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	1	1	1	15	16
<b>Condición</b>	P		O		P		O		P		O		P		O	
<b>Explante</b>	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T
<b>Repeticiones</b>	3	2	3	2	3	2	3	2	3	2	3	2	3	2	3	2

Se registró el porcentaje total de contaminación de cada una de las siembras, durante tres meses y se registró la respuesta en cuanto a la formación de callos en cada tratamiento y se tomaron fotografías con ayuda de un microscopio estereoscopio. Por último, se realizó un análisis de varianza con prueba Tukey al 95% de confianza con el paquete estadístico R Studio versión 1.2.5033 © 2009-2019 RStudio, Inc. Y se compararon los tratamientos para cada explante y por los dos explantes para identificar las diferencias significativas y la condición de luz se observó sus diferencias significativas en la etapa de inducción.

### 6.5 Mantenimiento

Se proporcionaron frascos de un stock de cultivos de callo ya inducidos de explantes de tallo y acícula con un año expuestas a condiciones control. Estos se subcultivaron para proliferar el callo en condiciones de luz y continuar con las siguientes etapas del proyecto.

Bajo condiciones de asepsia, dentro de una campana de flujo laminar se pesó un gramo de callo con ayuda de una balanza granataria y se inocularon 5 frascos

pequeños para cada tratamiento y se subcultivaron una vez al mes durante 6 meses continuos. El medio que se utilizó se presenta fue el mismo que en la etapa 1 (cuadro 7.1 y 7.2) apartado II. Se realizaron 5 repeticiones (cuadro 10)

<b>Cuadro 10: Condiciones utilizadas en la Etapa 2</b>									
	Fuente de carbono / concentración								
	Sacarosa 3% (control)		Maltosa 3%		Fructosa 6%		Glucosa 6%		
Condición	FP								
Explante	T	A	T	A	T	A	T	A	
Repeticiones	5								

Cada mes se evaluaron de manera cualitativa los siguientes parámetros: porcentaje de oxidación siendo el 10% como el callo menos oxidado y 100% el callo totalmente oxidado, porcentaje de presencia de callo verde siendo el 10% el valor más bajo de presencia de callos verdes en el frasco y el 100% cuando el frasco contenía callos verdes en su totalidad

### 6.6 Proliferación de callos

La proliferación de los callos se evaluó a través de cinéticas de crecimiento de peso fresco. Se establecieron concentraciones de los 4 tipos de azúcares para realizar un barrido de concentraciones y determinar cuál es el carbohidrato que induce una mayor proliferación en los callos. Se realizaron 4 repeticiones para cada tratamiento, en cada repetición se pesó 0.5 g de callo y con apariencia de baja oxidación con presencia de coloración verde en la masa (cuadro 11).

<b>Cuadro 11: Condiciones utilizadas en la cinética de crecimiento de la etapa 3</b>														
	Fuente de carbono / concentración													
Repeticiones	4													
Condición	FP													
Fuente de carbono	Sacarosa		Maltosa				Fructosa				Glucosa			
Concentraciones	3%		3%	4.5%	7%	6%	8%	10%	0.5%	3%	6%			
Explante	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A

Estos callos se adecuaron un mes en las concentraciones de azúcar, posteriormente a este mes se subcultivaron y se comenzó a hacer registro con 0.5 g de callo para su evaluación y se tomaron los registros de peso fresco cada semana durante 28 días. Pasados los 28 días se tomó fotografías del callo y se observó si se conserva la coloración verde. Por último, se realizó un análisis de varianza con prueba Tukey al 95% de confianza con el paquete estadístico R Studio versión 1.2.5033 © 2009-2019 RStudio, Inc. Y se compararon los tratamientos por cada explante y por los dos explantes para identificar las diferencias significativas.

### 6.7 Establecimiento de cultivos de células en suspensión

Las concentraciones de sacarosa 3%, maltosa 3%, glucosa 0.5%, y fructosa 6% fueron utilizadas para establecer las células en suspensión y determinar cuál fue la mejor fuente de carbono (cuadro 12).

<b>Cuadro 12: Condiciones utilizadas en las células en suspensión para la etapa 4</b>									
	Fuente de carbono / concentración								
	Sacarosa 3% (control)		Maltosa 3%		Fructosa 6%		Glucosa 0.5%		
Condición	FP								
Explante	T	A	T	A	T	A	T	A	
Repeticiones	9								

Se establecieron cultivos madre en matraces de 250 mL, los cuales contenían 60 mL de medio de cultivo y con 8 g de callo con el 10-20% de oxidación y coloración verde provenientes de tallo y de acícula. Se dejaron disgregar 2 semanas a 100 rpm y al cabo del tiempo se pasaron por una gasa estéril cada matraz logrando obtener las suspensiones, posteriormente se pasaron por un disgregador celular del poro más grande (mm) y se midió el volumen inicial de la suspensión para llevar a un volumen final de 135 mL de suspensión agregando medio fresco, posteriormente se dividió la suspensión en 9 matraces de 50 mL colocando 15 mL de suspensión para cada explante (tallo y acícula). Posteriormente, cada semana, se tomaron al azar 3 matraces de cada tratamiento y se filtraron a vacío con ayuda de una bomba de vacío y un matraz kitasato y en un embudo se filtraron las células con ayuda de un papel filtro pesado previamente, se pesaron las células para determinar peso fresco,

se dejaron secar durante una semana y cuando la pastilla estuvo completamente seca se volvieron a pesar para determinar el peso seco (fig. 8). Por último, se realizó un análisis de varianza con prueba Tukey al 95% de confianza con el paquete estadístico R Studio versión 1.2.5033 © 2009-2019 R Studio, Inc. Y se compararon los tratamientos por cada explante y por los dos explantes para identificar las diferencias significativas.

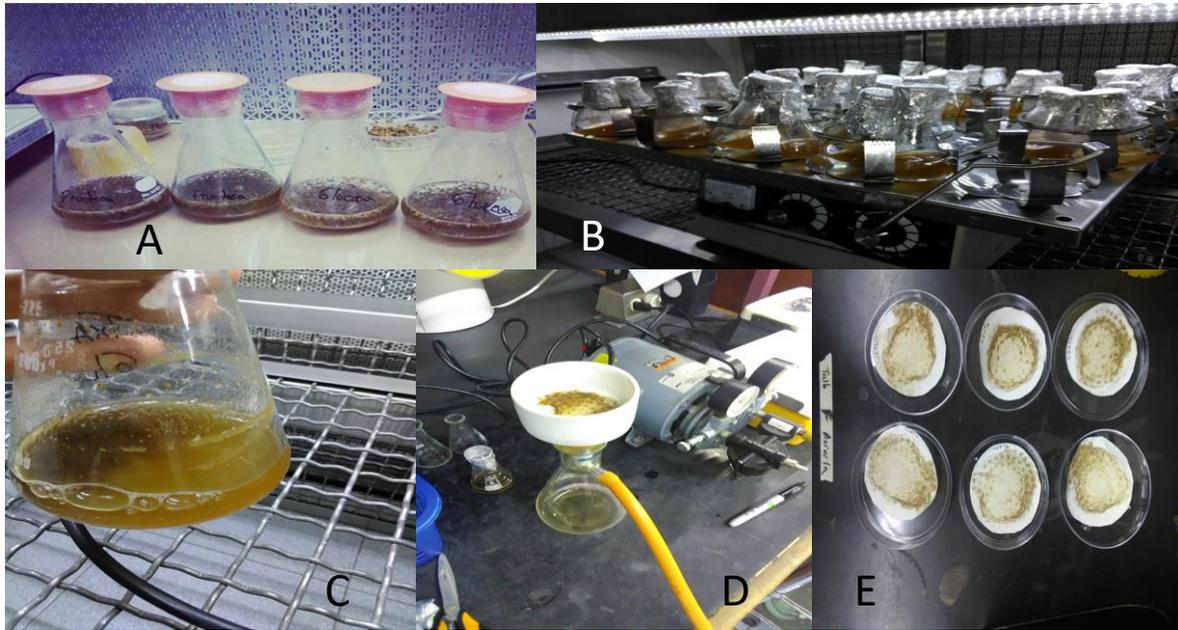


Figura. 8. Etapa 4 establecimiento de las células en suspensión. A: Cultivos madre; B: Inóculos; C: Paquete celular; D: Toma de muestra para peso fresco; E: Toma de muestra para peso seco

## VII. Resultados

### 7.1 Establecimiento de callos

#### 7.1.1. Mantenimiento de la planta donadora.

En la siguiente figura (Fig 9) se muestra el desarrollo del árbol para la obtención de los explantes.



Figura 9. Desarrollo del árbol durante el programa fitosanitario para la obtención de los explantes. A: primeras yemas; B: generación de brotes; C: Brotes juveniles

#### 7.1.2 Desinfección y siembra de los explantes

Se seleccionaron los explantes adecuados con las características juveniles con coloración verde claro para la inducción de callo. Estos explantes se colocaron en cajas Petri con medio de cultivo como se indica en el cuadro de materiales y métodos. Se realizaron tres siembras en la época de mayo-octubre del 2018 (Cuadro 13).

<b>Cuadro 13: Total de explantes sembrados en la fase de inducción.</b>				
Fecha de siembra	No. de explantes por tratamiento.		Total, de explantes sometidos a inducción.	
	Tallo	Acícula	Tallo	Acícula
<b>Primera siembra 24/05/18</b>	100	150	400	600
<b>Segunda siembra 16/08/15</b>	80	120	320	480
<b>Tercera siembra 29/10/18</b>	60	95	240	360

Debido a la disponibilidad de los explantes deseados se redujo el número de explantes que se usaron en los tratamientos para lograr cumplir el objetivo.

Posterior al método de desinfección para sembrar los explantes a los diferentes tratamientos, estas se monitorearon durante dos semanas posterior a la fecha de siembra y se registró los porcentajes de contaminación de cada una de las siembras realizadas. A continuación se muestra el porcentaje de contaminación para cada siembra (fig.10).

La contaminación fue causada principalmente por hongos endófitos. Un factor determinante de la contaminación sistémica fue la exposición del árbol a precipitaciones que se presentaron durante la época de lluvias, sin embargo, en estas fechas de primavera- verano el árbol prestó un mayor desarrollo de brotes.

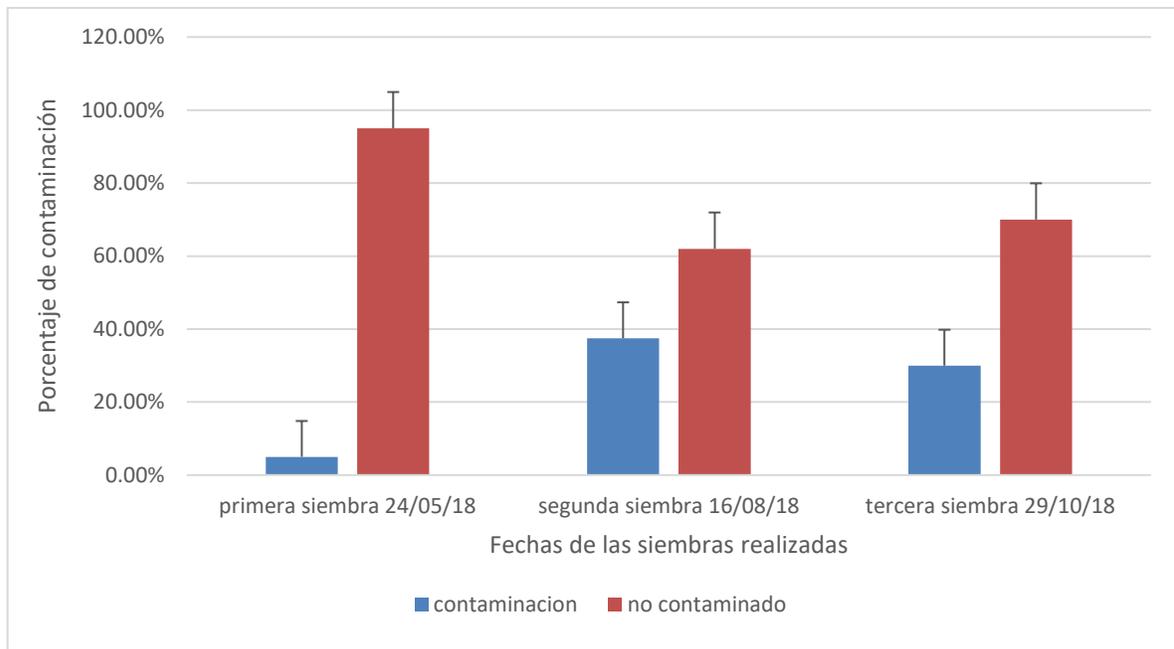


Figura. 10. Gráfico del porcentaje de contaminación registrado en cada una de las siembras.

En la primera siembra la contaminación solo se presentó al 5% sin embargo en la segunda y tercera siembra se registró una contaminación de 38% y 30% respectivamente.

Los explantes que presentaron respuestas iniciales fueron subcultivados en las mismas condiciones y en el mismo medio para continuar con el estímulo para la callogenesis durante los próximos tres meses posteriores a la fecha de siembra. Pasado el mes de la inducción los explantes tanto y de acícula presentaron oxidación, este fenómeno de oxidación se presentó en cada una de las siembras realizadas.

La respuesta de la callogenesis se registró desde que el explante comenzó a hincharse o a desarrollar callo. En cada siembra entre los 13-16 días posteriores a la fecha de inducción los tallos comenzaron a dar respuesta y las acículas entre 30-35 días posteriores de la fecha de inducción.

Finalizado los tres meses posteriores de la fecha de inducción, se realizó un conteo de explantes que tuvieron la respuesta de inducción, en cada una de las siembras, como se muestra a continuación (fig 11 y fig 12).

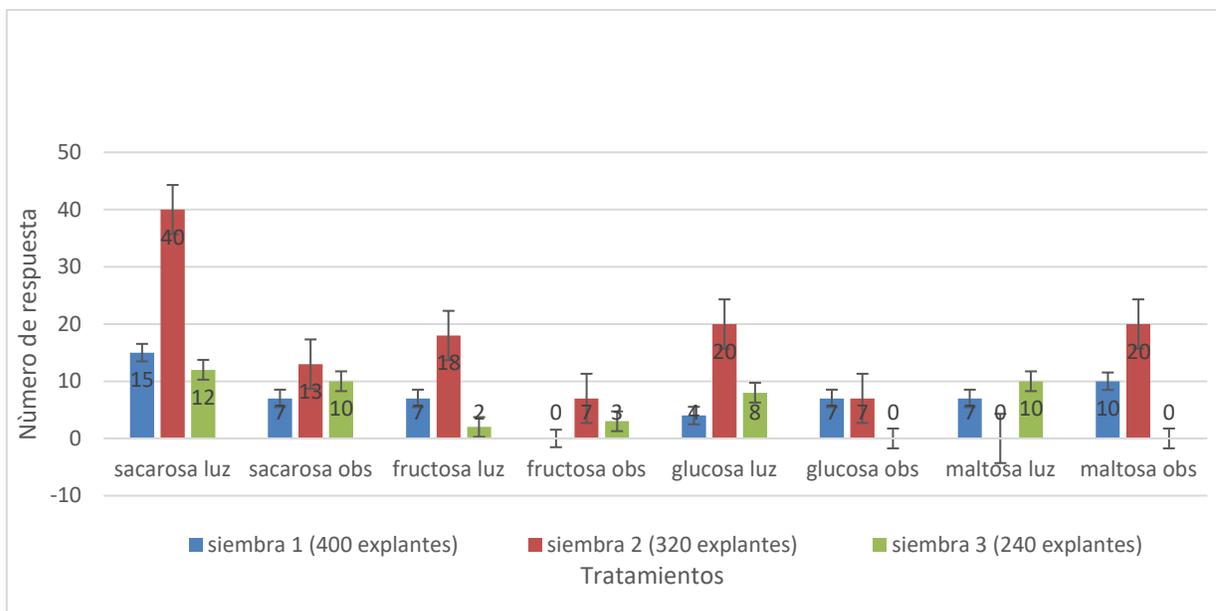


Figura. 11. Gráfico número de explantes de tallo con respuesta después de tres meses de la fecha de inducción.

En el caso de los tallos las tres siembras se obtuvieron mayores respuestas en condiciones de luz, la siembra que se tuvo una mayor respuesta fue la segunda siembra teniendo un total 125 explantes con respuesta, la primera siembra obtuvo un total de 57 explantes con respuesta, y la tercera siembra obtuvo un total de 45 explantes con respuesta siendo esta la siembra que obtuvo menor respuesta.

Los tratamientos que tuvieron una mayor respuesta de callogenesis fueron la sacarosa al 3% seguido de la maltosa al 3%. En sacarosa 3% se registró con 15 en la primera siembra, 40 en la segunda y 12 en la tercera en condiciones de luz; en condiciones de obscuridad 7 en la primera siembra, 13 en la segunda siembra y 10 en la tercera siembra. En maltosa al 3% se registró con 7 en la primera siembra, 0 en la segunda y 10 en la tercera en condiciones de luz; en condiciones de obscuridad 10 en la primera siembra, 20 en la segunda siembra y 0 en la tercera siembra.

Los tratamientos que tuvieron una menor respuesta de callogenesis fue la glucosa al 6% seguido de la fructosa al 3%. En glucosa 6% se registró con 4 en la primera siembra, 20 en la segunda y 8 en la tercera en condiciones de luz; en condiciones de obscuridad 7 en la primera siembra, 7 en la segunda siembra y 0 en la tercera

siembra. En fructosa al 6% se registró con 7 en la primera siembra, 13 en la segunda y 2 en la tercera en condiciones de luz; en condiciones de obscuridad 0 en la primera siembra, 7 en la segunda siembra y 3 en la tercera siembra.

**Cuadro 14: Comparación de las inducciones de callo proveniente de tallo para las tres siembras bajo condiciones de fotoperiodo**

Tratamiento	Condición	Promedio del número de respuesta en las tres siembras
<b>Sacarosa 3%</b>	Fotoperiodo	24.33±13.70 <sup>a</sup>
<b>Fructosa 6%</b>	Fotoperiodo	10.33±6.70 <sup>a</sup>
<b>Glucosa 6%</b>	Fotoperiodo	11.00±8.20 <sup>a</sup>
<b>Maltosa 3%</b>	Fotoperiodo	8.70±9.60 <sup>a</sup>

Media ± SD. Medidas con letras iguales dentro del mismo grupo no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $\alpha=0.05$ )

**Cuadro 15: Comparación de las inducciones de callo proveniente de tallo para las tres siembras bajo condiciones de obscuridad**

Tratamiento	Condición	Promedio del número de respuesta en las tres siembras
<b>Sacarosa 3%</b>	Oscuridad	11.33±3.80 <sup>a</sup>
<b>Maltosa 3%</b>	Oscuridad	10.33±9.50 <sup>a</sup>
<b>Glucosa 6%</b>	Oscuridad	9±3.50 <sup>a</sup>
<b>Fructosa 6%</b>	Oscuridad	4.33±3.78 <sup>a</sup>

Media ± SD. Medidas con letras iguales dentro del mismo grupo no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $\alpha=0.05$ )

No existen diferencias significativas entre los tratamientos utilizando el explante de tallos en ambas condiciones de luz (cuadro 14 y 15).

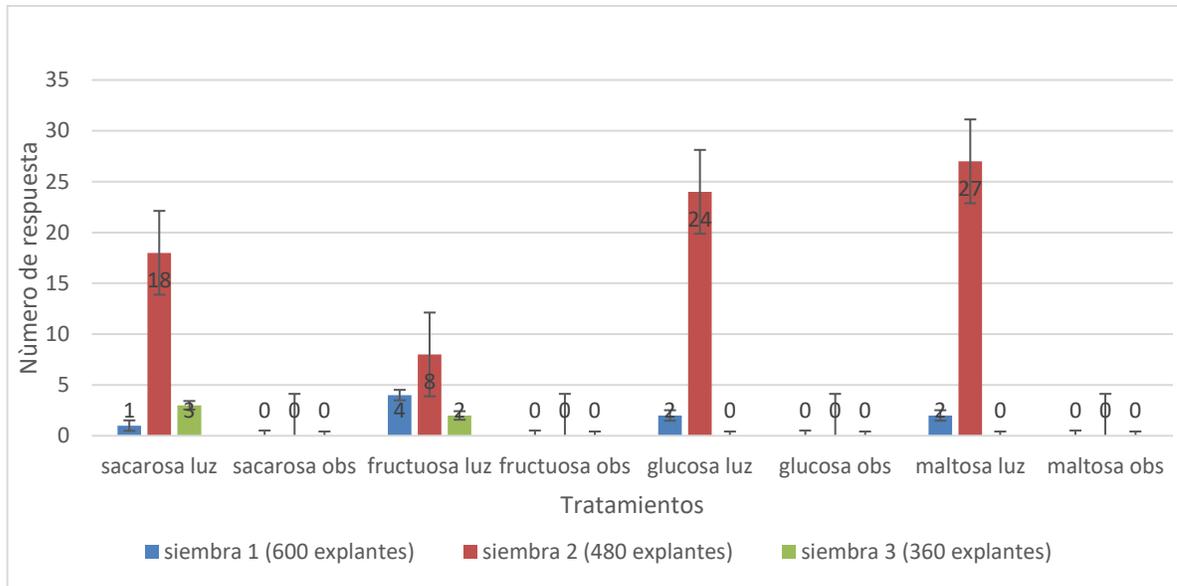


Figura 12. Gráfico de número de explantes de acícula con respuesta después de tres meses de la fecha de inducción.

En el caso de las acículas las tres siembras se obtuvieron respuestas en condiciones de luz, en las de obscuridad no se presentó respuesta, la siembra que obtuvo una mayor respuesta fue la segunda siembra teniendo un total 77 explantes con respuesta, la primera siembra fue la que obtuvo un total de 9 explantes con respuesta, y la tercera siembra tuvo un total de 5 explantes con respuesta siendo esta la siembra que tuvo menor respuesta.

El tratamiento que obtuvo mayores respuestas fue la maltosa 3% seguido de la sacarosa al 3%, la maltosa al 3% se obtuvo 2 respuestas en la primera siembra, 27 en la segunda siembra y en la tercera siembra no se obtuvo respuesta; en sacarosa al 3% se obtuvo 1 respuesta en la primera siembra, 18 en la segunda siembra y 3 en la tercera siembra.

Los tratamientos que obtuvieron menores respuestas fueron la glucosa 6% seguido de la fructosa 6%, la glucosa al 6% se obtuvo 2 respuestas en la primera siembra 24 en la segunda siembra y 0 en la tercera siembra. En el caso de la fructosa 6% 4 en la primera siembra, 8 en la segunda siembra y 2 en la tercera siembra.

**Cuadro 16: Comparación de las inducciones de callo proveniente de acícula para las tres siembras con prueba Tukey 95%.**

Tratamiento	Condición	Promedio del número de respuesta en las tres siembras
<b>Maltosa 3%</b>	Fotoperiodo	9.66±15.04 <sup>a</sup>
<b>Glucosa 6%</b>	Fotoperiodo	8.66±13.31 <sup>a</sup>
<b>Sacarosa 3%</b>	Fotoperiodo	7.33±9.29 <sup>a</sup>
<b>Fructosa 6%</b>	Fotoperiodo	4.66±3.05 <sup>a</sup>

Media ± SD. Medidas con letras iguales dentro del mismo grupo no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $\alpha=0.05$ )

Solo se realizó el análisis estadístico con acículas en condiciones de luz debido a que en oscuridad no se obtuvo respuesta, la acícula no presenta diferencias significativas entre los tratamientos (cuadro 16).

**Cuadro 17: Comparación de las inducciones de callo proveniente de tallo vs callo proveniente de acícula para las tres siembras con prueba Tukey 95%.**

Tratamiento	Explante	Condición	Promedio del número de respuesta en las tres siembras
<b>Sacarosa 3%</b>	Tallo	Fotoperiodo	24.33±13.65 <sup>a</sup>
<b>Sacarosa 3%</b>	Tallo	Oscuridad	11.33±3.78 <sup>ab</sup>
<b>Glucosa 6%</b>	Tallo	Fotoperiodo	11±8.18 <sup>ab</sup>
<b>Fructosa 6%</b>	Tallo	Fotoperiodo	10.33±6.65 <sup>ab</sup>
<b>Maltosa 3%</b>	Tallo	Oscuridad	10.33±9.50 <sup>ab</sup>
<b>Maltosa 3%</b>	Acícula	Fotoperiodo	9.66±15.04 <sup>ab</sup>
<b>Glucosa 6%</b>	Tallo	Oscuridad	9±3.46 <sup>ab</sup>
<b>Glucosa 6%</b>	Acícula	Fotoperiodo	8.66±13.31 <sup>ab</sup>
<b>Maltosa 3%</b>	Tallo	Fotoperiodo	8.66±9.60 <sup>ab</sup>
<b>Sacarosa 3%</b>	Acícula	Fotoperiodo	7.33±9.29 <sup>ab</sup>
<b>Fructosa 6%</b>	Acícula	Fotoperiodo	4.66±3.05 <sup>ab</sup>
<b>Fructosa 6%</b>	Tallo	Oscuridad	4.33±3.78 <sup>ab</sup>
<b>Sacarosa 3%</b>	Acícula	Oscuridad	0 <sup>b</sup>
<b>Fructosa 6%</b>	Acícula	Oscuridad	0 <sup>b</sup>
<b>Glucosa 6%</b>	Acícula	Oscuridad	0 <sup>b</sup>
<b>Maltosa 3%</b>	Acícula	Oscuridad	0 <sup>b</sup>

Media ± SD. Medidas con letras iguales dentro del mismo grupo no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $\alpha=0.05$ )

Al realizar el análisis estadístico y comparar los tratamientos con ambos explantes se observó que es más significativo el utilizar el explante de tallo en el tratamiento

de sacarosa al 3% en condiciones de fotoperiodo por lo que indica que el mejor tratamiento es la sacarosa al 3% y que se puede usar como explante los tallos e inducirlos en condiciones de luz para obtener mayores respuestas de formación de callos (cuadro 17).

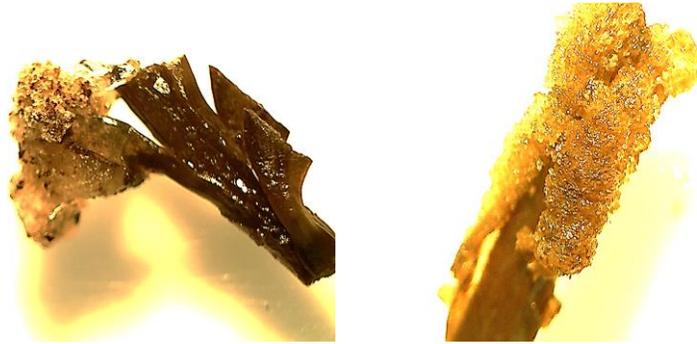


Figura 13. Formación del callo a partir del tejido madre visto en el microscopio 10x A: explante de tallo; B: explante de acícula.

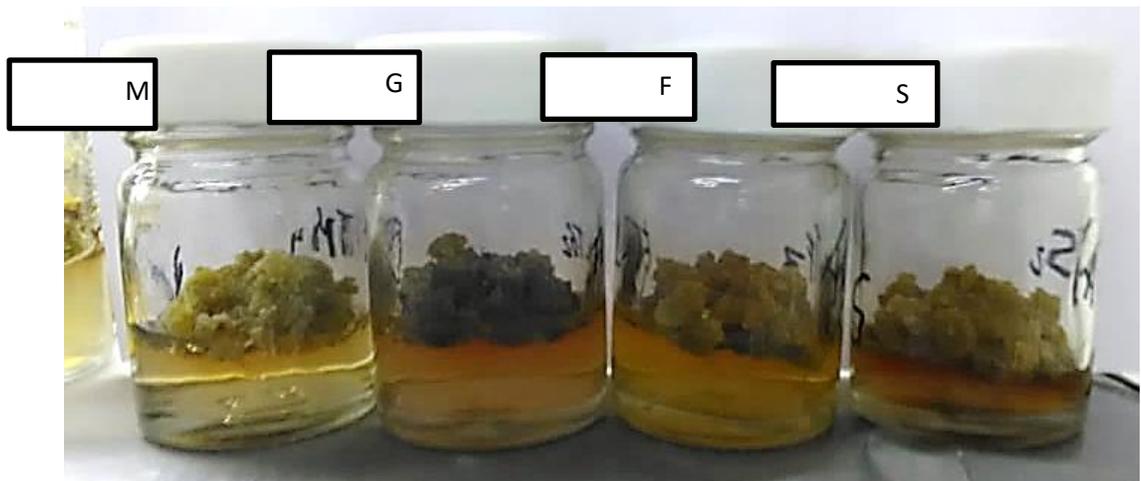


Figura 14. Callos resultantes después de 35 días la etapa de inducción subcultivado en los diferentes tipos de carbohidratos (M: maltosa, G: Glucosa, F: fructosa, S: Sacarosa) para los explantes de acícula

Una vez obtenido los callos en las inducciones , con ayuda de pinzas y bisturí fueron separadas del tejido madre (fig. 13) en pequeños frascos de 30ml (fig. 14) para continuar con su crecimiento, este callo obtenido era de tipo friable, en condiciones de luz presentó una coloración verde y en condiciones de obscuridad este callo presentó una coloración blanquecina, pero con el paso de los subcultivos comenzó a oxidarse y ponerse en un color marrón en ambas condiciones, sin embargo la

cantidad de callo obtenido fue muy poco y tardó 2 años después de la inducción en formar un lote que pudiera ser analizado y ser cuantificable tanto para luz como oscuridad.

Para realizar las siguientes fases de la ruta crítica y obtener los resultados de los siguientes experimentos, se entregaron frascos de callo provenientes de acícula y tallo con 1 año después de su inducción, estos callos tenían un alto grado de oxidación, y fueron subcultivados hasta que bajaran su grado de oxidación, estos callos provenían en condiciones control y en condiciones de luz.

## 7.2 Mantenimiento

Los callos fueron adecuados en los tratamientos que se utilizaron en la inducción para observar sus efectos de oxidación y presencia de callos verdes durante un periodo de subcultivo de 6 meses. El registro comenzó a partir de que los callos hayan tenido un mes en la fuente de carbono y siguió su registro hasta el sexto mes de subcultivo.

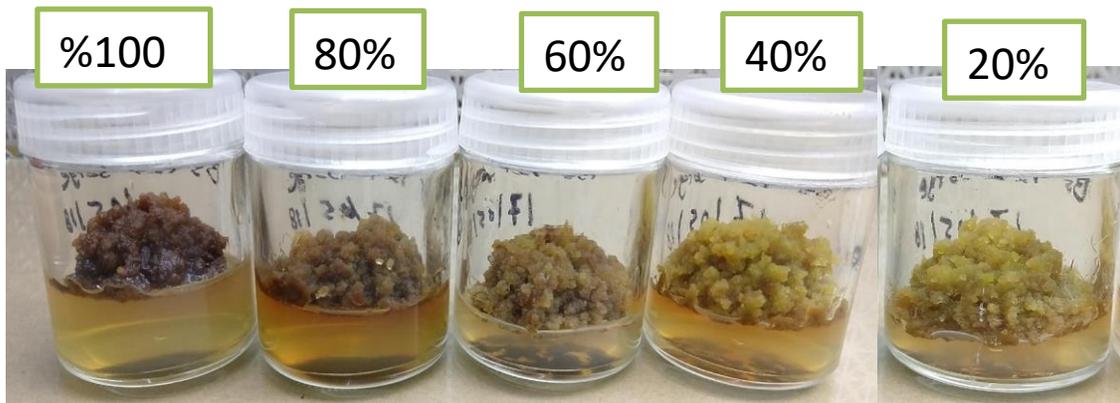


Figura 15. Escala de oxidación y presencia de callos verdes que presento durante el proceso de mantenimiento.

En la fig. 15 se presenta una escala de mantenimiento, siendo el 10% el callo totalmente verde y el medio traslucido con poca oxidación, el 20% un callo verde con oxidación en el medio, 40% callo parcialmente oxidado y con medio de oxidado. 60% la mitad del callo oxidado y la mitad con presencia de callo verde con medio oxidado, 80% con medio oxidado y parcialmente presencia de callo verde y el 100% el medio oxidado y todo el callo presente de oxidado de color negruzco.

### 7.2.1 Oxidación.

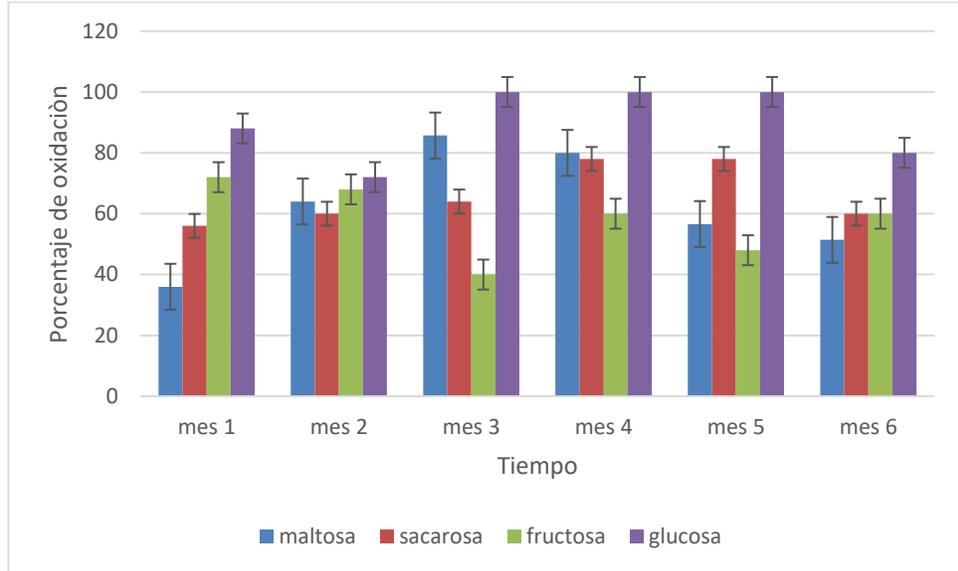


Figura 16. Gráfico de oxidación promedio mensual en los callos de tallo durante seis meses de subcultivo

todos los tratamientos se oxidaron, pero la que tuvo menor oxidación fue la fructosa durante el subcultivo tendiendo a un nivel bajo del 60%, sin embargo, en el tratamiento de maltosa comienza con una baja oxidación y aumenta al paso del subcultivo y termina siendo más baja al final de los seis meses con una oxidación del 50%, la glucosa fue la que presentó mayor porcentaje de oxidación durante el subcultivo (fig. 16).

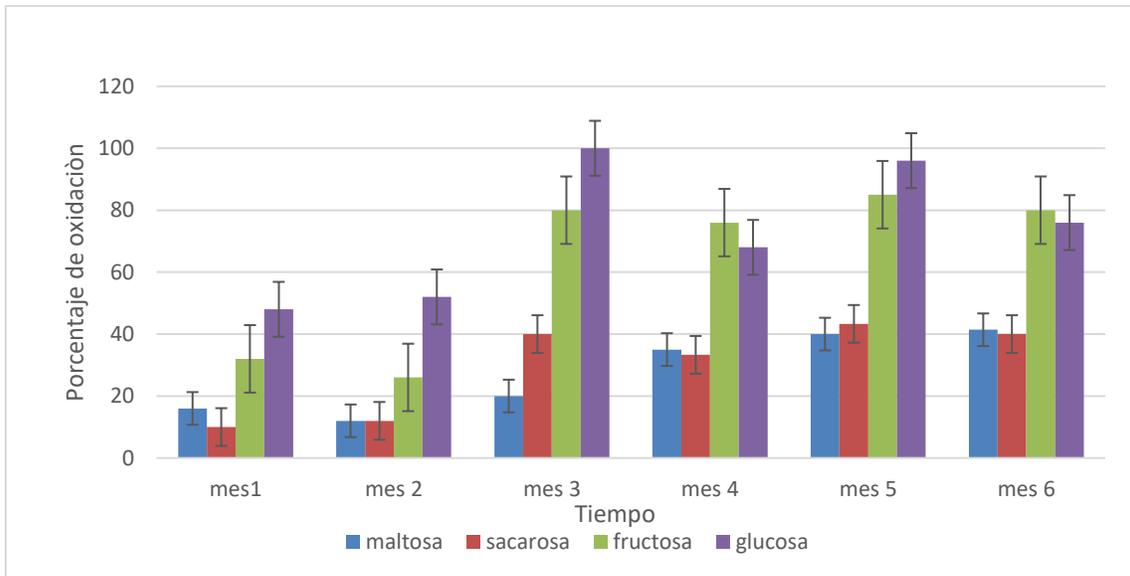


Figura. 17. Gráfico oxidación promedio mensual en los callos de acícula durante seis meses de subcultivo.

En el caso de la acícula (fig.17) al igual que el tallo se presenta la oxidación de los callos, sin embargo, los tratamientos de sacarosa y maltosa se presentó una menor oxidación en los callos con un aproximado de 40% al final de los 6 meses, siendo la maltosa la que con el paso de los subcultivos presento una baja oxidación. La fructosa y la glucosa presentaron las más altas oxidaciones siendo la glucosa aquella que presenta la mayor oxidación 80-90% durante el paso de los subcultivos.

### 7.2.2 Presencia de callo verde

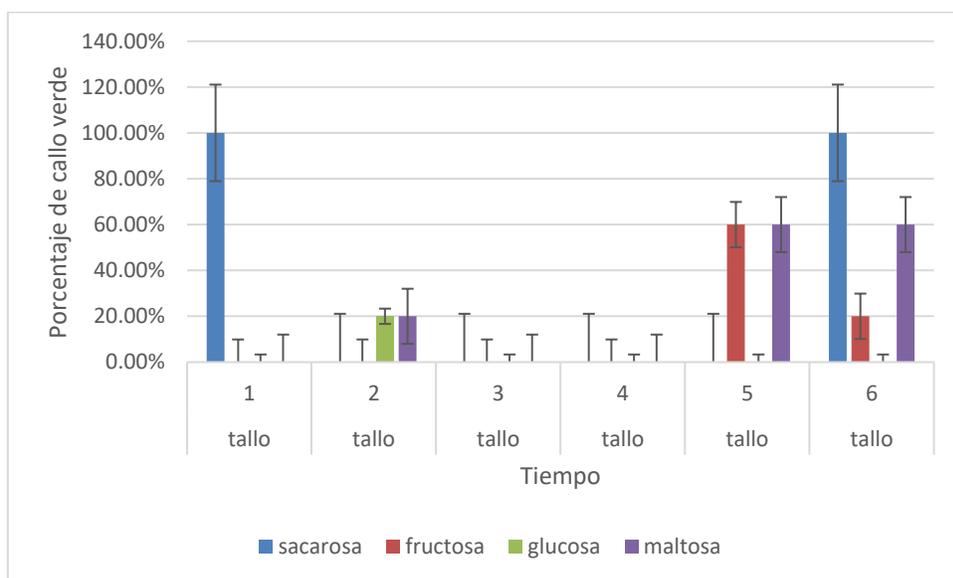


Figura. 18. Gráfico callo verde presente en tallos en los tratamientos durante 6 meses

Durante los subcultivos no se presentó mucho la aparición de callos verdes, a partir del subcultivo desde el mes 1 este fue desapareciendo y solo los tratamientos que lo presentan al final en mayor presencia son la sacarosa y la maltosa (fig. 18).

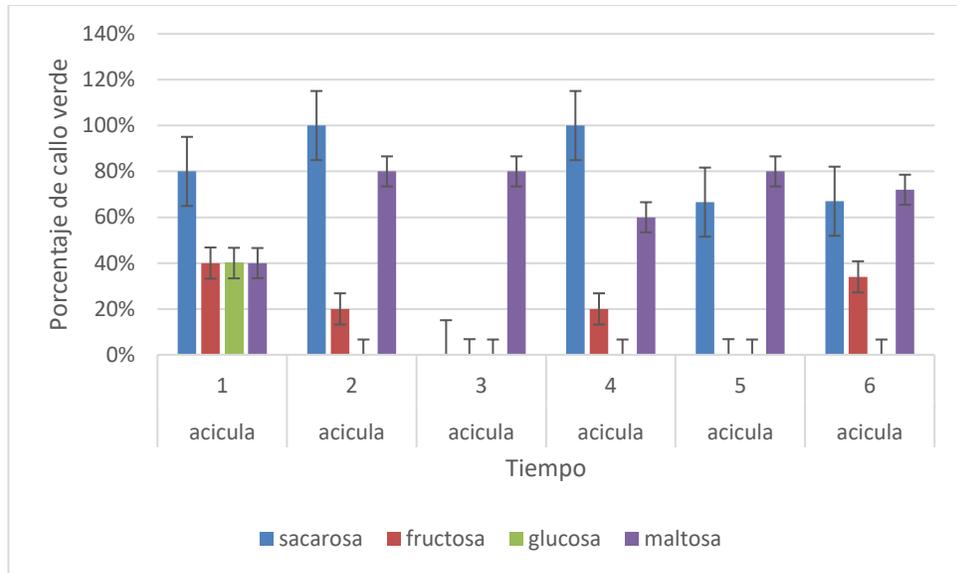


Figura.19. Gráfico de tallo verde presente en acículas en los tratamientos durante 6 meses.

En el caso de la acícula (fig. 19), los callos pueden conservar su estado verde durante los subcultivos la sacarosa seguido de la maltosa fueron los tratamientos que presentan los porcentajes de presencia de callos verde más alta y casi durante todo el periodo de subcultivo, la fructosa presenta niveles bajos de esta característica y la glucosa pierde durante los subcultivos la característica verde.

En comparación de los dos explantes los callos provenientes de acícula se adecuaron en los medios con diferente fuente de carbono ya que presentan oxidación más bajas, altas y continuas presencias de callo verde.



Figura. 20. Vista de los callos de tallo observados en microscopio electrónico 10x.

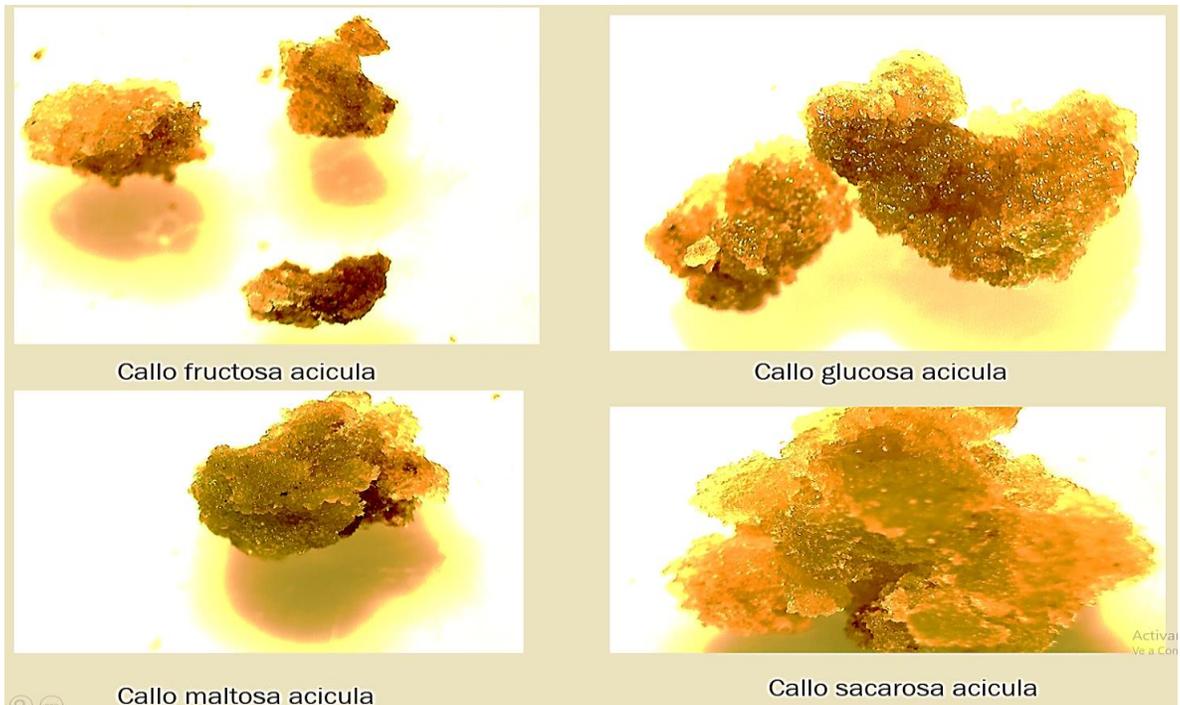


Figura.21. Vista de los callos de tallo observados en microscopio electrónico 10x

Los callos de acícula presentan una mejor calidad durante los subcultivos.

### 7.3 Proliferación de callos

Las cinéticas de crecimiento de peso fresco se realizaron seleccionando callo con un menor grado de oxidación y con un peso inicial de 0.5g en cada repetición destinados a cada tratamiento.

En las condiciones control que son sacarosa al 3% se observó diferentes fases de la cinética de crecimiento (fig. 20), en la primera semana se puede observar la fase lag, posterior a los 7 días comienza la fase exponencial y termina hasta el 21 día ya que después de ese día comienza una fase estacionaria en ambos callos. Sin embargo, los callos de tallo se muestran más prolíferos con un peso final registrado de 0.75g, ya que los callos de acícula presentan un peso final de 0.665 g.

En el siguiente gráfico (fig. 21) se puede observar que la coloración verde se presenta en ambos explantes, sin embargo, en los callos de acícula no se presenta oxidación y la coloración verde intensa, en comparación de los callos de tallo que presentan oxidación.

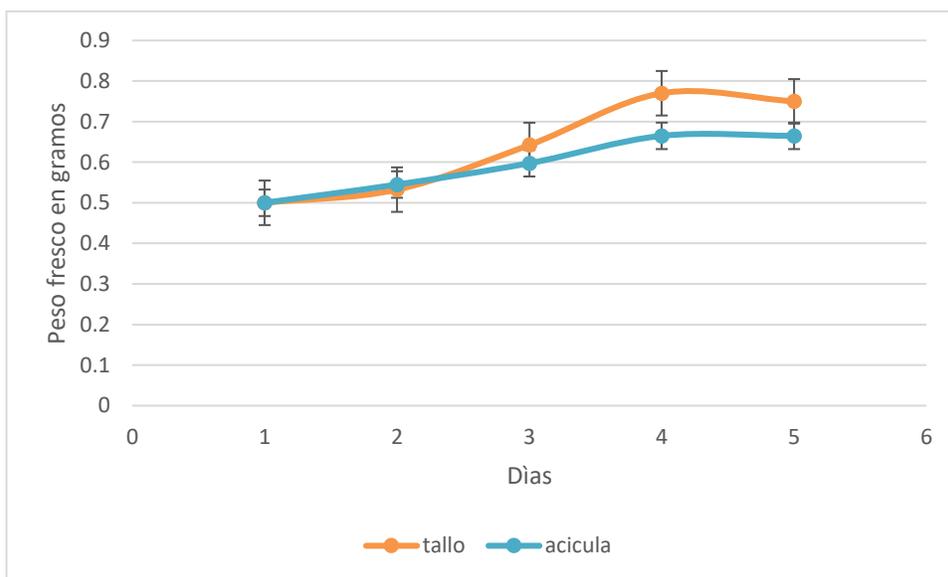


Figura 22. Gráfico de la cinética de crecimiento de callos en condiciones control (Sacarosa 3%) en ambos explantes

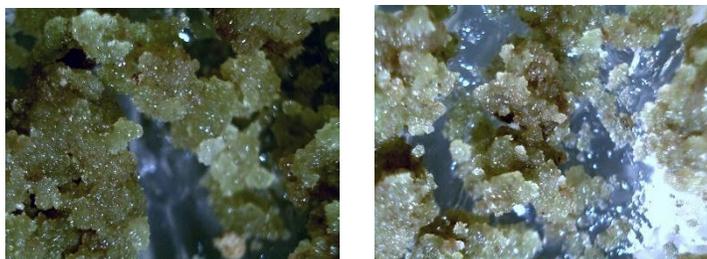


Figura 23. Callos de acícula y tallo vistas al microscopio 10x

En el caso de los tratamientos de glucosa sometidos a concentraciones 0.5,3,6 % (fig. 22 y 23), la concentración de 0.5% de glucosa utilizado en los cultivos de callos provenientes de tallos y acícula presentó una fase lag en la primera semana después del inicio de la cinética, a partir de los 7 días comienza la fase exponencial y continúa así hasta el día 28 en caso del callo de acícula con un peso final de 0.9325g, sin embargo, en el callo de tallo a partir del día 21 comienza la fase de muerte celular resultando un peso final de 0.695 g.

Para las concentraciones 3 y 6 % comenzaron la fase lag en los primeros 7 días, posterior a esto el peso de los callos comenzó a decaer y siguió esa tendencia baja hasta el 28 día tanto en callos de acícula como de tallo.

La concentración de 0.5% fue la que conservó la coloración verde en ambos callos. Aunque en los tallos esta condición se conserva de mejor manera y la oxidación alta se presenta en concentración de 6% (fig. 24 y 25).

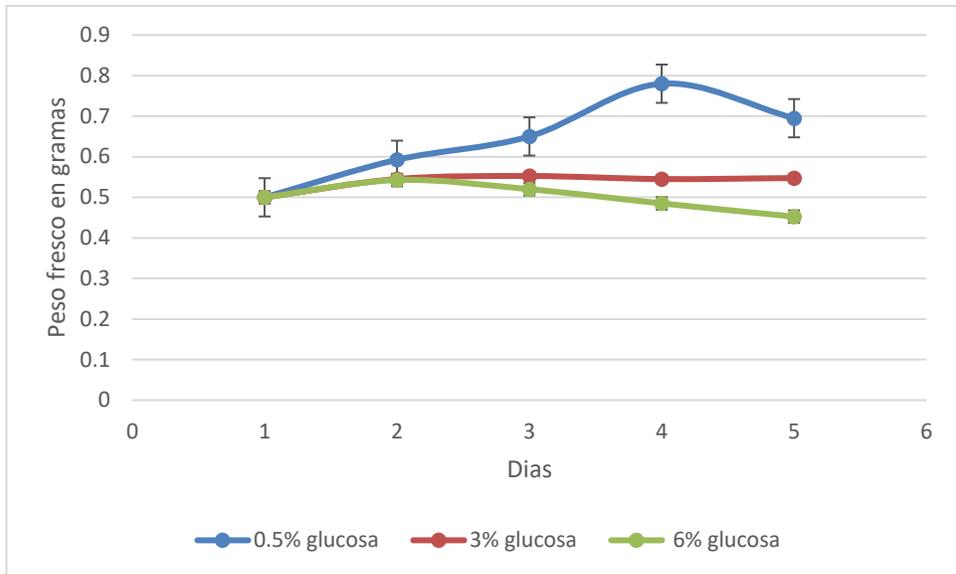


Figura 24. Gráfico de la cinética de crecimiento de callos de tallo en tratamientos de glucosa.

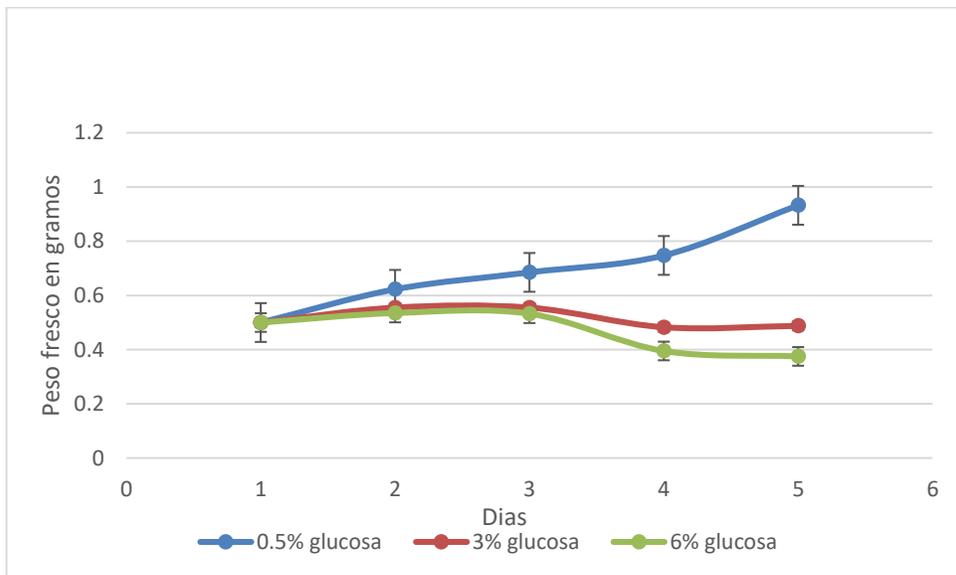


Figura 25. Gráfico de la cinética de crecimiento de callos de acícula en tratamientos de glucosa.



Fig. 26. Callo de acícula sometido a diferentes concentraciones de glucosa A: 0.5%; B: 3%; C:6%.



Fig. 27. Callos de tallo sometido a diferentes concentraciones de glucosa A: 0.5%; B: 3%; C:6%.

En el caso de la fructosa en concentraciones 6,8 y 10% (fig. 28 y 29) en las concentraciones 6 y 8% en ambos callos, la fase comenzó las primeras 2 semanas, a partir del día 14 la fase exponencial comenzó y siguió así hasta el último día de registro. Sin embargo, la que tuvo mayor proliferación fue la concentración de 6% para el caso del tallo tuvo un peso final de 1.43g y para la acícula tuvo un peso final de 1.18g; para la concentración de 10% utilizada en ambos callos, no mostro ningún cambio significativo, tuvo una tendencia lineal en todo el registro.

Como se puede observar en las figuras 30 y 31 la concentración la coloración verde de los callos no se mantienen, se presenta una coloración amarillenta sin embargo en las 6 y 8 % se presenta un grado de oxidación menor en comparación al 10%, los callos de tallos 6% de fructosa presentó una mejor condición en todos los casos.

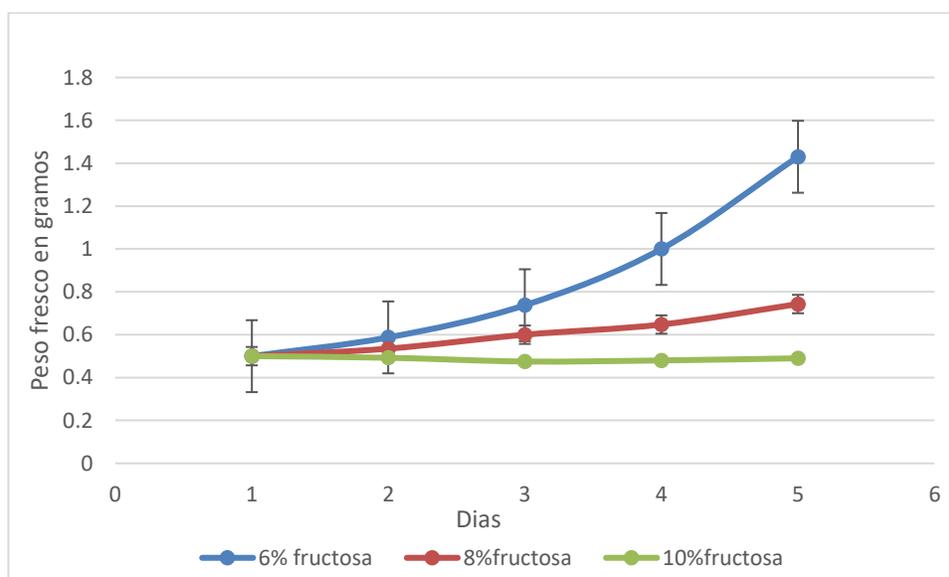


Figura 28. Gráfico de la cinética de crecimiento de callos de tallo sometido a fructosa

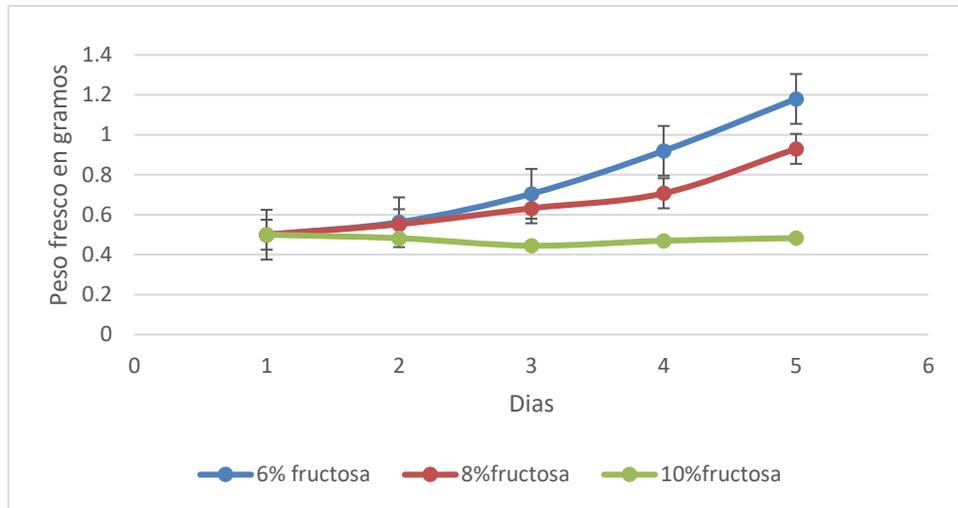


Figura. 29. Gráfico de la cinética de crecimiento de callos de acícula sometido a fructosa



Fig. 30. Callos acícula sometidos en diferentes concentraciones de fructosa A: 6%; B: 8%; C: 10%

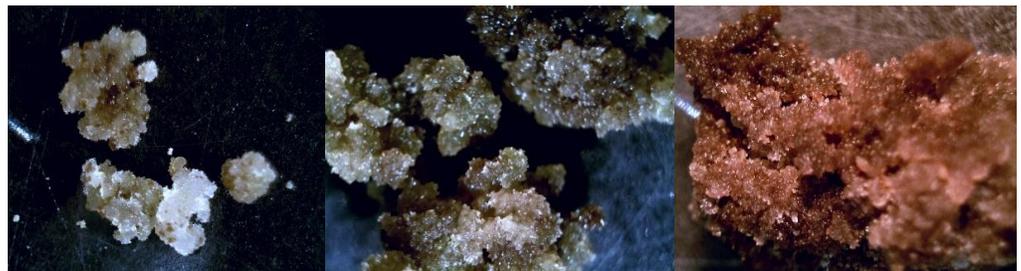


Fig. 31. Callos tallos sometidos en diferentes concentraciones de fructosa A: 6%; B: 8%; C: 10%

Para el caso de los callos sometidos a maltosa en concentraciones de 3,4,5,7% (fig. 32 y 33) en ambos callos a partir de la primera semana se presentó la fase lag y después de los 7 días se ve la fase exponencial, sin embargo, en el caso del tallo las concentraciones de 3 y 4.5 este comportamiento se cumplió, solo que en las concentraciones de 7% se ve la fase lag por más tiempo y tienen una fase exponencial a partir del día 21. En el caso de la acícula ocurrió el mismo comportamiento solo que a partir del 21 día hay un decaimiento, se puede observar

la concentración 3% se la que obtuvo mayor proliferación para el tallo se registró un peso final de 0.7275g y para la acícula se presentó un peso final de 0.755g.

En todas las concentraciones se observó que se presentó la coloración verde de los callos, sin embargo, los callos de acícula presentaron pocos grados de oxidación y en los callos de tallo se conservó la coloración verde y se observó grados de oxidación más altos en comparación de los callos de acícula (fig 33 y 34).

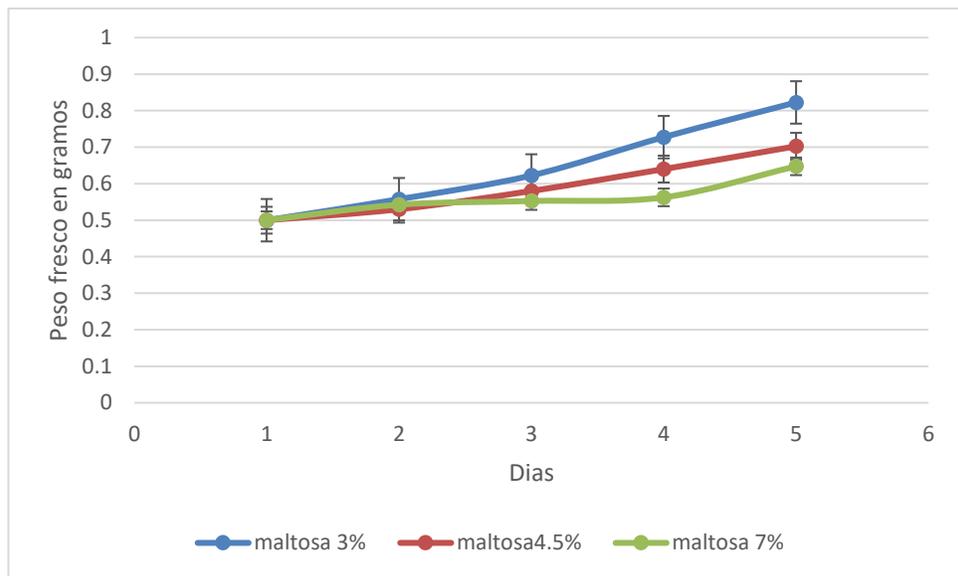


Figura.32. Gráfico de la cinética crecimiento de callo de tallo sometido a maltosa

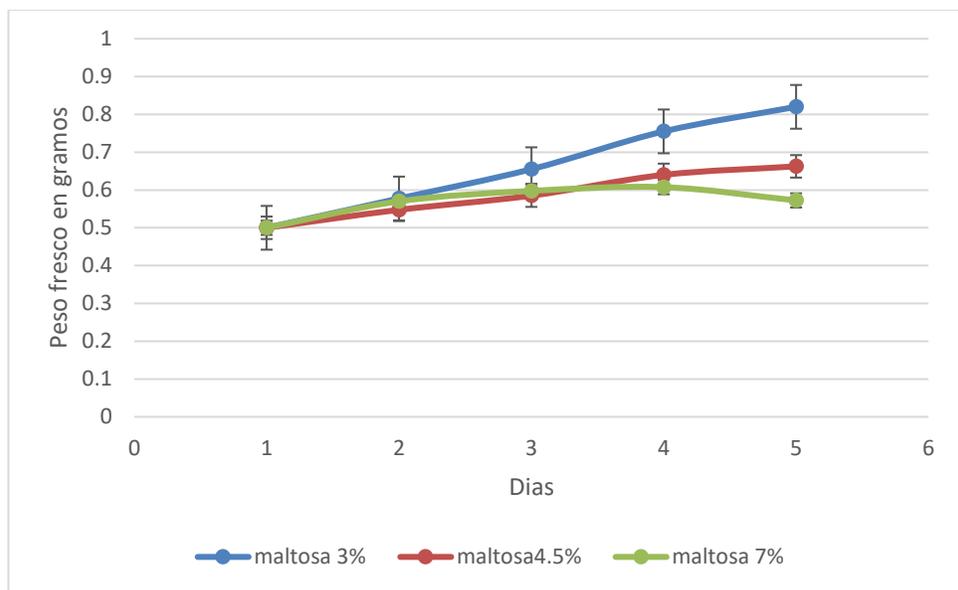


Figura 33. Gráfico de la cinética de crecimiento de callo de acícula sometido a maltosa



Figura 34. Callos de acícula sometidos a diferentes concentraciones de maltosa A: 3%; B: 4.5%; C: 7%.



Figura 35. Callos de tallo sometidos a diferentes concentraciones de maltosa A: 3%; B: 4.5%; C: 7%.

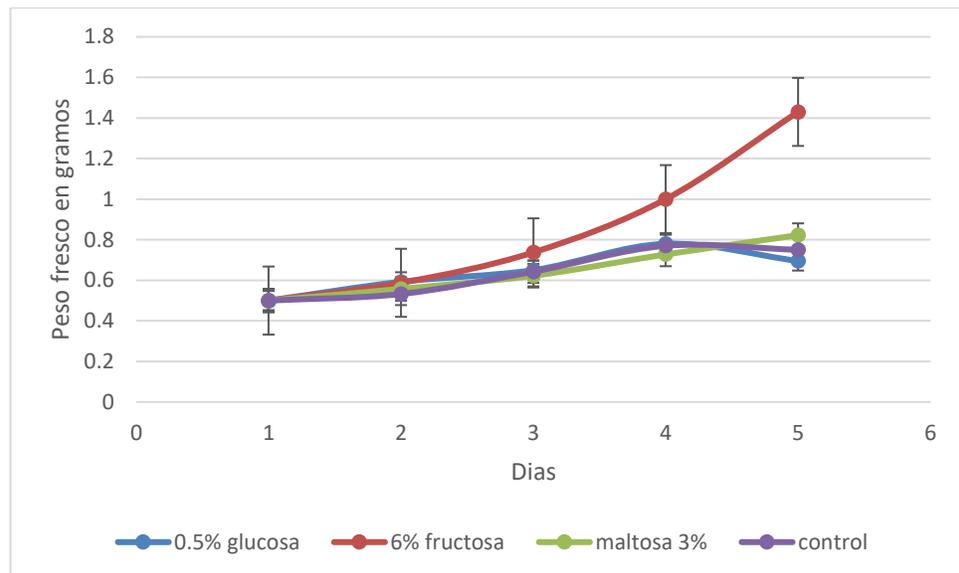


Figura 36. Gráfico de la cinética de crecimiento de callo de tallo comparando las concentraciones óptimas resultantes de cada una de las fuentes de carbono

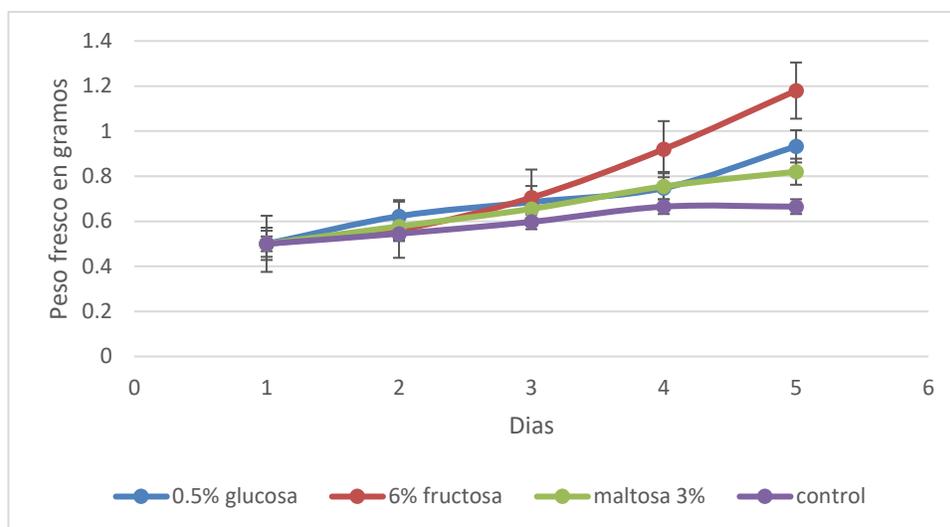


Figura 37. Gráfico de la cinética de crecimiento de callo de acícula comparando las concentraciones óptimas resultantes de cada una de las fuentes de carbono

Al hacer una comparación con los mejores resultados (fig. 36 y 37) se puede observar que la fructosa da una mayor producción de callos tanto en acícula como en tallo, sin embargo, también la proliferación del callo es dependiente del tipo de azúcar, debido a la tendencia que se mostró en las gráficas indican que en los callos de acícula proliferaron al utilizar glucosa y en el tallo maltosa y fructosa.

Sin embargo, la oxidación se presenta en mayor intensidad en glucosa, en fructosa no se enverdecen los callos y la maltosa mantienen todos los callos verdes.

**Cuadro 18: Comparación de las cinéticas de crecimiento de diferentes concentraciones de azúcar de callos provenientes de acícula prueba Tukey 95%**

Tratamiento	Peso fresco del último día de cinética de crecimiento para cada ensayo de acícula
Fructosa 6%	1.17±0.05 <sup>a</sup>
Glucosa 0.5%	0.93±0.25 <sup>ab</sup>
Fructosa 8%	0.92±0.17 <sup>ab</sup>
Maltosa 3%	0.82±0.08 <sup>ab</sup>
Sacarosa 3%	0.66±0.05 <sup>ab</sup>
Maltosa 4.5%	0.66±0.08 <sup>ab</sup>
Maltosa 7%	0.57±0.054 <sup>ab</sup>
Glucosa 3%	0.48±0.06 <sup>ab</sup>
Fructosa 10%	0.48±0.16 <sup>b</sup>
Glucosa 6%	0.37±0.25 <sup>b</sup>

Media  $\pm$  SD. Medidas con letras iguales dentro del mismo grupo no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

**Cuadro 19: Comparación de las cinéticas de crecimiento de diferentes concentraciones de azúcar de callos provenientes de tallos prueba Tukey 95%**

Tratamiento	Peso fresco del último día de cinética de crecimiento para cada ensayo de tallo
Fructosa 6%	1.42 $\pm$ 0.74 <sup>a</sup>
Maltosa 3%	0.82 $\pm$ 0.11 <sup>ab</sup>
sacarosa 3%	0.75 $\pm$ 0.018 <sup>ab</sup>
Fructosa 8%	0.74 $\pm$ 0.21 <sup>ab</sup>
Maltosa 4.5%	0.70 $\pm$ 0.09 <sup>ab</sup>
glucosa 0.5%	0.69 $\pm$ 0.49 <sup>ab</sup>
Maltosa 7%	0.64 $\pm$ 0.08 <sup>ab</sup>
Glucosa 3%	0.54 $\pm$ 0.027 <sup>b</sup>
Fructosa 10%	0.48 $\pm$ 0.075 <sup>b</sup>
Glucosa 6%	0.45 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>

Media  $\pm$  SD. Medidas con letras iguales dentro del mismo grupo no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

**Cuadro 20: Comparación de las cinéticas de crecimiento de diferentes concentraciones de azúcar de callos provenientes acícula vs callos provenientes de tallos prueba Tukey 95%**

Tratamiento	Explante	Peso fresco del último día de cinética de crecimiento para cada ensayo de tallo
Fructosa 6%	Tallo	1.42 $\pm$ 0.74 <sup>a</sup>
Fructosa 6%	Acicula	1.17 $\pm$ 0.05 <sup>ab</sup>
Glucosa 0.5%	Acicula	0.93 $\pm$ 0.25 <sup>ab</sup>
Fructosa 8%	Acicula	0.92 $\pm$ 0.17 <sup>ab</sup>
Maltosa 3%	Acicula	0.82 $\pm$ 0.08 <sup>ab</sup>
Maltosa 3%	Tallo	0.82 $\pm$ 0.11 <sup>ab</sup>
Sacarosa 3%	tallo	0.75 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>
Fructosa 8%	Tallo	0.74 $\pm$ 0.21 <sup>ab</sup>
Sacarosa 3%	acicula	0.75 $\pm$ 0.018 <sup>ab</sup>
Maltosa 4.5%	tallo	0.70 $\pm$ 0.09 <sup>ab</sup>
Glucosa 0.5%	Tallo	0.69 $\pm$ 0.49 <sup>ab</sup>
Maltosa 4.5%	acicula	0.66 $\pm$ 0.08 <sup>ab</sup>
Maltosa 7%	tallo	0.64 $\pm$ 0.08 <sup>ab</sup>
Maltosa 7%	Acicula	0.57 $\pm$ 0.054 <sup>ab</sup>
Glucosa 3%	Tallo	0.54 $\pm$ 0.027 <sup>a<sup>b</sup></sup>
Glucosa 3%	Acicula	0.48 $\pm$ 0.066 <sup>b</sup>
Fructosa 10%	tallo	0.48 $\pm$ 0.075 <sup>b</sup>
Fructosa 10%	Acicula	0.48 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>
Glucosa 6%	Tallo	0.45 $\pm$ 0.047 <sup>b</sup>

<b>Glucosa 6%</b>	Acicula	0.45±0.047 <sup>b</sup>
-------------------	---------	-------------------------

Media ± SD. Medidas con letras iguales dentro del mismo grupo no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $\alpha=0.05$ )

El análisis de varianza indica que en ambos explantes se puede observar que es significativo usar fructosa 6%, en los tallos se puede observar otra significancia que es el tratamiento de glucosa al 3% y en acícula se puede observar que es fructosa al 10% sin embargo ambos casos no presentan una gran proliferación de callos, pero si muestran una significancia notoria al utilizar estos azúcares en estas concentraciones (cuadro 18 y 19). Al comparar los tratamientos entre los explantes se puede observar que el tratamiento de fructosa al 6% en callos provenientes de tallos son significativos y dan una mayor proliferación de callos en todos los casos, y la acícula sometida en glucosa al 3% presenta otra significancia, pero da una baja proliferación de callo (cuadro 20 ).

#### **7.4 Suspensiones celulares.**

Para establecer los cultivos celulares y realizar las cinéticas de crecimiento se utilizaron los callos en condiciones control, estos a los 14 días posteriores pasaron a ser cultivos madre de células en suspensión y se dejan incubar durante dos semanas pasado este tiempo se realizaron las inoculaciones en los diferentes tratamientos.

En los pesos frescos (fig. 37 y 38) se puede ver tendencias muy variadas, sin embargo, los tratamientos de glucosa y fructosa tienen una tendencia creciente y en los de sacarosa y maltosa tienen una tendencia decreciente para ambos tipos de callo.

En los pesos secos (fig. 36 y 39) se puede observar que los tratamientos de control, maltosa y glucosa presentan la misma tendencia, sin embargo, la fructosa presenta una tendencia más alta y decreciente en comparación a los demás.

Se puede observar que existe una proliferación celular mayor en los callos de acícula que en los callos de tallo. También las suspensiones tuvieron una mayor oxidación los tallos de glucosa y fructosa, posteriormente la maltosa y sacarosa. Las

acículas en glucosa y fructosa no presentaron mucha oxidación seguido de la maltosa y sacarosa (fig. 40).

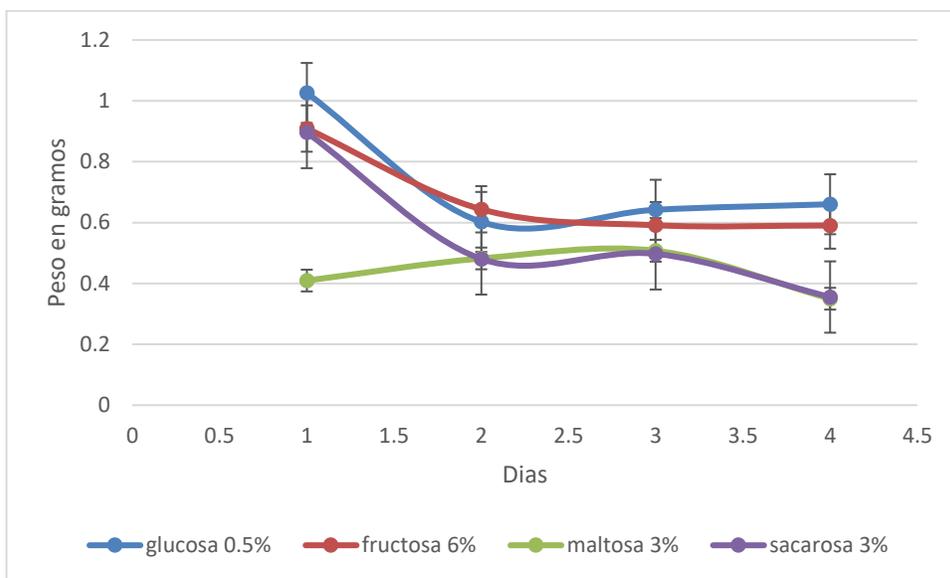


Figura 38. Gráfico de la cinética de crecimiento de suspensiones celulares de tallo peso fresco

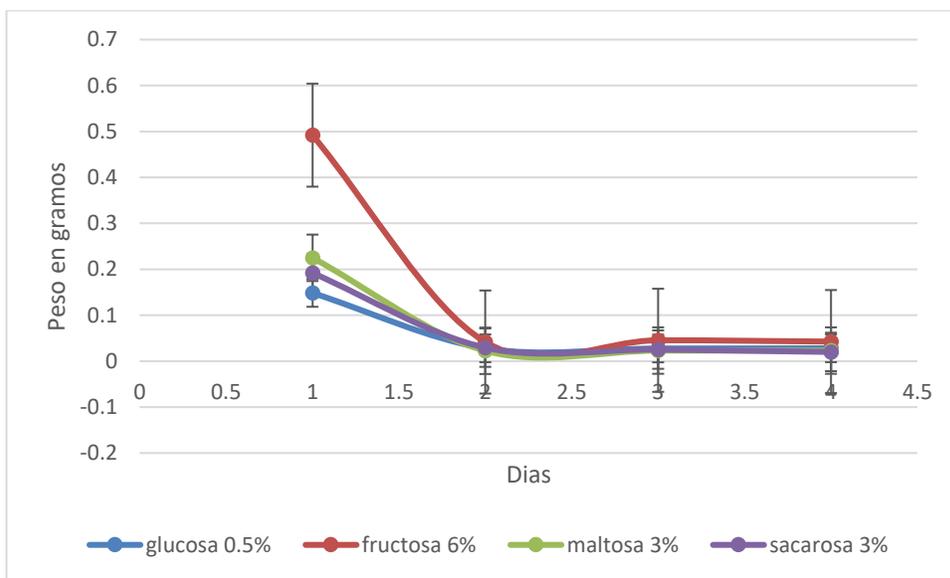


Figura 39. Gráfico de la cinética de crecimiento de suspensiones celulares tallo de peso seco

**Cuadro 21: Comparación de las cinéticas de las suspensiones celulares de peso fresco de callos provenientes de tallos prueba Tukey 95%.**

Tratamiento	Peso fresco del último día de cinética de crecimiento
Glucosa 0.5%	0.66±0.03 <sup>a</sup>
Fructosa 6%	0.59±0.01 <sup>a</sup>
Sacarosa 3%	0.35±0.05 <sup>a</sup>
Maltosa 3%	0.34±0.004 <sup>a</sup>

Media ± SD. Medidas con letras iguales dentro del mismo grupo no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

**Cuadro 22: Comparación de las cinéticas de las suspensiones celulares de peso seco de callos provenientes de tallos prueba Tukey 95%.**

Tratamiento	Peso fresco del último día de cinética de crecimiento
Fructosa 6%	0.042±0.002 <sup>a</sup>
Glucosa 0.5%	0.02±0.0005 <sup>a</sup>
Maltosa 3%	0.02±0.001 <sup>a</sup>
Sacarosa 3%	0.02±0.002 <sup>a</sup>

Media ± SD. Medidas con letras iguales dentro del mismo grupo no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

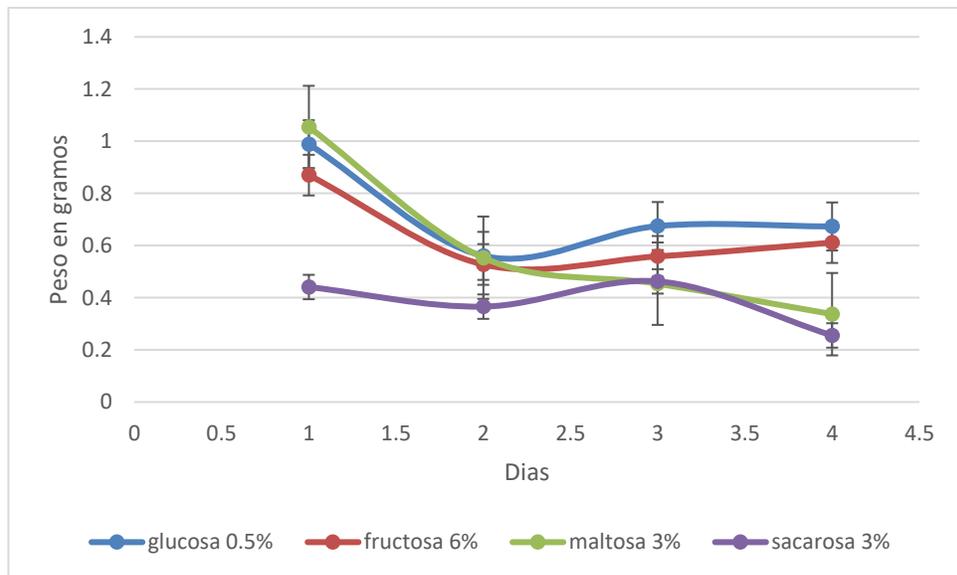


Figura 40. Gráfico de la cinética de crecimiento de suspensiones celulares de acícula de peso fresco

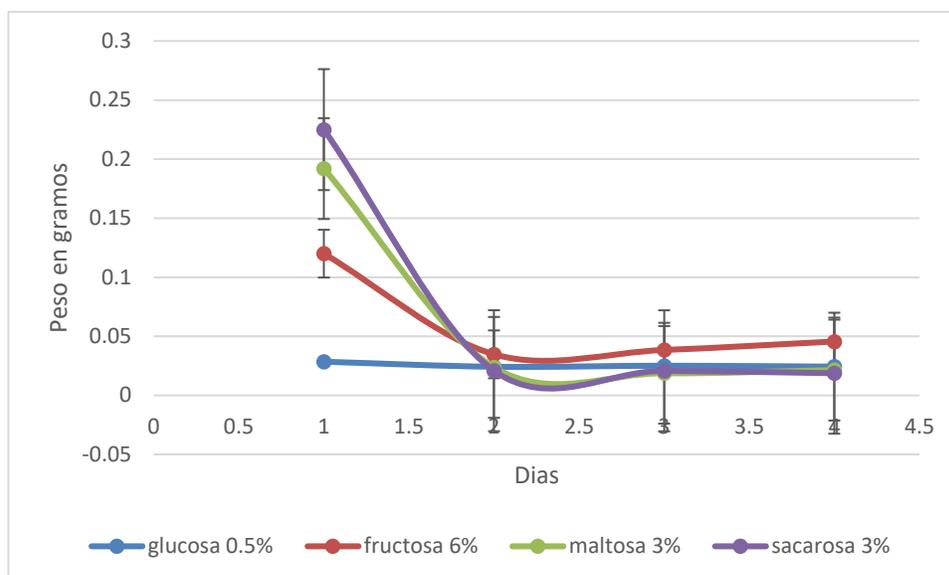


Figura 41. Gráfico de la cinética de crecimiento de suspensiones celulares de acícula de peso seco

**Cuadro 23: Comparación de las cinéticas de las suspensiones celulares de peso fresco de callos provenientes de acícula prueba Tukey 95%**

Tratamiento	Peso fresco del último día de cinética de crecimiento
<b>Glucosa 0.5%</b>	0.67±0.12 <sup>a</sup>
<b>Fructosa 6%</b>	0.61±0.07 <sup>a</sup>
<b>Maltosa 3%</b>	0.33±0.01 <sup>a</sup>
<b>Sacarosa 3%</b>	0.25±0.03 <sup>a</sup>

Media ± SD. Medidas con letras iguales dentro del mismo grupo no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

**Cuadro 24: Análisis de varianza (ANOVA) de las cinéticas de las suspensiones celulares de peso seco de callos provenientes de acícula prueba Tukey 95%**

Tratamiento	Peso fresco del último día de cinética de crecimiento
<b>Fructosa 6%</b>	0.04±0.001 <sup>a</sup>
<b>Glucosa 0.5%</b>	0.02±0.001 <sup>a</sup>
<b>Maltosa 3%</b>	0.02±0.0007 <sup>a</sup>
<b>Sacarosa 3%</b>	0.01±0.0008 <sup>a</sup>

Media ± SD. Medidas con letras iguales dentro del mismo grupo no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).



Figura 42. Comparación de los diferentes cultivos celulares de cada explante sometido a cada tratamiento que presento condiciones favorables en su crecimiento en los callos.

**Cuadro 25: Comparación de las cinéticas de las suspensiones celulares de peso fresco de callos provenientes de acícula vs callos provenientes de tallo prueba Tukey 95%.**

Tratamiento	Explante	Peso fresco del último día de la cinética de crecimiento
<b>Glucosa 0.5%</b>	Acícula	0.67±0.12 <sup>a</sup>
<b>Glucosa 0.5%</b>	Tallo	0.66±0.03 <sup>a</sup>
<b>Fructosa 6%</b>	Acícula	0.611±0.074 <sup>a</sup>
<b>Fructosa 6%</b>	Tallo	0.59±0.010 <sup>a</sup>
<b>Sacarosa 3%</b>	Tallo	0.35±0.05 <sup>a</sup>
<b>Maltosa 3%</b>	Tallo	0.34±0.004 <sup>a</sup>
<b>Maltosa 3%</b>	Acícula	0.33±0.01 <sup>a</sup>
<b>Sacarosa 3%</b>	Acícula	0.25±0.03 <sup>a</sup>

Media ± SD. Medidas con letras iguales dentro del mismo grupo no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

**Cuadro 26: Comparación de las cinéticas de las suspensiones celulares de peso seco de callos provenientes de acícula vs callos provenientes de tallo prueba Tukey 95%.**

Tratamiento	Explante	Peso seco del último día de la cinética de crecimiento
<b>Fructosa 6%</b>	Acícula	0.04±0.001 <sup>a</sup>
<b>Fructosa 6%</b>	Tallo	0.042±0.002 <sup>a</sup>
<b>Glucosa 0.5%</b>	Tallo	0.02±0.0005 <sup>a</sup>
<b>Glucosa 0.5%</b>	Acícula	0.024±0.001 <sup>a</sup>
<b>Maltosa 3%</b>	Tallo	0.0230.001 <sup>a</sup>

<b>Maltosa 3%</b>	Acícula	0.02±0.0007 <sup>a</sup>
<b>Sacarosa 3%</b>	Tallo	0.020±0.002 <sup>a</sup>
<b>Sacarosa 3%</b>	Acícula	0.018±0.0008 <sup>a</sup>

Media ± SD. Medidas con letras iguales dentro del mismo grupo no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

Para cada callo proveniente de los dos explantes de manera individual no existe diferencia significativa entre los tratamientos (cuadro 23 y 24), sin embargo, en peso fresco la glucosa al 0.5% presenta las mayores proliferaciones celulares en las suspensiones, en peso seco no se observan tampoco diferencia significativa al comparar los tratamientos en cada explante, sin embargo, la fructosa al 6% es la que presenta el mayor aumento de peso seco. Y al comparar entre los dos explantes tampoco se puede ver diferencias significativas tanto para peso fresco y peso seco (cuadro 25 y 26).

## VIII Discusión

### 8.1.- Desinfección y siembra de explantes e inducción de callo.

Para lograr obtener los explantes se les fertilizaba con MS 50%, Vitaminas R2 y citoquina BA, esto logró que los nuevos brotes se hayan desarrollado con el fin de obtener los explantes para la siembra.

La contaminación de los explantes fue mayor en la segunda y tercera siembra (fig. 10), a lo que reporta Martínez en 2011 con el método de desinfección, esto es debido a que los árboles de *Taxus globosa* estuvieron sembrados en jardineras, y estuvieron expuestas a lluvias y condiciones poco asépticas. Martínez, 2011 coloca las plantas madre en condiciones de invernadero para controlar las condiciones asepsia y que el método de desinfección sea mucho más eficiente.

Una vez sembrados los explantes, se esperó 10 días para observar el porcentaje de contaminación, aquellos que presentaron contaminación, fue por presencia de hongos que, en las fechas de siembra, se reportaron lluvias que proliferó los hongos propagándose a los explantes.

Pasado los 15 días comenzaron a oxidarse los explantes esto es debido a factores externos como: intensidad de luz, cortes, herbicidas, senescencia, patógenos,

metales pesados, lesiones, sustancias abrasivas que puedan desencadenar el estrés oxidativo y nitrosativo, los procesos de oxidación son causados principalmente por el efecto abrasivo del agente desinfectante aplicado durante la asepsia del explante, los cortes que sufre el explante, composición del medio de cultivo, volumen y calidad del frasco de vidrio para su uso, En las células vegetales, éstos se forman constantemente durante las reacciones redox de varias vías metabólicas; la incompleta reducción del oxígeno o de la oxidación del agua en el cloroplasto o la mitocondria, en la cadena de transferencia de electrones tanto de la fotosíntesis como de la respiración, en la  $\beta$ - oxidación de los ácidos grasos, oxidación del glicolato, del NADPH, oxalato y de las xantinas (Azofeifa, 2009).

La formación de los callos fue más acelerada en los tallos aproximadamente en los 13-16 días, y más lenta en las acículas 30-35 días después de las fechas de siembra. casi igual como lo reporta Álvarez en 2019. Quizá por una mayor presencia de células meristemáticas en el tallo que en las acículas, en los nudos de los tallos se presentan cuatro tipos de meristemas (marginales, intercalares, de engrosamiento primario y de alargamiento) con una mayor división. En el caso de las acículas que solo contienen un solo tipo de meristemas que es de foliar el cual es importante para la diferenciación celular y la formación de órganos. (Ramos, 2006).

Martínez en 2011 reporta que los reguladores de crecimiento son necesarios para la formación de los callos ya que el Picloram favorece el crecimiento de los callos en cultivos de *Taxus sp.* Y la Kinetina es necesaria para que las células estén en continua división. También en las condiciones de fotoperiodo hay un mayor incremento de biomasa, la luz tiene una influencia en el ciclo celular y en la diferenciación de cloroplastos que favorecen la asimilación de nutrientes y el mayor almacenamiento de energía, estas reacciones de asimilación se les conoce como fotoasimilantes que ocurren en el estroma de los cloroplastos. En el ciclo celular los nutrientes que son factores externos que modulan que las células pasen de un estado de quiescencia y que están regresen a ese estado para la proliferación celular.

Existe una tendencia de formación de callo en la sacarosa, y maltosa (fig. 11y 12), la sacarosa es muy utilizada en cultivo de tejidos vegetales, debido a su disponibilidad, pero sobre todo a su estabilidad en el medio de cultivo lo que provee de energía a las células para su proliferación y con ellos la formación de los callos. Sin embargo, al hacer el análisis estadístico, se observa que el grupo más representativo en las inducciones fueron los tallos sometidos a sacarosa al 3% en condiciones de fotoperiodo.

## **8.2.- Mantenimiento de callo.**

Para el mantenimiento de los callos de *Taxus* se han empleado varias sales basales, de las cuales el Gamborg (B5) (Gamborg *et al.*, 1968), Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962) y Woody Plant Media (WPM) (Lloyd y McCown, 1981) han sido los más utilizados para la iniciación y el mantenimiento de cultivos de *Taxus* tanto para callo y suspensión celular. En este proyecto solo se utilizó las sales basales Gamborg (B5) ya que es el que reporta Arandaral en 2003 como el óptimo para su mantenimiento. Estos medios se complementan frecuentemente con sustancias orgánicas, tales como vitaminas y aminoácidos, entre otros y una mezcla de reguladores del crecimiento para la estimulación de la proliferación de las células (Mondher *et al.*, 1996)

También el medio de cultivo estaba enriquecido con vitaminas Nitsh, Kao, PVP y Acido aspártico cuya función es la de antioxidante, que son agentes reductores con bajo potencial Redox reduciendo los efectos oxidantes de los radicales libres, de moléculas inestables que pueden presentarse en el medio de cultivo (Pérez, 1998). También es recomendable utilizar nitrato de plata que es una Sal inhibitoria del etileno que favorece el crecimiento de los cultivos, ya retarda el envejecimiento celular y con ello disminuir la respiración que causa la oxidación y muerte celular (Taiz y Zeiger, 2006)

Como se muestra en el cuadro 7.2 de fuentes carbono en el apartado de materiales y métodos, se usa como fuente de carbono la sacarosa, debido a que los cultivos

celulares en su gran mayoría no son cultivos autotróficos, la sacarosa es el más empleado en cultivo *in vitro*, sin embargo, también se sustituyó con maltosa, glucosa y fructosa en diferentes concentraciones para un óptimo crecimiento de la masa celular.

Un fenómeno común en el mantenimiento de callos fue la oxidación, que se manifestó como la coloración café oscuro afectando su crecimiento debido a sustancias polifenólicas que intoxicaban a las células provocando su muerte. (Perez, 1998). La mayor presencia de oxidación es en el callo de los tallos, que en las acículas (fig. 14 y 15), se intuye que por el tipo celular que presentan es de un ciclo celular mucho más rápido, la oxidación es más rápida en los cultivos de tallo que en los cultivos de acícula, también se puede observar que los cultivos al ser cambiado su fuente de carbono estos tienen a ser muy susceptibles a la oxidación en lo que se adecuan al medio de cultivo, la presencia de callo fue disminuyendo con el paso de los subcultivos, sin embargo las azúcares que produjeron oxidación en los cultivos celulares fueron la glucosa y la fructosa, pero la sacarosa y la maltosa presentaron poca presencia de oxidación y al final del registro presentaron los porcentajes más bajos de oxidación.

También se observó la presencia de callo verde en los cultivos, lo que indicaba la presencia y diferenciación de cloroplastos. Como estos cultivos no son autótrofos, para lograr el desarrollo de cloroplastos, necesitan de un suministro de carbohidratos con el fin de realizar sus funciones fisiológicas y metabólicas, estos cultivos se consideran como cultivos fotomixotróficos (cultivos celulares en crecimiento en presencia de luz con la adición de una fuente exógena de carbohidratos). Si bien la principal función de los cloroplastos es su participación en la fotosíntesis, estos orgánulos también participan en otras funciones fundamentales de las células vegetales como son la síntesis de aminoácidos, nucleótidos, lípidos, almidón y hormonas. Sin embargo, el tipo de carbohidrato y su concentración pueden inhibir la acumulación de clorofila, o pueden lentamente ser asimilados lo cual limita el crecimiento del cultivo, pero favorece el desarrollo de los cloroplastos. (Gómez *et al.*, 2014). Las acículas presentan una mayor diferenciación

de cloroplastos (fig 16 y 17), al ser el órgano responsable de la fotosíntesis, es esperado que haya una mayor presencia de cloroplastos en los cultivos de acícula, sin embargo, en el caso del tallo, no hubo mucha diferenciación de cloroplasto, y los azúcares que presentan un porcentaje mayor de callos verdes, son la sacarosa, seguido de la maltosa. los niveles de sacarosa en el medio de cultivo conllevaron a decrecer los contenidos de polifenoles presentes en los explantes, por lo que el problema de oxidación disminuyó (Azofeifa, 2009).

### **8.3.- Proliferación de callos:**

Como reportan en los trabajos de Arandaral 2003, Martínez 2011, Padilla 2013, Campos 2017 y Álvarez 2019, al someter los callos de *Taxus globosa* en condiciones control sin modificación del medio de cultivo, se puede observar una mayor proliferación celular en las acículas que en los tallos. En este trabajo en condiciones control con sacarosa al 3% se presenta un mayor incremento de masa callosa en los cultivos de tallo que en los cultivos de acícula, sin embargo, en el caso de la acícula es la que presenta menor oxidación de los callos y presentan un mejor aspecto, mismo que reportan en los trabajos de los autores citados al inicio del párrafo.

En este trabajo se analizó diferentes concentraciones de azúcares para determinar cuál tipo y concentración potencializa la proliferación celular. La sacarosa es fuente más usada en el cultivo de tejidos vegetales y la que en su gran mayoría ha funcionado, seguido de la glucosa que es la segunda fuente que potencializa la proliferación celular ya que rápidamente se metaboliza. (Sarmadi, 2018).

Según en el estudio de Sarmadi en 2018 utilizaron diferentes concentraciones de glucosa 0.5, 1, 2, 3% y combinaciones de glucosa y ácido salicílico en el medio de cultivo para evaluar su efecto en la proliferación de callos y su efecto en la producción de taxanos en cultivos de *Taxus baccata*, dando como resultado que las concentraciones bajas de glucosa aumentan la viabilidad de los cultivos y su crecimiento óptimo. La glucosa en el medio de cultivo a mayores concentraciones potencializa el estrés osmótico reduciendo el potencial osmótico de los callos dando como resultado la baja proliferación de los cultivos y disminución en su viabilidad y

aumenta la oxidación de los cultivos gracias a radicales libres como  $H_2O_2$ , también como respuesta aumenta los compuestos fenólicos que provocan la oxidación de los callos, pero estos se pueden disminuir con una concentración baja de glucosa mezclada con ácido salicílico en el medio. En este trabajo utilizamos las mismas concentraciones de glucosa con excepción de la concentración al 2% y se observó que menores cantidades de glucosa potencializan la proliferación pero mayores cantidades de glucosa aumentan la oxidación celular y produce un estrés osmótico que afecta en el crecimiento celular de los callos de *Taxus globosa*.

Sin embargo, Yari *et al.*, 2011 en cultivos de callo de *Taxus brevifolia* menciona que la sacarosa y glucosa al 5% y la fructosa al 10% aumentan la producción de callo y disminuyen la oxidación ellos reportan que la presencia de compuestos fenólicos potencializa la formación de pared celular siendo un estimulante en la proliferación celular produciendo una mayor actividad de enzimas PPO y PO. Mencionan que existe una producción celular cuando las células están expuestas en fructosa durante la fase exponencial y que en la fase estacionaria las células aprovechan la glucosa para la producción de paclitaxel. Nosotros observamos que la proliferación celular aumenta con la fructosa al 6% pero con la fructosa al 10% disminuye en los callos de *Taxus globosa*.

Altos niveles de azúcar disminuyen el potencial osmótico de las células y con ello el estrés osmótico hace que las pierdan viabilidad o mueran (Kim, 1995). Nosotros al observar y comparar el efecto de cada uno de los azúcares probados en diferentes concentraciones, observamos que la fructosa al 6% potencializa el crecimiento celular, seguido de la sacarosa 3%, la maltosa 3% y al final la glucosa al 0.5%, intuyendo que, en todas las concentraciones bajas de azúcar se presenta una mayor proliferación celular y al aumentar la concentración de azúcar comienza a disminuir la proliferación celular y provoca estrés osmótico. Siendo la fructosa 6% el grupo más representativo y que mejores resultados en los barridos de los callos durante las cinéticas de crecimiento.

Para obtener una mayor producción de paclitaxel se requiere un cultivo prolifero, para ellos se utilizan las fuentes de carbono, sin embargo, Sabater en 2011 indica

que la adición de fuente de carbono en los primeros días de la cinética de crecimiento aumenta la producción de metabolitos secundarios gracias a la hidrólisis de la sacarosa, sin embargo después de la fase exponencial se tiene que adicionar otra fuente de carbono diferente a la inicial para potencializar el metabolismo primario de las células y puedan aprovechar la glucosa en los procesos metabólicos, agregando maltosa para que con la hidrólisis de la se aproveche la glucosa presente en la maltosa y potencialice el crecimiento celular y la biosíntesis de metabolitos secundarios, en las fases de adecuación y aceleración.

#### **8.4.- Suspensiones celulares:**

Una vez obtenidas las mejores concentraciones de los azúcares en la proliferación de callos, se tomaron esas concentraciones para probarlas con las suspensiones celulares. Para determinar la mejor fuente de carbono.

Según el estudio Wickremesinhe. y Arteca 1994 con cultivo de *Taxus x media* si se inoculan una cantidad menor de 70gr de callo por litro de medio de cultivo, este no logra proliferarse debido a que existe una relación óptima de densidad de cultivo. También reportan que las fuentes de carbono que potencializan el crecimiento celular son la sacarosa en una concentración de 8% y la fructosa en una concentración del 4% y una combinación de sacarosa 2% con fructosa 1%. Se inocularon 8 gr en 125 ml de medio de cultivo y con azúcares de sacarosa al 3%, maltosa al 3%, fructosa al 6% y glucosa al 0.5%. y no se observó un gran incremento celular cualquier caso.

Las células en suspensión al estar en mayor contacto con el medio de cultivo tienen más exposición con la fuente de carbono, para ser asimilada se debe de hacer una intervención de enzimas invertasas para la hidrólisis de las moléculas de carbohidratos. Las enzimas invertasas hidrolizan la sacarosa para su mayor aprovechamiento rompiendo los enlaces de glucosa y fructosa y con esto pueda ser asimiladas las hexosas. En la fase de aclimatación las células aprovechan las moléculas de glucosa y cuando pasa a la fase exponencial, la fructosa es mayormente aprovechada. (Wickremesinhe. y Arteca, 1994).

La sacarosa es hidrolizada durante los primeros días del ciclo de crecimiento, y durante la fase exponencial es aprovechada la glucosa y durante la fase estacionaria comienza a aprovecharse la fructosa como lo reporta Fett *et al.* en 1994 en cultivos de *Taxus cuspidata*. Indicando que cuando el proceso de hidrolisis de la sacarosa se rompen los enlaces y aumenta las concentraciones de glucosa y fructosa, esto ocurre en los primeros 6 días del cultivo, la glucosa comienza a agotarse en el medio de cultivo después de los 12 días del cultivo y la fructosa comienza a disminuir después de los 18 días. También indica que existe una relación entre la cantidad de biomasa inocula con la cantidad de carbohidrato usado en el medio de cultivo, mencionando que una cantidad baja de biomasa a una cantidad alta de carbohidratos puede afectar la viabilidad del cultivo, sin embargo, una cantidad baja de carbohidrato sobre una cantidad alta de biomasa, esta consume rápidamente la fuente de carbono, y tienen a preferir en su gran mayoría la glucosa. (Fett *et al.*, 1994).

Hoon *et al.*, 1995 reportan que el mejor aprovechamiento es con las azúcares que apoyen el crecimiento celular que reporta que son sacarosa, lactosa, galactosa, glucosa y fructosa y que es aprovechado mejor la galactosa en cultivos de *Taxus brevifolia*. Cuanto mayor sea la concentración de azúcar, menor será el volumen celular esto por el efecto osmótico que se presenta, a mayor concentración de azúcar la disponibilidad de agua baja, provocando el estrés hídrico y osmótico.

En este trabajo no se observó ningún efecto significativo con ninguna fuente de carbono, no hubo un crecimiento que nos aporte una conclusión certera del crecimiento celular en las suspensiones, pero se puede ver una tendencia de crecimiento con la fructosa 6% en peso seco tanto para los cultivos de acícula y tallo de *Taxus globosa* (fig. 36 y 37).

## IX Conclusiones:

- Se obtuvo la inducción de callo a partir de tallo y acícula de *Taxus globosa* en los diferentes carbohidratos utilizados (Sacarosa, fructosa, glucosa y maltosa).
- Las condiciones de fotoperiodo de los cultivos favorecen una mayor inducción de callo.
- El tallo de *taxus globosa* es el explante donde se obtuvo una mayor producción de callo.
- La sacarosa 3% seguido de la maltosa 3% fueron los azúcares en donde se presentó una mayor callogénesis tanto en condiciones de luz como en oscuridad.
- En los medios de acícula con maltosa al 3% fue la que presentó la menor oxidación y mayor presencia de callos verde, para el medio de tallo con fructosa al 6% fue la que presentó la menor oxidación, pero en maltosa 3% es donde presenta mayor presencia de callo.
- La glucosa presenta la mayor oxidación en los callos
- Las concentraciones en los diferentes azúcares las que se obtuvieron una mayor proliferación de callo son: glucosa 0.5%, fructosa 6% y maltosa 3%, siendo la fructosa la que presenta la mayor producción. Siendo el callo proveniente más prolifero.
- las suspensiones celulares sometidos en fructosa 6% son las que presentan una mayor proliferación celular.

## **X Perspectivas:**

- Se debe adecuar un medio de cultivo para lograr obtener una mayor producción de callo en condiciones de oscuridad.
- Se debe replicar este estudio exclusivamente con condiciones de oscuridad.
- Se debe realizar un estudio en donde se observe el efecto de la combinación de los azúcares.
- Se debe utilizar la sacarosa 3% para las inducciones y en condiciones de luz y oscuridad, se puede mantener los callos con maltosa al 3% o fructosa 6%, o realizar una combinación de fructosa con maltosa para obtener un callo con menor oxidación y mayor presencia de callo verde. Y hacer suspensiones celulares con fructosa al 6% para una mayor proliferación.
- Se debe realizar el estudio fitoquímico para observar el efecto de la fuente de carbono en la producción de paclitaxel y en la producción durante la fase de crecimiento. Ya que con esta tesis se puede plantear, una mayor producción de fructosa al 6%, pasada la fase exponencial se puede agregar el azúcar que da una mayor producción de paclitaxel.
- Se debe realizar un estudio fitoquímico para observar el efecto de la fuente de carbono y la interacción de los elicitores en la mayor producción de callo. Ya con esta tesis se puede obtener con fructosa 6% posterior a la fase exponencial agregar el elicitador o agregar el elicitador y la fuente de carbono que da la mayor producción de paclitaxel.

## XI Referencias:

Argueta, A, E, Corona M, A. Moreno. (2012). clásicos de la etnobotánica. *Etnobotánica* 10 (suplemento 1): 1:10.

Arandara M.A. (2009). Producción de células transformadas genéticamente estables de *Taxus globosa*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias. México. D.F.

Alvarez M.A. (2019). Caracterización de cultivos celulares de acícula y tallo de *Taxus globosa* Schltdl. Bajo dos condiciones de luz. Tesis de licenciatura. Universidad Simón Bolívar. México, CDMX.

Azofeifa A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. *Agronomía Mesoamericana* 20(1): 153-175.

Ahmad, M. A. (2016). *Plant Tissue Culture: Propagation, Conservation and Crop Improvement*. Singapore: SPRINGER.

Barrales C. H.J., Ramírez S. M.F. (2013). Una revisión sobre la producción de taxoides anticancerígenos en cultivos *in vitro* de callos y células de *Taxus* spp. *Revista de Chapingo*. 2-18.

Barrales C. H.J., Soto H. R.M., Ramos V. A.C., Trejo T.L.I., Martínez V. M., Ramírez G.M.E., San Miguel R., Luna P. G.R. y López U. J. (2011). Extracción y cuantificación de taxoides por HPLC en hojas in situ y en callos inducidos in vitro de *Taxus globosa* Schlecht. *Spanish Journal of Rural Development*: 103-114.

Barradas D.D.M, Hayward J. P.M., Mata R M. Palmeros S. B., Platas B. O. B.J., Velásquez T.R.F. (2010) *Taxus globosa* S. cell lines: Initiation, selection and characterization in terms of growth, and of baccatin III and paclitaxel production. *Biocell* 34(1): 1-6.

Blanc C., Lardet L., Martin A., Jacob J.L., Carron M.P. (2002) Differential carbohydrate metabolism conducts morphogenesis in embryogenic callus of *Havea brasiliensis* (Mull. Arg) *Journal of Experiment Botany* Vol. 53. 373:1453-1462.

Campos Q.S. (2017). Evaluación de la producción de paclitaxel en cultivos celulares de *Taxus globosa* (schltdlSchltdl) elicitados con metil jasmonato y ácido salicílico. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias. México. D.F.

Devi C.V. y Donald K.D. (1977) Influence of Carbohydrates on Quantitative Aspects of Growth and Embryo Formation in Wild Carrot Suspension Cultures. *Plant Physiol.* 59, 81-85

- Evans D., Coleman J., Kearns A., (2003), Plant cell culture, Garland Science, 194 pp.
- Edwin F. George, M. A.-J. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture* (Tercera ed., Vol. 1). Singapore: Springer.
- El-Shafey N.M., Ahmed E.S., Sayed M., Hammouda O., Sayed M., Khodary S.A. (2016). Effect of Growth Regulators, Carbohydrates and Antioxidant Compounds on Biomass, Flavonoid Accumulation and Enzyme Activity in Callus Cultures of *Rumex vesicarius* L. *Egypt. Journal. Botany.*, Vol. 56, No.3:595– 612.
- Fett N. A.G, Yi Zhang W. y DiCosm F. (1994). Kinetics of Taxol Production, Growth, and Nutrient Uptake in Cell Suspensions of *Taxus cuspidata*. *Biotechnology and Bioengineering*,44: 205-210.
- García A. M. A., Estrada C.E., Jurando Y. E. y Gonzales U.U.D.(2011). Análisis de once poblaciones naturales de *Taxus globosa* en la Sierra Madre Oriental. *Madera y Bosques*, 17(1), 93-104.
- George E.J., M. A.-J. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture* (Tercera ed., Vol. 1). Singapore: Springer.
- Gómez-Torres L.M., Moreno-Gómez B., Velásquez-Lozano M.E., Aguirre-Mancilla C. y Aguado-Santacruz G.A. (2014). Cultivos fotoautotróficos de células vegetales en suspensión. Establecimiento y perspectivas de aplicación. *Revista Fitotec.* 37 (2): 165 – 17.
- García M., Cantú C., Estrada E., Pando M. y Moreno A. (2012). Distribución actual y potencial de *Taxus globosa* (Taxaceae) en México. *Journal Botany.*, 6(2):587-598.
- Hurtado M.D.V y Merino M. M.E., (1987). Cultivo de tejidos vegetales. Trillas. S.A.
- Hoon Kim J., Jeong-Hwan Y., Yong-Soon H., Sang Yo Byun y Dong-II A.(1995) Production of taxol and related taxanes in *Taxus brevifolia* cell cultures: Effect of sugar. *Biotechnology Letters* 17, (1), 101–106.
- Jain R.K., Davey M.R., Cocking E.C. y Wu R. (1996) Carbohydrate and osmotic requirements for highfrequency plant regeneration from protoplast-derived colonies of indica and japonica rice varieties. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 48, No. 308, pp. 751.
- Jain R.W. Davey M.R. Cocking E.C. Wu. R. (1997). Carbohydrate and osmotic requirements for highfrequency plant regeneration from protoplast-derived colonies of indica and japonica rice varieties. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 48, 308: 751-758.

Luna Vega, M. I. (2003). Ficha técnica de *Taxus globosa*. Taxones del bosque mesófilo de montaña de la Sierra Madre Oriental incluidos en la norma oficial mexicana. Herbario FCME, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.

Soto. M. S. (2000). El tejo mexicano (*Taxus globosa* Sch.). Potencial de su aprovechamiento en taxol. *ciencias naturales y agropecuarias*, 7(3), 277-279.

Aranda M.A (2011). Análisis de once poblaciones naturales de *Taxus globosa* en la Sierra Madre Oriental. *Madera y Bosques*, 17(1), 93-104.

.Shemluck, M.J. (2003). A preliminary study of the taxane chemistry and natural history of the mexican yew, *taxus globosa* schldl. *Botánica económica y etnobotánico* (72), 119-127.

Jaziri, A. Z.. (1996). *Taxus* sp. cell, tissue and organ cultures as alternative sources for taxoids production: a literature survey. *Plant Cell, Tissue and Organ Cultur*(46), 59-75

Mroginski, W. M. (1993). *Cultivo de Tejidos en la agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. cali, colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical.

Muñoz de Malajovich, M. A. (2006) Biotecnología. Editorial Universidad Nacional de Quilmes.

Martinez G.M. (2011). Producción *in vitro* de taxanos de *Taxus globosa* Schlecht bajo diferentes condiciones de cultivo. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de Mexico, Facultad de Ciencias. Mexico. D.F.

Mohmad K.AK., Subari S., Azimathol H.L.P., Suri R., Aminuddin H., (2006). Effect of different media, sugar, iluminations and temperaturas on the productions of styrylpyrone derivatives in callus culture of *Goniothalamus umbrosus*. *J. Trop. Agric. and Fd. Sc.* 34 (2): 295-302.

Maataoui M. EL, Espagnac H. L, Jaber B., y Lopez. A.A. (1997). Regulation of *in vitro* Callogenesis and Organogenesis from Albizzia Root Explants by Carbohydrate Source Modifications. *Journal. Plant Physiol WIL* 152: 494-501.

Melo, V. O. (2007). *Bioquímica de los precesos metabolicos*. (segunda ed.). Mexico D.F., Mexico: Revertè.

Nelson D.L y Cox M.M (2009) *Lehninger Principios de Bioquímica* 5ª ediciones Omega Mexico D.F.

Oscar, M. V. (2007). *Bioquímica de los precesos metabolicos*. (segunda ed.). Mexico D.F., Mexico: Revertè.

Ocegueda S.E., Moreno y P. Koleff. (2005). Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. CONABIO. Biodiversitas 62:12-15.

Osuna L., Tapia N., Cusido R., Palazon J., Bonfill M., Zamilpa A., Lopez U.J. y Cruz S.F. (2015). Taxane production induced by methyl jasmonate in free and immobilized cell cultures of Mexican yew (*Taxus globosa* Schltdl). *Acta Physiol Plant* 37:199.

Paz C. J. (2015). “*Establecimiento In Vitro De Taxus Globosa Schltdl.*”. Las Agujas, Zapopan, Jal.,: Universidad De Guadalajara .

Padilla A.D. (2013). Obtención de cultivos celulares prolíferos de *Taxus globosa* y su transformación genética. Tesis genética. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias. México. D.F

Pérez, M.B., Ramírez M.R., Núñez P.H. (1999). Introducción al cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Nacional Autónoma de Aguascalientes, México.

Pérez, p. 1998. propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de biotecnología de plantas. Cuba, 1-56

Contreras R.M, (2010). Distribución de *Taxus globosa* (Taxaceae) en México: Modelos ecológicos de nicho, efectos del cambio del uso de suelo y conservación. *Revista Chilena de Historia Natural* (83), 421-433.

Robles, C. J. (2015). “*Establecimiento in vitro de Taxus globosa schltdl.*”. Las agujas, zapopan, jal.,: Universidad de guadalajara .

Rosa M. Cusido, M. O.-J. (2014). A rational approach to improving the biotechnological production of taxanes in plant cell cultures of *Taxus* spp. *Biotechnology Advances*(34), 1158-1164.

Ramachandra R. y Ravishankar G. (2002). Plant cell cultures chemical Factories of secondary metabolites. *Biotechno Adv.* 20:101-153.

Ramos. R.M.T.2006. Regeneración de melón (*Cucumis melo* L.) bajo condiciones in vitro como modelo biológico. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias. UNAM. 106 pp.

Rahpeyma S.A., Ahmad M., Mokhtar J.J., (2014). Paclitaxel production is enhanced in suspension-cultured hazel (*Corylus avellana* L.) cells by using a combination of sugar, precursor, and elicitor. *Engineering In Life Sciences.* 0: 1–9.

Sarmadi M., Karimi N., Palazón J., Ghassempour A. y Hossein M.M. (2018). The effects of salicylic acid and glucose on biochemical traits and taxane production in a *Taxus baccata* callus culture. *Plant Physiology and Biochemistry* 130: 271-280.

Smith R.H. (1986). Establishment of calli and suspensión cultures. Weissbach, A y Weissbach, H, (eds). 1986. Methods in enzymology. 188:539-549

Sabater J. A. B., Tudela L.R., Lopez P.A.J. 2010. In vitro culture of *Taxus* sp.: strategies to increase cell growth and taxoid production. *Phytochem Rev* 9:343–356.

Susana E. Ramírez-Sánchez, J. L.-U.-H.-L.-G. (2011). Variación morfológica de semillas de *Taxus globosa* schldl. provenientes de dos regiones geográficas de México. *revista fitotec mexico*, 34(2), 93-99.

Tapia N., Zamilpa A., Bonfill M., Ventura E., Cruz V. D., Del Villar C., Cruz S.F. y Osuna L. (2013) Effect of the culture medium and biotic stimulation on taxane production in *Taxus globosa* Schldl in vitro cultures. *Acta Physiol Plant*.

Taiz L. y Zeiger E. (2006) *Plant Physiology*. 4a. Edición. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland.EUA.

Valdez Infante.H.J. Rodriguez Medina N.N., Gonzales L., Velazques Palenzuela J.B., Rivero Rodriguez D., Sourd Martinez D.G., Martinez Gonzales F. y Rodriguez Rodriguez J.A. (2017) La biotecnología como herramienta para la propagación, conservación y el mejoramiento genético del guayabo. *Revista colombiana de biotecnología* 14(2). 7-19.

Vuke T.M. y Mott R.L. (1987). Growth of loblolly pine callus on a variety of carbohydrate sources. *Plant Cell Reports* 6:153-156.

Wickremesinh E. R. M. Y Arteca R. N. (1994). *Taxus* Cell Suspension Cultures: Optimizing Growth and Production of Taxol. *Journal Plant Physiol*. 144:183-188.

Yari K.A., Naderi M.H. y Toft S.H. 2011. Effect of Antioxidants and Carbohydrates in Callus Cultures of *Taxus brevifolia*: Evaluation of Browning, Callus Growth, Total Phenolics and Paclitaxel Production. *BiolImpacts*, 1(1), 37-45.

Zhang, C.y Wu H. (2002). Ethylene inhibitors enhance elicitor-induced paclitaxel production in suspension cultures of *Taxus* spp. cells. *Enzyme and Microbial Technology*(32), 71-77.

Zamudio S. 1992. Familia Taxaceae. Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Instituto de Ecología. Pátzcuaro, Michoacán, México, Fascículo 9.7p.

Zavala C. F., Soto H M., & Rodríguez G. M. T. (2001).El Romerillo (*Taxus globosa schlecht.*): biología, dificultades y perspectivas de su uso. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 7(1), 77-94.

Zhang, C.-H. W. (2002). Ethylene inhibitors enhance elicitor-induced paclitaxel production in suspension cultures of *Taxus* spp. cells. *Enzyme and Microbial Technology*(32), 71-77.

## XI ANEXOS

### MEDIO DE CULTIVO CONOCIDO COMO B<sub>5</sub> (GAMBORG *et.al.* 1968)

NOMBRE DEL COMPUESTO	FÓRMULA	P.M. (g)	CANTIDADES PARA UN LITRO (1X)	
			EN: MASA (mg)	MOLES (mM)
<b>COMPUESTOS INORGÁNICOS</b>				
<b>Macronutrientes</b>				
Nitrato de Potasio	KNO <sub>3</sub>	101. 108	2500	24.726
Cloruro de Calcio	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	147. 02	150	1.02
	CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	128. 99	131.56	1.02
	CaCl <sub>2</sub>	110. 99	113.2	1.02
Sulfato de Magnesio	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	246. 498	250	1.014
Fosfato de sodio	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	156. 01	150	0.96
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	137. 99	132.47	0.96
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	119. 98	115.18	0.96
Sulfato de Amonio	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	132. 146	134	1.014
<b>Micronutrientes</b>				

Sulfato de Manganeso	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	223. 0618	13.16	0.059
	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	169. 01	10	0.059
Sulfato de Zinc	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	287. 55	2	0.00695
Ácido Bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	61.8 33	3	0.048
Yoduro de Potasio	KI	166. 01	0.75	0.00451
Sulfato de cobre	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	249. 68	25µg	1.001x10 <sup>-4</sup>
Molibdato de sodio	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	241. 95	250µg	0.001033
Cloruro de Cobalto	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	237. 93	25µg	1.05x10 <sup>-4</sup>
Sulfato ferroso	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	278	21.128	0.076
Na2EDTA	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Na <sub>2</sub>	336. 2	25.55	0.076
Na2EDTA.2H <sub>2</sub> O	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Na <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	372. 2	28.28	0.076
<b>COMPUESTOS ORGÁNICOS</b>				
<b>AMINOÁCIDOS</b>				
Glicina	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	75.0 7	NO	0
<b>VITAMINAS</b>				
Myo-Inositol	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	180. 2	100	0.555

Tiamina-HCl	$C_{12}H_{17}ClN_4O_4S.HCl$	337. 3	10	0.00296
Ácido Nicotínico	$C_6H_5NO_2$	123. 1	1	$8.123 \times 10^{-3}$
Piridoxina-HCl	$C_8H_{11}NO_3.HCl$	205. 6	1	$4.864 \times 10^{-3}$

**SOLUCIONES CONCENTRADAS (100X) DEL MEDIO CONOCIDO COMO B<sub>5</sub> (GAMBORG *et.al.* 1968)**

NOMBRE DEL COMPUESTO	FÓRMULA	1L (g)	500 mL (g)	250 mL (g)	100 mL (g)	50 mL (g)
<b>Solución I: NITRATOS</b>						
Nitrato de Potasio	$KNO_3$	250	125	62.5	25	12.5
Sulfato de Amonio	$(NH_4)_2SO_4$	13.4	6.7	3.35	1.34	0.67
<b>Solución II: SULFATOS</b>						
Sulfato de Magnesio	$MgSO_4.7H_2O$	25	12.5	6.25	2.5	1.25
Sulfato de Manganeseo	$MnSO_4.4H_2O$	1	0.5	0.25	0.1	0.05
	$MnSO_4.H_2O$	1.31	0.65	0.32	0.13	0.06
Sulfato de zinc	$ZnSO_4.7H_2O$	5	2.5	1.25	0.5	0.25
Sulfato de cobre *	$CuSO_4.5H_2O$	0.2	0.1	0.05	0.02	0.01
		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		25*	125*	62.5*	25*	12.5*
<b>Solución III: HALÓGENOS</b>						
Cloruro de Calcio	$CaCl_2.2H_2O$	15	7.5	3.75	1.5	0.75
		13.1	6.57	3.28	1.31	0.65
	$CaCl_2.H_2O$	56	28	14	5.6	2.8

	CaCl <sub>2</sub>	11.3 2	5.66	2.83	1.13 2	0.56 6
Yoduro de Potasio	KI	0.07 5	0.03 75	0.01 875	0.00 75	0.00 375
* Cloruro de Cobalto	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.00 25*	0.00 125*	0.00 0625*	0.00 025*	0.00 0125*
<b>Solución IV: FOSFATO, ÁCIDO BÓRICO, MOLIBDATO</b>						
Fosfato de sodio	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	15	7.5	3.75	1.5	0.75
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	13.2 47	6.62 3	3.31 1	1.32 4	0.66 2
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	11.5 1	5.75 5	2.87 75	1.15 1	0.57 55
Ácido bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.3	0.15	0.07 5	0.03	0.01 5
Molibdato de sodio*	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.02 5*	0.01 25*	0.00 625*	0.00 25*	0.00 12*
<b>Solución V: QUELANTES</b>						
Sulfato ferroso	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2.11	1.05 5	0.52 7	0.21 1	0.10 5
Na2EDTA	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Na <sub>2</sub>	2.55	1.27 5	0.63 75	0.25 5	0.12 75
Na2EDTA.2H2O	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Na <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2.82	1.41	0.70 5	0.28 2	0.14 1

### Contenido de diferentes mezclas de vitaminas

Nombre del compuesto	Fórmula	P.M (g)	mg/L
<b>Vitaminas Nitsch</b>			
Myo-inositol	$C_6H_{12}O_6$	180.20	1000
tiamina-HCL	$C_{12}H_{17}N_4OSCl \cdot HCl$	337.30	5
Acido nicotínico	$C_6H_6NO_2$	123.10	5
Piridoxina-HCL	$C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$	205.60	0.5
Biotina	$C_{10}H_{16}N_2O_3S$	244	0.05
Ácido Fólico	$C_{19}H_{19}N_7O_6$	417	0.5
Glicina	$C_2H_5NO_2$	75	2
<b>Vitaminas KAO</b>			
Acido P-amino benzoico	$C_7H_7NO_2$	20.01	2
Acido L-ascórbico	$C_6H_8O_6$	176	200
Biotina-D	$C_{10}H_{16}N_2O_3S$	244	1
Pantotenato de calcio	$C_{18}H_{32}CaN_2O_{10}$	476.53	100
Cloruro de colina	$(CH_3)_3NCH_2CH_2O_2HCl$	139.63	100
Ácido fólico	$C_{19}H_{19}N_7O_6$	417	40
Vitamina B12	$C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$	1355.42	2
Myo-inositol	$C_{19}H_{19}N_7O_6$	417	40
Nicotinamina	$C_6H_6NO_2$	180.20	10000
Piridoxina*HCl	$C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$	123.10	100

Riboflavina	$C_{17}H_{20}N_4NaO_9P \cdot 2H_2O$	205.60	100
		514	2