

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y**  
**AGROPECUARIAS**



**“Establecimiento *in vitro* de**  
***Taxus globosa* Schlttdl.”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN MODALIDAD**  
**TESIS**  
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO**  
**DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**PRESENTA:**

**C. JOSÉ LUIS PAZ ROBLES**

**DIRECTORA:**

**M. EN C. MARIBEL M. LOERA QUEZADA**

**ASESOR:**

**DR. CARLOS RAMÍREZ SERRANO**

**LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JAL., SEPTIEMBRE DEL 2015**

## Establecimiento *in vitro* de *Taxus globosa* Schldl.



Universidad de Guadalajara  
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias  
Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología

C. JOSÉ LUIS PAZ ROBLES.  
PRESENTE

Manifetamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción **TESIS** con el título: "*Establecimiento in vitro* de *Taxus globosa* Schldl", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como director de dicho trabajo a: **M.C. Maribel Loera Quezada** y como asesor a: **Dr. Carlos Ramirez Serrano**.

Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 20 de marzo de 2015

  
DRA. GEORGINA ABRIANA QUIROZ ROCHA  
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

COMITE DE  
TITULACION



  
DRA. CLAUDIA AURORA URIBE MÚ.  
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

## Establecimiento *in vitro* de *Taxus globosa* Schldl.

FORMA F

Dra. Georgina Adriana Quiroz Rocha,  
Presidente del Comité de Titulación,  
Licenciatura en Biología,  
CUCBA,  
Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad **TESIS E INFORMES**, opción **TESIS** con el título: "**Establecimiento *in vitro* de *Taxus globosa* Schldl.**" que realizó el pasante **José Luis Paz Robles** con número de código **B00007544** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 20 de Agosto de 2015.

M. en C. Maribel M. Loera Quezada  
Directora del trabajo

Dr. Carlos Ramírez Serrano  
Asesor

COMITÉ DE  
TITULACIÓN



Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dr. José Armando Arias García		24.08.15
Dra. Lucila Méndez Morán		24.08.15
M.C. Rafael Soltero Quintana		26-08-15
Supl. Dr. Carlos Ramírez Serrano		24.08.15



Este trabajo formó parte del proyecto: “**Desarrollo de un Protocolo para la Micropropagación de *Taxus globosa* Schltl.**” Convocatoria CONAFOR-CONACYT-2004-C04-06, financiado por el Comité Técnico y de Administración del Fondo Sectorial para la Investigación, el Desarrollo y la Innovación Tecnológica Forestal.



El presente trabajo se realizó en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal.

Dirección: Av. Normalistas 800, Colinas de La Normal, 44270 Guadalajara, Jal.

Teléfono: 01 33 3345 5200

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Universo por otorgarme a estos seres maravillosos.....Efraín Paz y Francisca Robles mis Padres..... con quienes comparto parte de sus alelos, siendo ellos autores de lo que soy.....gracias por su soplo de vida, su amor y la transmisión de sus valores.....los amos.

A mi cómplice de aventuras, viajes...camarada de partido, de ideas... ese ser autentico y único que me ha acompañado en lo largo de mi vida.....Mara Paz mi Hermana.....gracias por todo y por darle luz a mi existir.

A mis otros ocho hermanos genéticos: Efraín, Adolfo, Claudia, Ricardo, Gerardo, Susana, Rubén y Raúl por ser pilares y formar parte de mi vida, a la cual le han añadido sabor y momentos felices.

A mis hermanos espirituales: Olivia Distancia, Ana María Gaspar, Xochitlquetzalli Estrada, Tere Sahagún y Juan P.R. Arana por coincidir en mi camino otorgándole gracia y armonía...los quiero.

A los que se me adelantaron en mi camino transformándose en rayos de luz: Ricardo Sainz, Jesús Uribe y a ti Ángel Zúñiga Saavedra por haber estado en los momentos más cruciales de mi existir y darle serenidad a mi vida...siempre estarán presentes en mí...

A esos seres que le otorgaron ese toque de investigación y haberme forjado perspectivas en mi formación: Dr. Carlos Ramírez Serrano y M. en C. Maribel Loera Quezada, gracias por haber aportado enriquecido mi conocimiento....

A esos grandes personas que intervinieron y aportaron conocimiento: Dr, Armando Arias, Dra, Lucila Méndez y M.C. Rafael Soltero, gracias a ustedes mi trabajo de investigación fue tomando forma hasta su materialización...gracias.

Con Amor a todos Ustedes.....

**INDICE GENERAL**

<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	iii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	iv
<b>ABREVIATURAS</b> .....	v
<b>RESUMEN</b> .....	vi
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 Antecedentes generales.....	2
1.1.1 Género <i>Taxus</i> .....	2
1.1.2 Descripción botánica del género <i>Taxus</i> .....	4
1.1.3 Utilización e importancia económica del género <i>Taxus</i> .....	5
1.1.4 <i>Taxus globosa</i> Schldl.....	7
1.1.5 Historia del paclitaxel.....	11
1.1.6 Problemática de abastecimiento y fuentes de paclitaxel .....	13
1.2 Establecimiento <i>in vitro</i> .....	15
1.2.1 Selección del material vegetal.....	15
1.2.2 Desinfección del material vegetal.....	17
1.2.3 Condiciones del cultivo e incubación.....	18
1.2.4 Contaminación <i>in vitro</i> .....	19
1.2.5 Oxidación <i>in vitro</i> .....	20
1.3 Micropropagación.....	23
1.3.1 Proliferación de yemas axilares.....	24
1.3.2 Organogénesis e embriogénesis somática.....	25
1.3.3 Importancia económica de la micropropagación.....	25
1.3.4 Proliferación de yemas axilares en el género <i>Taxus</i> .....	26
1.3.5 Organogénesis y embriogénesis somática en el género <i>Taxus</i> ...28	
1.4 Metabolitos secundarios y cultivo de líneas celulares en suspensión..28	
1.4.1 Metabolitos secundarios.....	28
1.4.2 Cultivo de líneas celulares en suspensión.....	30
1.4.3 Importancia del cultivo de líneas celulares en suspensión.....	31
1.4.4 Cultivo de callos en el género <i>Taxus</i> .....	32
1.4.5 Cultivo de líneas celulares en suspensión en el género <i>Taxus</i> ...35	
<b>2. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	37
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	37

<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	38
<b>5. OBJETIVO GENERAL</b> .....	38
5.1 Objetivos específicos.....	38
<b>6. METODOLOGÍA</b> .....	39
6.1 Fase 1: Establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Taxus globosa</i> Schltld.....	39
6.1.1 Material vegetal.....	39
6.1.2 Desinfección de los explantes.....	39
6.1.3 Medio y condiciones de cultivo.....	41
6.2 Fase 2: Inducción de yemas axilares de <i>Taxus globosa</i> Schltld.....	42
6.2.1 Material vegetal.....	42
6.2.2 Medio y condiciones de cultivo.....	42
6.3 Fase 3: Inducción de callo en acículas de <i>Taxus globosa</i> Schltld.....	43
6.3.1 Material vegetal.....	43
6.3.2 Medio y condiciones de cultivo para la inducción de callo.....	43
6.4 Fase 4: Iniciación de la organogénesis indirecta de <i>T. globosa</i> Schltld	
6.4.1 Material vegetal.....	43
6.4.2 Medio y condiciones de cultivo para la inducción de brotes adventicios.....	43
6.5 Fase 5: Iniciación del cultivo de líneas celulares en suspensión de <i>Taxus globosa</i> Schltld.....	46
6.5.1 Material vegetal.....	46
6.5.2 Medio y condiciones de cultivo para el inicio de líneas celulares en suspensión.....	46
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIONES</b> .....	47
7.1.1 Desinfección.....	47
7.1.2 Oxidación.....	51
7.3 Inducción de las yemas axilares.....	57
7.4 Inducción de callo.....	61
7.5 Inducción de brotes adventicios.....	66
7.6 Iniciación del cultivo de líneas celulares en suspensión.....	68
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	71
<b>9. PERSPECTIVAS</b> .....	73
<b>10. ANEXOS</b> .....	74
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	75

ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Especies del género <i>Taxus</i> y su ubicación geográfica.....	3
<b>Tabla 2.</b>	Clasificación taxonómica de la especie <i>Taxus globosa</i> Schltld.....	7
<b>Tabla 3.</b>	Eventos históricos del paclitaxel.....	12
<b>Tabla 4.</b>	Diferentes alternativas para la obtención del paclitaxel y alternativas en el cultivo de tejidos vegetales <i>in vitro</i> .....	14
<b>Tabla 5.</b>	Trabajos <i>in vitro</i> en el género <i>Taxus</i> en donde se presentó el proceso de oxidación y su solución.....	22
<b>Tabla 6.</b>	Proliferación de yemas axilares en el género <i>Taxus</i> .....	27
<b>Tabla 7.</b>	Propagación <i>in vitro</i> vía organogénesis y embriogénesis somática en el género <i>Taxus</i> .....	29
<b>Tabla 8.</b>	Trabajos <i>in vitro</i> en la inducción de callo en varias especies del género <i>Taxus</i> .....	32
<b>Tabla 9.</b>	Producción de paclitaxel por cultivo de líneas celulares en suspensión en diversas especies de <i>Taxus</i> .....	35
<b>Tabla 10.</b>	Nomenclatura de los explantes de los árboles de <i>Taxus globosa</i> .....	39
<b>Tabla 11.</b>	Tratamientos utilizados con sus respectivas concentraciones de reguladores de crecimiento para la inducción de yemas axilares.....	43
<b>Tabla 12.</b>	Tratamientos con sus respectivas concentraciones de reguladores de crecimiento para la inducción de callo.....	44
<b>Tabla 13.</b>	Tratamientos con sus respectivas concentraciones de reguladores crecimiento para la inducción de brotes adventicios.....	45
<b>Tabla 14.</b>	Porcentajes de contaminación de los grupos controles y experimentales de los 10 árboles utilizados.....	49
<b>Tabla 15.</b>	Porcentajes de oxidación de los grupos controles y experimentales de los 10 árboles utilizados.....	52
<b>Tabla 16.</b>	Valores determinados por el ANOVA para No Brotes, Tamaño, Color y Apariencia en explantes con meristemo apical.....	57
<b>Tabla 17.</b>	Valores determinados por la prueba de rangos múltiples (LSD) por tratamiento para el número de brotes en explantes con meristemo apical y decapitados.....	58
<b>Tabla 18.</b>	Valores determinados por el ANOVA en los explantes con meristemo apical para No Brotes, Tamaño, Color y Apariencia, en la interacción de las citocininas KIN y 2iP.....	59
<b>Tabla 19.</b>	Valores determinados por la prueba de rangos múltiples (LSD) en el efecto de la concentración de 2iP para el número de brotes en explantes con meristemo apical.....	59
<b>Tabla 20.</b>	Valores determinados por el ANOVA en los explantes decapitados para No Brotes, Tamaño, Color y Apariencia, en la interacción de las citocinina KIN y 2iP.....	60
<b>Tabla 21.</b>	Valores determinados por la prueba de rangos múltiples (LSD) en el efecto de la concentración de 2iP para el número de brotes y la concentración de KIN para la apariencia en explantes decapitados...	60
<b>Tabla 22.</b>	Efecto de BA y 2,4-D en la inducción de callo de acículas de <i>Taxus globosa</i> Schltld. y porcentaje de crecimiento de callo.....	63



ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Distribución geográfica de las especies del género <i>Taxus</i> .....	3
<b>Figura 2.</b>	Distribución geográfica y nombres comunes asignados en México y Centroamérica de <i>Taxus globosa</i> Schltld.....	9
<b>Figura 3.</b>	<i>Taxus globosa</i> Schltld.....	10
<b>Figura 4.</b>	Selección del material vegetal y respuesta morfogénica .....	16
<b>Figura 5.</b>	Técnicas de cultivo de tejidos <i>in vitro</i> .....	24
<b>Figura 6.</b>	Proceso de desinfección <i>in vitro</i> de <i>Taxus globosa</i> Schltld.....	40
<b>Figura 7.</b>	Contaminación por microorganismos en los explantes de los grupos experimentales después de 30 días de incubación.....	47
<b>Figura 8.</b>	Contaminación por hongo endógeno de consistencia algodonosa.....	47
<b>Figura 9.</b>	Contaminación por hongos exógenos de diferentes formas.....	48
<b>Figura 10.</b>	Porcentaje de contaminación de los grupos experimentales por bacteria, hongo endógeno y hongo exógeno.....	49
<b>Figura 11.</b>	Porcentaje total de contaminación en los grupos experimentales.....	50
<b>Figura 12.</b>	Variables de respuesta de los grupos experimentales.....	51
<b>Figura 13.</b>	Explantos pertenecientes al Ar8 del grupo experimental.....	52
<b>Figura 14.</b>	Porcentajes de oxidación de los grupos experimentales.....	53
<b>Figura 15.</b>	Explantos con diferentes grados de oxidación.....	53
<b>Figura 16.</b>	Porcentaje total de oxidación.....	54
<b>Figura 17.</b>	Comparación de los explantes del Ar1 en los dos establecimientos que se le realizaron.....	55
<b>Figura 18.</b>	Comparación de los explantes del Ar20 en los dos establecimientos que se realizaron.....	56
<b>Figura 19.</b>	Explantos del grupo control del Ar8 del grupo control.....	56
<b>Figura 20.</b>	Morfología de los tres tipos de callo en la fase de inducción de callo.....	62
<b>Figura 21.</b>	Inducción de callo a partir de acículas.....	62
<b>Figura 22.</b>	Situaciones que se presentaron en el mantenimiento y multiplicación de callo.....	64
<b>Figura 23.</b>	Crecimiento de callo en la inducción de brotes adventicios.....	67
<b>Figura 24.</b>	Aspecto de las líneas celulares en suspensión contenidas en los matraces al término de 30 días.....	68
<b>Figura 25.</b>	Proceso para la iniciación del cultivo de células en suspensión de <i>Taxus globosa</i> Schltld.....	70

**ABREVIATURAS**

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
2iP	6-( $\gamma,\gamma$ dimetilalilamino) purina
Ac. Asc.	Ácido ascórbico
Ac. Cit.	Ácido cítrico
AIA (IAA)	Ácido indol-3-acético
AIB (IBA)	Ácido indol-3-butírico
ANA (NAA)	Ácido 1-naftalenacético
BAP (BA)	6-bencilaminopurina
B5	Medio de cultivo de Gamborg y col., 1968
CA	Carbón activado
CCC	Cloruro de clorocolina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FDA	Administración de alimentos y fármacos (Food and Drug Administration)
GA <sub>3</sub>	Ácido giberélico 3
GC	Grupo control
GE	Grupo experimental
KIN	6-furfurilaminopurina
MeJA	Jasmonato de metilo
MS	Medio de cultivo de Murashige y Skoog, 1962
Pic	Picloram
PVP	Polivinilpirrolidona
RNA	Ácido ribonucleico
SH	Medio de cultivo de Schenk y Hildebrandt, 1972
TDZ	Tidiazuron
WPM	Medio de cultivo de Lloyd y McCown, 1980

### RESUMEN

La importancia del género *Taxus* radica en que todas sus especies producen en su corteza, hojas, tallos y raíces un compuesto denominado paclitaxel, el cual fue aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) para el tratamiento de diversos tipos de cáncer (Oberlies y Kroll, 2004). Por tal motivo, el género *Taxus* ha sido objeto de investigaciones para la extracción y el aprovechamiento del paclitaxel. Existen varias alternativas para la producción de paclitaxel como son la síntesis química total, la semisíntesis y la producción *in vitro* por cultivos celulares (Heining y Jennewein, 2009).

De todas las especies del género, la menos estudiada es el tejo mexicano, *Taxus globosa* Schltl., la cual tiene una distribución discontinua y restringida a microhábitats muy particulares, considerada como rara en las categorías oficiales de conservación de especies (Soto-Hernández y col., 2011).

Su preservación es particularmente importante, considerando su distribución restringida y su uso potencial para propósitos medicinales debido a que, como el resto de las especies del género, produce paclitaxel. Al considerar los aspectos botánicos de la especie, además de la importancia económica que representa, es deseable implementar técnicas alternativas para su propagación. Un método que facilita la rápida regeneración de plantas, así como su aprovechamiento sustentable, consiste en el cultivo de células y tejidos vegetales, representando una invaluable ventaja y una promisorio fuente de materia prima para la producción de paclitaxel, ya que a la planta le toma cerca de cien años alcanzar dimensiones adecuadas (diámetro de 25 cm y altura de 6 a 9 m) para la utilización de su corteza (Soto y col., 2000).

El objetivo principal del presente trabajo fue el establecimiento *in vitro* de los explantes de *Taxus globosa* Schltl. Se observó el crecimiento de tres tipos diferentes de microorganismos: bacterias, hongos endógenos y hongos exógenos, siendo el porcentaje de contaminación del 12%. También se observó un comportamiento errático en cuestión del proceso de oxidación, sin embargo con la utilización de antioxidantes como el ácido cítrico al 0.3% en acción conjunta con ácido ascórbico al 0.2% se redujo el proceso de oxidación teniendo un 64.6% de explantes verdes, considerándose un porcentaje alto para una especie con la cual no se había trabajado previamente *in vitro*.

## **1. INTRODUCCIÓN**

México cuenta con numerosas especies forestales nativas las cuales constituyen uno de los recursos naturales más importantes, además de poseer un gran valor e interés científico, ya sea por su importancia ecológica, por su valioso potencial genético o por ser consideradas como una alternativa económica interesante. Con respecto a este último aspecto, las plantas superiores no sólo proveen de alimentos, fibras y madera, sino también de muchos compuestos tales como aceites, condimentos y productos farmacéuticos. Aunque son recursos renovables, algunas especies son más difíciles de obtener en cantidades suficientes para cubrir la demanda. La destrucción de hábitats naturales, el mal manejo en la explotación de las especies, las prácticas clandestinas, el proceso prolongado que requieren algunas especies en su regeneración natural, así como, las dificultades en las técnicas de cultivo convencionales reducen drásticamente las poblaciones naturales. Tal es el caso de las especies del género *Taxus*.

Un acontecimiento que repercutió a la disminución de poblaciones naturales del género *Taxus*, principalmente de la especie *brevifolia*, fue debido a las técnicas implementadas en su inicio para la extracción del paclitaxel. La corteza de *T. brevifolia* es delgada (cerca de 3 mm); de un árbol de cien años se obtiene en promedio, 3 Kg de corteza, de los cuales se extraen 300 mg de paclitaxel, de tal forma que era necesario el descortezamiento de tres a seis árboles centenarios para la obtención de 1 g de paclitaxel o para el tratamiento de un solo paciente (Zwawiak y Zaprutko, 2014; Soto y col., 2000).

### 1.1 Antecedentes generales

#### 1.1.1 Género *Taxus*

La Familia Taxaceae esta conformada por seis géneros: *Amentotaxus*, *Austrotaxus*, *Cephalotaxus*, *Pseudotaxus*, *Taxus* y *Torreya* (Christenhusz y col., 2011). El género *Taxus* es el más conocido de la familia y el que presenta una distribución más amplia; los individuos de este género comúnmente se conocen como tejos. La denominación latina *Taxus* proviene del griego “ taxis ” que significa ordenado en filas, característica que poseen todos los miembros del género haciendo referencia al acomodo de sus hojas aciculares decurrentes sobre la rama (Fernández y col., 2004). Existe una base botánica a considerar y es que las especies actuales del género descienden de *Paleotaxus* un árbol fósil abundante en la mitad del Jurásico hace 200 millones de años (Florin, 1948).

Una de las polémicas del género radica en su clasificación taxonómica (Pant, 2000). Otra dificultad se presenta en la determinación de la cantidad de especies, partiendo principalmente por la distribución geográfica y morfológica para su delimitación (Hao y col., 2008), así como, la realización de estudios químicos (van Rozendaal y col., 1999; Dempsey y Hook, 2000; Ge y col., 2008) y genéticos (Gao y col., 2007). Dependiendo del autor, existen variantes en el número de especies propuestas: ocho de acuerdo a Spjut (2007a), nueve según reporta Liguó y col. (1999), diez según Cope (1998), Farjon (2001) y Li y col. (2001) y por último, Spjut (2007b) reporta veinticuatro. La mayor controversia se encuentra en las especies del continente asiático (Möller y col., 2007).

La clasificación mayormente aceptada para el género es la de 10 especies propuesta por Farjon (2001), la distribución es, de la siguiente manera: en Norte y Centroamérica las especies: *Taxus globosa* Schltld., *Taxus canadensis* Marsh., *Taxus brevifolia* Nutt. y *Taxus floridana* Nutt. En Europa, Norte de África y Zona del Cercano Oriente solo se encuentra la especie *Taxus baccata* L. y en Asia Oriental se encuentran a las especies *Taxus chinensis* (Pilg.) Rehd., *Taxus cuspidata* Sieb. y Zucc., *Taxus fuana* Nan Li & R.R., *Taxus sumatrana* (Miq.) de Laub. y *Taxus wallichiana* Zucc. (Figura 1 y Tabla 1).

Establecimiento *in vitro* de *Taxus globosa* Schldl.

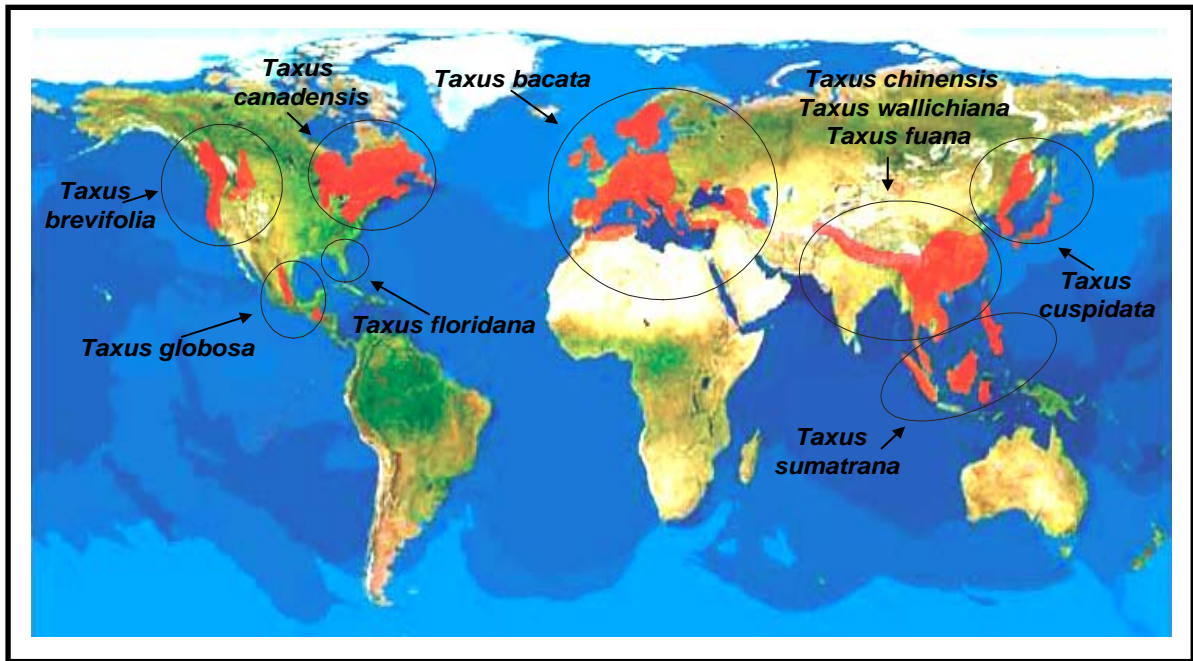


Figura 1. Distribución geográfica de las especies del género *Taxus*.

Tabla 1. Especies del género *Taxus* y su ubicación geográfica basado de Farjon (2001).

Especie	Nombre Común	Distribución Geográfica
<i>Taxus baccata</i> L.	Tejo europeo	Europa, norte de África y oeste de Asia (de Turquía al norte de Irán)
<i>Taxus brevifolia</i> Nutt.	Tejo del Pacífico o del oeste	Región costa del Pacífico de Norteamérica (de Alaska a California)
<i>Taxus canadensis</i> Marsh.	Tejo canadiense	Noreste de Norteamérica: de Newfoundland a Manitoba (Canadá) y de Iowa y Carolina del Norte (EUA)
<i>Taxus chinensis</i> Rehd.	Tejo chino	China
<i>Taxus cuspidata</i> Sieb.	Tejo japonés	China, Japón, Corea del Norte y oeste de Rusia
<i>Taxus floridana</i> Nutt.	Tejo de Florida	Endémico del Norte de Florida
<i>Taxus fuana</i> Nan Li y R.R.	Tejo chino	Oeste del Himalaya
<i>Taxus globosa</i> Schldl.	Tejo mexicano	México, Guatemala, El Salvador y Honduras
<i>Taxus sumatrana</i> (Miq.) de Laub.	Tejo de Sumatra	Indonesia y Filipinas
<i>Taxus wallichiana</i> Zucc.	Tejo del Himalaya	Desde el oeste de Afganistán, Tibet hasta China

### 1.1.2 Descripción botánica del género *Taxus*

Los árboles del género *Taxus* son perennifolios; hojas dispuestas en espiral, pero frecuentemente dísticas, cortamente pecioladas. Estróbilos masculinos axilares, solitarios o rara vez en espigas cortas (Liguó y col., 1999). Óvulo solitario sobre una escama terminal, axilar, cubierto por numerosas escamas estériles, anchas, fuertemente imbricadas, las superiores gradualmente más grandes, casi formando una cúpula, lámina ovulífera anular en la antesis, volviéndose prominente con el tiempo, cupulada y truncada, más corta que la semilla; semilla madura ovoide-globosa, testa dura, cubierta parcialmente por un arilo carnoso, en forma de baya, de color rojo brillante, embrión con 2 cotiledones (Zamudio, 1992).

Son árboles dioicos, excepto la especie *Taxus canadensis* la cual es monoica (Allison, 1990) y algunos alcanzan hasta los 25 metros de altura. En general, son árboles longevos, como lo muestran ejemplares ingleses que alcanzan 1,500 años de edad (Centelles e Imperial, 2010). Su gran longevidad radica en su forma peculiar de regeneración, en árboles viejos, se ha observado que a partir del cambium existente en partes superiores del fuste, el tejo es capaz de emitir raíces hacia el interior del tronco hueco, absorbiendo los nutrientes de la madera muerta en proceso de humificación, luego estas raíces internas avanzan hacia abajo hasta alcanzar el suelo, ya sobre la superficie comienzan a desarrollar corteza hasta transformarse en nuevos troncos (Schwentner, 2008). Los lugares donde habitan las plantas de *Taxus* en el mundo son hondonadas de montañas, cañadas, barrancas y otros lugares sombríos (Zavala-Chávez y col., 2001). Se encuentran aislados o en pequeños grupos, asociados con otros árboles en lugares húmedos y sombreados, parece ser que no toleran los rayos directos del sol y crecen preferentemente en suelos alcalinos. Su amplia distribución geográfica radica en que las aves son atraídas por el color rojo y sabor dulce del arilo que presenta el fruto (el cual es la única estructura del árbol que no es tóxica), los comen y arrojan las semillas como desecho, de este modo participando en su dispersión (Zavala-Chávez y col., 2001).

### 1.1.3 Utilización e importancia económica del género *Taxus*

En Europa, antiguamente diferentes pueblos otorgaron a los arboles del tejo características mágico-religiosas, al considerarlos árboles sagrados a causa de su permanente verdor y longevidad, pero también temibles por su toxicidad (Fernández y col., 2004; Blanco y col., 2008). Para los irlandeses era un símbolo de la vida y de la muerte. Usaban su madera para realizar instrumentos religiosos, lo representaban en su alfabeto, promovieron severas leyes y sanciones para el que los dañara (Delahunty, 2007). Los pueblos Celtas construían sus templos y altares cerca de los tejos (Fernández y col., 2004).

Los usos económicos de las especies de *Taxus* en América del Norte datan desde las civilizaciones precolombinas, donde se les utilizaba para hacer armas, objetos para labrar, y cocinar, y también se le utilizaba para realizar objetos de arte (Shemluck y col., 2003). *Taxus baccata* se hizo popular en los jardines europeos del siglo XVII, fue aprovechada como ornamental primero en Europa y posteriormente en América (Blanco y col., 2008). En general, diversas especies de *Taxus* se cultivan para una gran variedad de propósitos hortícolas, particularmente en jardines como árboles de ornato o setos (Zavala-Chávez y col., 2001) y localmente se les utiliza como leña y carbón (Zavala-Chávez, 2001). Por las características de su madera, la cual tiene gran flexibilidad y dureza, se le ha empleado desde la antigüedad para la elaboración de armas, especialmente arcos y ballestas (Schwentner, 2008) y fabricación de muebles (Blanco, 2008).

En la medicina tradicional se le ha utilizado como abortivo, una de las causas principales de envenenamiento humano (Cope, 2005), por lo que también suele ser llamada el árbol de la muerte, justificado por el carácter tóxico de todas las estructuras del árbol, excepto el arilo. Las Tribus americanas usaban brebajes de *T. brevifolia* para tratar el reumatismo, fiebre y artritis, mientras que los japoneses empleaban las hojas de *T. cuspidata* para tratar la diabetes e inducir los abortos (Fernández y col., 2004)

Se ha demostrado su efectividad como antimicótico (Krauze-Baranowska y Wiwart, 2003), en la ulcerosis (Gurbuz y col., 2004), en la malaria (Pouvelle y col., 1994), anticonvulsivo, analgésico y antipirético (Nisar y col., 2008), antimicobacterial (Erdemoglu y col., 2003), inmunomodulador y antiinflamatorio (Sharma y Grag, 2015).



## **Establecimiento *in vitro* de *Taxus globosa* Schltl.**

---

Se han podido obtener híbridos artificialmente, como es el caso de *Taxus x media* Rehder., obtenido de *Taxus baccata* y *Taxus cuspidata*; y *Taxus x hunnewelliana* Rehder., obtenido de *Taxus cuspidata* y *Taxus canadensis* (Collins y col., 2003).

Con respecto a la especie mexicana *Taxus globosa* Schltl., los usos locales que se le ha dado son poco conocidos, rara vez se usa como planta de ornato, maderable, curtiente, en la elaboración de carbón, en la construcción y en la confección de ramos de muertos (Zamudio, 1992; García-Aranda y col., 2011).

Pero la gran importancia económica del género *Taxus* radica con el descubrimiento en 1964 de un compuesto extraído de la corteza de *Taxus brevifolia* Nutt. (tejo del pacífico), del cual en 1971 se determinó su estructura química, recibiendo el nombre de paclitaxel, siendo éste uno de los miembros estructuralmente más complejos de los taxanos alcaloides diterpénicos naturales (Wani y col., 1971). Más tarde se descubrió que todas las especies del género *Taxus* lo producen en su corteza, hojas, tallos y raíces (Soto y col., 2000; Jennewein y Croteau, 2001), siendo posteriormente aprobado por la FDA (Food Drug Administration) como anticancerígeno y empleado en el tratamiento de diversos tipos de cáncer, como el cáncer ovárico y el de mama (Blanco y col., 2008). Ante esto el género *Taxus* ha sido objeto de investigaciones para la extracción y el aprovechamiento del paclitaxel.

Dada la importancia, principalmente en el sector salud, es necesario implementar alternativas para la extracción de paclitaxel, sin causar impacto en las poblaciones naturales.

#### 1.1.4 *Taxus globosa* Schltld.

La familia Taxaceae se encuentra representada en México por el género *Taxus* con una sola especie, *Taxus globosa* Schltld., y su clasificación taxonómica se muestra en la tabla 2.

**Tabla 2.** Clasificación taxonómica de la especie *Taxus globosa* Schltld.

Reino	Plantae
División	Pinophyta
Clase	Pinopsida
Orden	Pinales
Familia	Taxaceae
Género	<i>Taxus</i>
Especie	<i>globosa</i>

*Taxus globosa* Schltld. fue descrita por primera vez en 1838 por el botánico alemán Diederich Franz Leopnhard von Schlechtendal, con material colectado por Christian Ehrenberg (Shemluck y col., 2003).

Se le conoce comúnmente como tejo mexicano, sin embargo, en México recibe otros nombres, según la localidad donde se encuentre: granadillo (Querétaro), mezquitillo (Nuevo León), romerillo (Hidalgo y Veracruz), tacxi ó tlastscal (Oaxaca), chachún ó romerillo colorado (Chiapas) (Contreras-Medina y Luna-Vega, 2001) en Centroamérica como cipresillo y Norteamérica como Mexican yew (Contreras-Medina y col., 2011).

Su distribución geográfica es discontinua en el país, se distribuye a lo largo de la Sierra Madre Oriental; 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 (Contreras-Medina y col., 2011). Habita en lugares poco accesibles (hondonadas de montaña, cañadas, barracas y lugares sombríos), bosques mesófilos de montaña o de coníferas, en un intervalo altitudinal variable, desde los 1000 msnm en Querétaro, hasta los 3000 msnm en Oaxaca (Soto-Hernández y col., 2011) (Figura 2). Nuevo León es el estado que presenta la mayor cantidad de individuos

y con el mejor potencial en su regeneración natural (López-Upton y García-Martí, 2015).

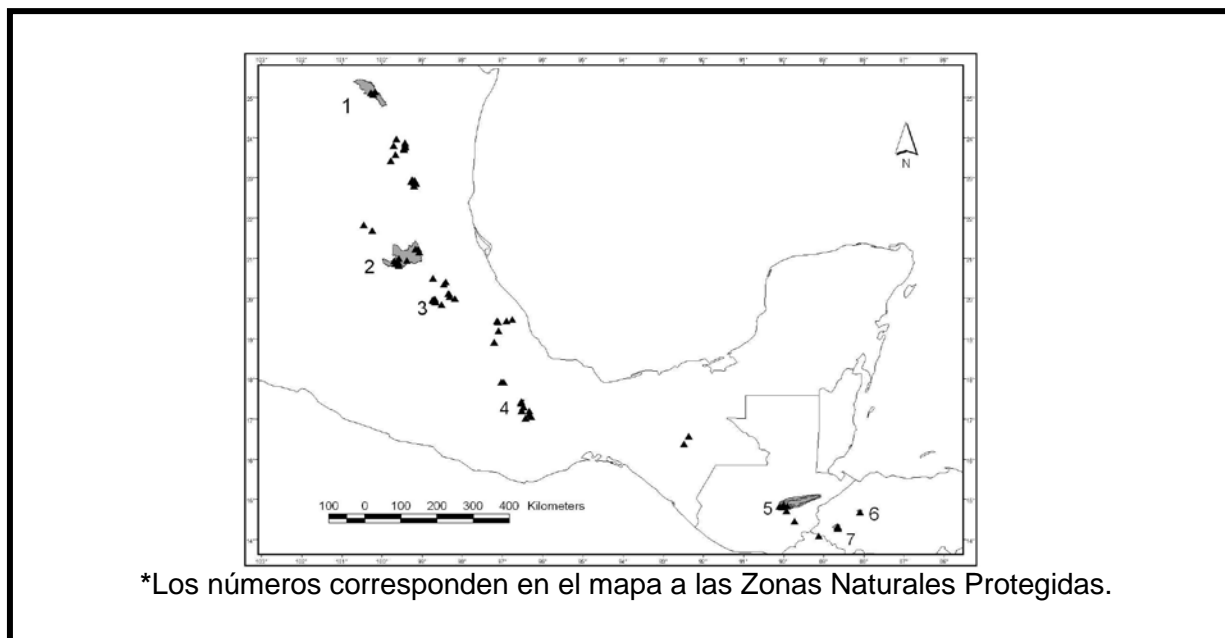
Es un árbol que alcanza hasta 20 m, a menudo con un solo tronco, siendo en altura el más bajo del género. El tamaño y la forma de la hoja es uno de los caracteres más variables del género. Al parecer, estos caracteres son influenciados altamente por condiciones ambientales en los primeros tiempos del desarrollo de la hoja. En *T. globosa*, el tamaño de la acícula es variable, hasta 2.0 mm de grosor y 30 mm de longitud (Shemluk y col. 2003) (Figuras 3b y 3c). Su tronco es erecto, de 30 a 50 cm de diámetro, muy ramificado, con las ramas colgantes (Figura 3a) formando una copa redondeada o extendida; la corteza es escamosa de color café claro, que se desprende en fragmentos cuadrados o rectangulares; hojas distribuidas en espiral, las cuales posteriormente se disponen en forma dística o subdística por la torsión del pecíolo, aplanadas, lineares a linearlanceoladas, ligeramente falcadas, ápice agudo, acuminado, base angosta, pecíolo corto, márgenes ligeramente involutos, una sola vena media engrosada, verde oscuras en el haz, más claras en el envés, con hileras de estomas en el envés (Contreras-Medina y Vega-Luna, 2001).

Los árboles femeninos presentan brotes primarios sobre los cuales se desarrollan brotes secundarios, que a su vez son portadores de un óvulo terminal que en su eje axilar tiene escamas arregladas helicoidalmente, el cual, al madurar, se cubre con una estructura carnosa de color rojo (arilo), comestible y muy atractiva para las aves (Figura 3d). Los árboles masculinos presentan sus estructuras reproductoras en diminutos estróbilos formadas por 5 a 9 sacos polínicos. Florece de enero a marzo y fructifica de mayo a noviembre (Zavala-Chávez y col., 2001). Las semillas tienen una cubierta carnosa y mucilaginoso de color rojo llamada arilo, presentando una abertura en su parte inferior por la cual se puede ver la semilla. La semilla sin el arilo son piriformes con una longitud de alrededor 6.5 mm y con un peso promedio de 0.44 g en estado maduro, (Ramírez-Sánchez y col., 2011).

*Taxus globosa* se considera rara en las categorías oficiales de conservación de especies (NOM-050-ECOL-2000), y por tal motivo está sujeta a protección especial. La creciente destrucción de los bosques en que habita puede afectar drásticamente a las pocas poblaciones que existen y ocasionar su desaparición, aunado a esto, su crecimiento en su hábitat natural es lento y el

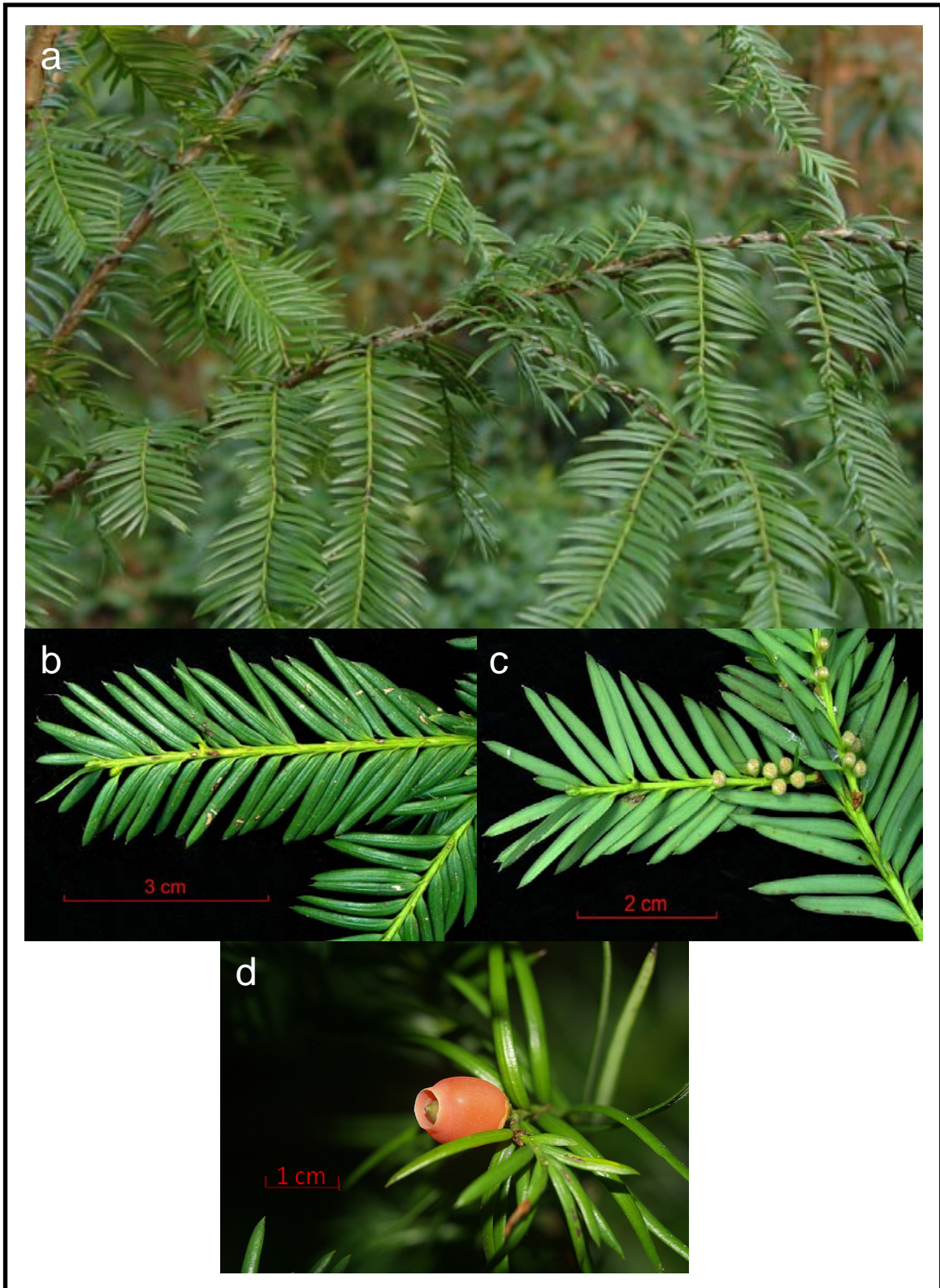
## Establecimiento *in vitro* de *Taxus globosa* Schtdl.

número de adultos en estado de reproducción son escasos condicionando a la especie a estar en peligro de desaparecer (López-Upton y García-Martí, 2015). Por tal motivo es importante generar investigaciones para obtener información que permita la repoblación y conservación.



México	Ubicación Geográfica Principal	Nombre Común
Nuevo León	Parque Nacional Cumbres de Monterrey <sup>1</sup>	mezquitillo
Tamaulipas	Zona de Restauración Ecológica del Lobo Mexicano	mezquitillo
San Luis Potosí	Cerro del Diente, El Cielo y Julilo	mezquitillo
Hidalgo	Mesa de San Isidro	romerillo
Querétaro	Parque Nacional El Chico <sup>3</sup>	romerillo
Puebla	Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán	granadillo
Veracruz	Reserva de la Biosfera Sierra Gorda <sup>2</sup>	romerillo
Chiapas	Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán	romerillo
Oaxaca	Parque Nacional Pico de Orizaba	romerillo
	Parque Nacional Cofre de Perote	romerillo
	Meseta Central de Chiapas	chachún ó colorado
	Tierra de Manejo Comunitario La Tierra del Faisán <sup>4</sup>	
	Zona de Conservación Comunitaria Santo Domingo Cacalotepec	tacxi ó tlastcal
<b>Guatemala</b>		
Baja Verapaz	Reserva de la Biosfera Sierra de las Minas <sup>5</sup>	ciprecillo
El Progreso		
<b>Honduras</b>		
Lempira	Parque Nacional Celaque <sup>7</sup>	ciprecillo
Santa Bárbara	Parque Nacional Montaña de Santa Bárbara <sup>6</sup>	ciprecillo
<b>El Salvador</b>		
Chalatenango	Reserva Ecológica El Pital	ciprecillo

**Figura 2.** Distribución geográfica y nombres comunes asignados en México y Centroamérica de *Taxus globosa* Scitdl.



**Figura 3.** *Taxus globosa* Schtdl. a) Parte aérea de un árbol mostrando sus ramas; b) Segmento de una rama (parte ventral); c) Segmento de una rama (parte dorsal) observándose el acomodo de los estróbilos y d) Estróbilo femenino, apreciando la estructura carnosa de color rojo la cual envuelve la semilla denominada arilo.

### 1.1.5 Historia del paclitaxel

Químicamente, el paclitaxel es uno de los miembros estructuralmente más complejos de los taxanos, alcaloides diterpénicos naturales, el cual tiene propiedades anticancerígenas (Wani y col., 1971). El pionero en lo que concierne a trabajos sobre el paclitaxel fue el Instituto Nacional de Cáncer (NCI, por sus siglas en inglés) que en la década de los años 50's puso en marcha un programa para experimentar con extractos de plantas, utilizando dos modelos experimentales: un modelo de tumores *in vivo* y otro de tumores de líneas celulares *in vitro*, (Guénard y col., 1993) con la finalidad de encontrar sustancias naturales con propiedades anticancerígenas, en esta fase inicial se sometieron a evaluación más de 110,000 extractos de plantas (Fu y col., 2009). Con la ayuda del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), en 1962 el botánico Arthur Barclay colectó muestras de *Taxus brevifolia* (Renneberg, 2007). En 1964 Wani y Wall descubrieron una actividad citotóxica en extractos de la corteza de *T. brevifolia* y aislaron una sustancia cristalina, la cual se denominó paclitaxel (Lesney, 2004). En 1971 Wani y su equipo, determinaron y publicaron la estructura química del paclitaxel. La determinación de la molécula de paclitaxel se realizó mediante la espectrometría de masas y análisis elemental, siendo su fórmula química  $C_{47}H_{51}NO_{14}$  (Wall y Wani, 1995).

Wall y Wani (1977) realizaron una investigación sobre la actividad anticancerígena de diversas sustancias en donde el paclitaxel formaba parte, y descubrieron que éste no sólo se encontraba en la corteza de *Taxus brevifolia*, si no también se encontraba en otras especies del género *Taxus*. En 1978 se probó en ratones al implantarles tumores mamarios humanos, donde se observó una regresión considerable del tumor y en los años 80's se demostró su eficacia contra el cáncer de ovario (Guénard y col., 1993; Walsh y Goolman, 2002).

En 1979 el equipo al mando de la Dra. Susan Horwitz determinaron la forma de acción del paclitaxel, el cual tiene un novedoso modo de acción: polimeriza y estabiliza los microtúbulos, bloqueando la replicación celular en la fase tardía G2-M del ciclo celular, a diferencia de los agentes clásicos antimetabólicos, tales como la colchicina y la vinblastina, los cuales desestabilizan los microtúbulos (Schiff y col., 1979).

Posteriormente, debido a los excelentes resultados clínicos en casos de cáncer de ovario, en 1992 fue aprobado por la FDA (Food and Drug

## Establecimiento *in vitro* de *Taxus globosa* Schldl.

Administration) para su uso clínico (Jenneweih y Croteau, 2001); Luego en 1994 fue aprobado para tratar el cáncer de mama y en 1997 para tratar el sarcoma de Kaposi en pacientes con SIDA (Oberlies y col., 2004). Su eficacia se ha probado en la regresión de otros tipos de cáncer, como el de pulmón, cabeza, cuello, próstata, esofágico, gastrointestinal, pancreático, hepático, vejiga, melanoma, linfoma de Hodkins, adenocarcinoma y carcinoma de células escamosas (Fauzee y col., 2011) (Tabla 3). Comúnmente recibe el nombre de Taxol<sup>®</sup>, nombre con el cual lo comercializa la empresa Bristol-Myers-Squibb, la primera farmacéutica en producir el anticancerígeno. Hoy en día existen otros productos farmacéuticos y nuevas formulaciones en el mercado donde su principio activo es el paclitaxel, como es el caso del Abraxane<sup>™</sup> comercializado por la empresa American Pharmaceutical Partners, Incorporated (APP) (Bimer, 2005; Yared y Tkaczuc, 2012). También se ha obtenido su análogo semisintético docetaxel (Taxotere<sup>®</sup>) extraído de las acículas del árbol *Taxus baccata* L. (Yared y Tkaczuk, 2012).

**Tabla 3.** Eventos históricos del paclitaxel.

Año	Evento	Referencia
Años 50's	La NCI de EU pone en marcha un programa para la experimentación de plantas	Guenard y col., 1993
1962	Colecta de muestras de <i>T. brevifolia</i> por Barclay	Lesney, 2004
1964	Wani y Wall descubren un compuesto químico en <i>T. brevifolia</i> el cual denominan paclitaxel	Walsh y Goolman, 2002
1971	Publicación de la estructura química del paclitaxel	Wani y col., 1971
1977	Se descubre que el paclitaxel tiene propiedades anticancerígenas y que todas las especies del género <i>Taxus</i> lo contienen	Wall y Wani, 1977
1979	Se determina su mecanismo de acción	Schiff y col., 1979
Años 80's	Se prueba su eficacia contra el cáncer de ovario y su efectividad contra tumores mamarios	Schiff y Horwitz, 1980
1992	La FDA aprueba su uso clínico en el tratamiento del cáncer de ovario	Jenneweih y Croteau, 2001
1994-1997	Se obtiene la síntesis química total. Se aprueba para el uso clínico del tratamiento de cáncer de mama y sarcoma de Kaposi.	Nicolaou y col., 1994
Años 90's	Se aprueba su eficacia en diferentes tipos de cáncer	Heinstein y Chang, 1994
Actualidad	Búsqueda de alternativas para su obtención comercial, siendo el Cultivo de Tejidos Vegetales una opción para el abastecimiento	Tabata, 2004

### 1.1.6 Problemática de abastecimiento y fuentes del paclitaxel

Hasta hace pocos años, la corteza de *Taxus brevifolia* era la única fuente del paclitaxel. El problema se acrecentó en la década de los años 90's, ya que, aproximadamente era necesario el descortezamiento de 4,000 árboles del tejo del pacífico para proporcionar 360 g de paclitaxel para los ensayos clínicos tempranos, y esto aumentó a 38,000 árboles para 25 kg de paclitaxel para el tratamiento de 12,000 pacientes (Mann, 2002). Sin embargo, su abastecimiento a partir de las fuentes naturales no ha podido satisfacer la demanda para usos clínicos debido a la escasez de poblaciones naturales del género *Taxus*, el período de dormancia que tienen las semillas, el lento crecimiento de los árboles y al bajo contenido de paclitaxel en su corteza (40-100 mg/kg). Otras fuentes alternativas para el suministro del alcaloide incluyen la extracción a partir de otras especies de *Taxus* (Luo y col., 2001), semisíntesis a partir de precursores de taxanos, síntesis química y producción *in vitro* por cultivos celulares (Tabla 4).

La síntesis total es una ruta demasiado costosa, debido a la serie de procesos complicados que se requieren para la obtención de paclitaxel (Walji y McMillan, 2007). Aunque la semisíntesis es actualmente la mayor fuente de paclitaxel, la obtención del precursor 10-deacetylbaccatin III aún constituye un problema, además que el contenido de taxoides es muy variable debido a factores ambientales y epigenéticos, por el lento crecimiento de los árboles y además se necesita un proceso de purificación el cual es muy costoso.

Por otro lado, el cultivo celular de *Taxus spp.* se considera una de las más prometedoras fuentes de paclitaxel y compuestos relacionados (Tabata, 2004). El cultivo *in vitro* de células en suspensión a partir de callos ha sido piedra angular como herramienta promisoría para el abastecimiento, la optimización de la tasa de producción y el incremento del paclitaxel. Mientras tanto la propagación *in vitro* de las diferentes especies de *Taxus* sigue siendo la clave para la conservación de las poblaciones naturales. La producción de paclitaxel por medio del cultivo de callos y células en suspensión se ha realizado en *T. chinensis* (Pérez y col., 2004), *T. wallichiana* (Hien y col., 2004), *T. brevifolia* (Khosroushahi y col., 2011), *T. baccata* (Ashrafi y col., 2010) y *T. globosa* (Tapia y col., 2013).

En los últimos 20 años se ha trabajado en la regeneración *in vitro* en varias especies de *Taxus*: se ha realizado la micropropagación de *T. baccata* (Abbasin y col., 2010; Sapam y Laisram 2012); la organogénesis de *T. wallichiana* (Datta y



## Establecimiento *in vitro* de *Taxus globosa* Schldl.

col., 2006; Hussain y col., 2013); la embriogénesis somática de *T. brevifolia* (Chee, 1996) y *T. wallichiana* (Datta y Jha, 2008), así como la micropropagación de *T. mairei* a partir de explantes derivados de árboles maduros (Chang y col., 2001) y la propagación por yemas axilares de *T. baccata*, a partir de embriones cigóticos (Majada y col., 2000).

**Tabla 4.** Diferentes alternativas para la obtención del paclitaxel y alternativas en el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*.

Semisíntesis (a partir de precursores de taxanos)		Denis y col., 1988
		Kingston y col., 1992
		Wender y Mucciario, 1992
		Jenkins, 1996
		Gennari y col., 1997
Síntesis Química Total		Holton y col., 1994 a,b
		Nicolaou y col., 1994
		Danishetsky y col., 1996
		Morihira y col., 1998
		Kusama y col., 2000
Cultivo de Tejidos <i>in vitro</i>	Embriogénesis Somática	Chee, 1996
		Datta y Jha, 2008
	Organogénesis	Chee, 1995
		Datta y col., 2006
		Das y col., 2008
	Proliferación de Yemas axilares	Majada y col., 2000
		Nhut y col., 2007
		Ewald, 2007
		Abbasin y col., 2010
	Germinación	Chee, 1994
		Zarek, 2007
	Cultivos Celulares en Suspensión	Tang y col., 2001
		Bruňáková y col., 2005

### 1.2 Establecimiento *in vitro*

El nombre de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales indica el hecho de que todo el cultivo de alguna estructura vegetal (semillas, frutos, hojas, tallos, raíces etc.) se realiza bajo condiciones de asepsia en un medio nutritivo generalmente gelificado, en recipientes de vidrio y en condiciones ambientales controladas, en la espera de una respuesta morfogénica (George y Debergh, 2008).

Según Kane (2002) en la micropropagación de cualquier especie vegetal se requiere de cinco etapas fundamentales:

- a) Selección y preparación de la planta donadora.
- b) Establecimiento del cultivo aséptico.
- c) Proliferación de brotes axilares.
- d) Enraizamiento.
- e) Transferencia al medio ambiente natural.

El establecimiento *in vitro* es la etapa de iniciación y es determinante, ya que es donde se observa si realmente la manipulación de los tejidos vegetales están en condiciones de asepsia.

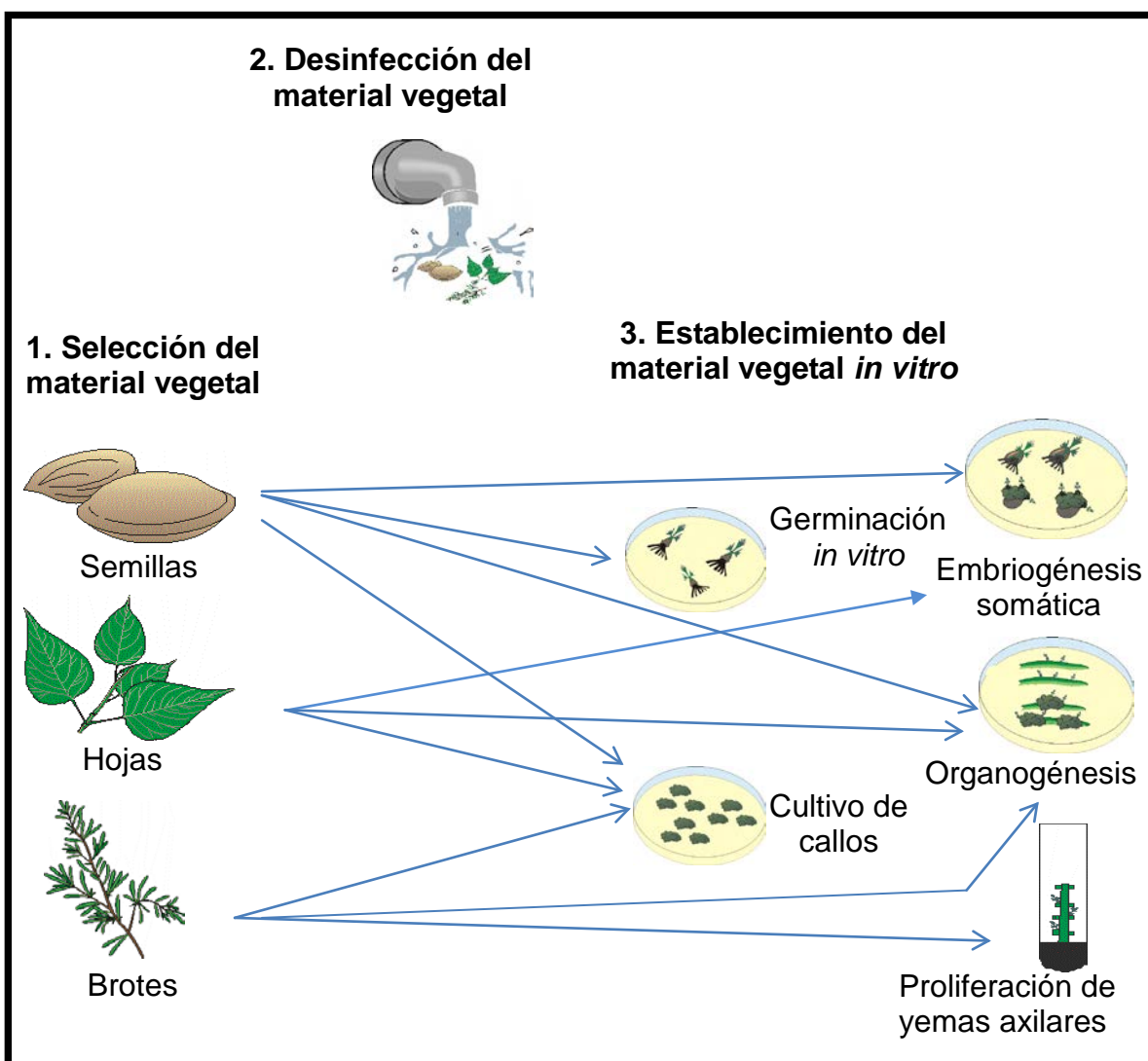
Los procesos que afectan el éxito o fracaso de esta etapa incluye: la selección del material vegetal, la eliminación de los microorganismos contaminantes de la superficie del explante y del medio de cultivo, así como las condiciones de cultivo e incubación de los explantes. La duración de esta etapa es variable y depende de cada especie, pero durante este período aparecen las primeras variables de respuesta esperadas (Hall, 2000).

#### 1.2.1 Selección del material vegetal

La selección del explante es fundamental en el establecimiento de tejidos vegetales, ya que estos deben ser fisiológicamente competentes para provocar la respuesta morfogénica apropiada. En general los tejidos más jóvenes, como las puntas de brotes terminales o axilares se regeneran mejor que otros tejidos del tallo más viejos y maduros. Las yemas florales y las inflorescencias inmaduras a menudo se regeneran con bastante facilidad. En relación a las yemas y a los órganos de almacenamiento se deben tomar en consideración los patrones de letargo estacional. Debido a que la capacidad de varios tejidos para responder en ciertas formas específicas parece ser debida a capacidades internas inherentes, obviamente la selección del explante es de gran importancia en la determinación

del éxito de la operación. El manejo apropiado de las plantas madre puede ser importante para obtener una regeneración exitosa y reducir la contaminación. Puede ser útil cultivar las plantas madres en condiciones de luz y temperatura controlada a fin de producir desarrollo de material en el estado fisiológico adecuado. En plantas leñosas es recomendable seleccionar material juvenil sano (Kane, 2000; George y Debergh, 2008).

La reducción de los contaminantes superficiales de las plantas madre ayuda en el proceso de desinfección. En general, las plantas madres cultivadas en macetas en el medio protegido de invernadero son mejores fuentes de explantes que las cultivadas en la intemperie o que crecen en su medio natural (Wickremesinhe y Arteca, 1993). Un factor importante a considerar consiste en la selección del explante inicial (semillas, brotes, hojas), ya que dependiendo de éste es la respuesta morfogénica figura 4.



**Figura 4.** Selección del material vegetal y respuestas morfogénicas.

### 1.2.2 Desinfección del material vegetal

La desinfección en el establecimiento *in vitro* es de suma importancia, ya que consiste en la eliminación de los microorganismos contaminantes (hongos y bacterias principalmente) de la superficie del explante, ya que si no se eliminaran, éstos afectarían al crecimiento normal del explante compitiendo por nutrientes del medio de cultivo ocasionándole su muerte.

La contaminación *in vitro* por mohos, bacterias o levaduras principalmente es considerado como uno de los problemas más severos que se presentan en los laboratorios de cultivo de tejidos vegetales, que repercuten en la investigación y en el comercio. Por lo tanto, es indispensable que se cuente con un protocolo para desinfectar o remover de los tejidos vegetales los microorganismos contaminantes (hongos, bacterias) y otros contaminantes sin dañar tanto la capacidad de regeneración del explante (Niedz y Bausher, 2002).

Los agentes desinfectantes utilizados incluye antibióticos y fungicidas, alcoholes, cloruro de mercurio, compuestos halógenos (clorina, bromita e iodina) y peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) (Niedz y Bausher, 2002).

En general, se puede indicar que casi siempre se utilizan soluciones de hipoclorito de calcio o de sodio (ampliamente disponibles con diferentes marcas comerciales como blanqueadores domésticos), los cuales liberan al cloro como agente desinfectante activo. Las concentraciones de hipoclorito de sodio, generalmente se utilizan al 6% y con alcohol al 70% (Chang y col., 2001; Zarek, 2007). También otros han utilizado en sus protocolos de desinfección peróxido de hidrógeno (Majada y col., 2000), cloruro de mercurio (Datta y col., 2006) y nitrato de plata (Ibrahim y col., 2011).

Usualmente, antes de poner el material vegetativo en contacto con el agente desinfectante, se sumerge en alcohol etílico al 70% con el cual se eliminan las ceras y grasas de la superficie vegetal y se permite una mejor penetración del agente desinfectante en el material. Algunos alcoholes (etílico, metílico ó isopropílico) en concentraciones del 70 al 75% también se emplean como desinfectantes, pero son muy tóxicos para el material vegetal, de manera que su empleo está restringido a inmersiones de corta duración y a la esterilización de superficies externas. Posteriormente con la finalidad de incrementar el efecto del agente desinfectante se recomienda adicionar a la solución un agente

humectante, tal es el caso de Tween. Por último, los agentes desinfectantes son eliminados por medio de varios lavados con agua bidestilada estéril.

El tipo de agente desinfectante utilizado, la concentración y el tiempo de desinfección debe ser determinado dependiendo la especie vegetal con la que se va a trabajar, la sensibilidad del tipo de material vegetativo (fitotoxicidad) y el costo (Beyl, 2000; Niedz y Bausher, 2002).

La mayoría de los microorganismos se encuentran en la superficie de los tejidos vegetales, sin embargo, existen evidencias de la presencia de algunos de ellos en la parte interna de las plantas los cuales son conocidos como microorganismos endógenos (endófitos). En el caso de las coníferas hay la evidencia de organismos endógenos (Liu y col., 2007) y particularmente en el género *Taxus* sp. (Rivera-Orduña y col., 2010).

### 1.2.3 Condiciones de cultivo e incubación

En esta etapa del establecimiento *in vitro* se da a conocer las medidas apropiadas que se van a implementar para favorecer el cultivo, las cuales estarán sujetas a las características de la especie con la que se está trabajando y también al proceso morfogénico que se está realizando y a las variables de respuesta que se pretenden evaluar.

En esas medidas se encuentran todos los elementos que conforman al medio de cultivo, como son: el medio basal, la fuente de carbono, los aditivos orgánicos e inorgánicos adicionales, los reguladores de crecimiento y el agente gelificante principalmente, indicando como se van a utilizar y las cantidades que se van a emplear. En general, la elección del medio basal va a depender de la especie con la que se quiera trabajar. Por ejemplo, el medio basal de Murashige y Skoog (1962) (MS) es el más ampliamente utilizado para la regeneración de muchas especies vegetales, pero existen medios basales específicos tal es el caso del medio de Lloyd y McCown (1980) el cual es utilizado para plantas leñosas (Beyl, 2000).

Las concentraciones y el tipo de reguladores de crecimiento que se van a utilizar será en cuestión de la variable morfogénica que se pretende obtener. Las auxinas juegan un rol importante para la elongación y aumento de volumen celular, la dominancia apical, la formación de raíces adventicias y la embriogénesis somática. Generalmente cuando la concentración de auxinas es

baja, favorece a la iniciación de raíces, y cuando la concentración es alta, se promueve la formación de callos. En contraste las citocininas promueven la división celular y estimulan la iniciación y crecimiento de brotes *in vitro*. Generalmente cuando la concentración de citocininas es alta induce la formación de brotes adventicios e inhibe la formación de raíces, también son las promotoras de la formación de brotes axilares y el rompimiento de la dominancia apical de las auxinas (Beyl, 2000).

También se señala el tipo de contenedor que se va a utilizar, el pH con el que se ajustará el medio de cultivo, así como la forma y las condiciones como se va a trabajar (utilización de autoclave, trabajar en campana de flujo laminar, entre otros).

Por último se fijan las características de incubación, que principalmente son el fotoperíodo, la temperatura y en el caso de cultivos de células en suspensión la velocidad de agitación, todas éstas condiciones estarán sujetas de acuerdo con el tipo de material vegetal con el que se esta trabajando.

### **1.2.4 Contaminación *in vitro***

Un aspecto principal del establecimiento *in vitro* de cualquier tipo de explante es el control de los microorganismos, que en condiciones *in vitro* pueden ser un serio problema. Para obtener un establecimiento con un porcentaje elevado de asepsia se deben de eliminar los microorganismos externos (exógenos) presentes en los explantes. También se deben de eliminar los microorganismos internos (endógenos) si se presentan en el cultivo *in vitro* (Bhojwani y Dantu, 2013).

Los microorganismos tanto endógenos como exógenos incluyen mohos, bacterias, levaduras y otros microorganismos, que se encuentran presentes literalmente en todas partes: en el aire, en la superficie de las plantas, manos y demás. Las esporas de estos organismos se mueven en las corrientes de aire, en particular sobre las partículas de polvo. Para controlar esos organismos, se deben desinfectar los explantes, las herramientas y las áreas de trabajo para remover tales contaminantes de sus superficies. Todo este trabajo debe de realizarse en áreas especiales de transferencia en la cual se eliminen todos esos contaminantes y se hayan tomado precauciones para prevenir la recontaminación.

La reducción de los contaminantes superficiales comienza con el control de las plantas madres utilizadas como fuentes de explantes. De ordinario los contaminantes están presentes sólo en la superficie de las partes de plantas, aunque pueden estar alojados en grietas, entre las escamas de las yemas o en otras partes y a veces resulta bastante difícil eliminarlos. Las estructuras internas, como los puntos de crecimiento de las yemas, el interior de semillas y frutos, tienden a estar relativamente libres de organismos patógenos.

Sin embargo, si la planta esta creciendo en una atmósfera húmeda, los micelios pueden invadir el interior de la misma y convertirse en un problema persistente (Bhojwani y Dantu, 2013).

### 1.2.5 Oxidación *in vitro*

El fenómeno oxidación ó fenolización de tejidos vegetales ocurre por la acción de enzimas oxidasas (polifenoloxidasas, fenolasas y tirosinasa monofenoloxidasas), las que son liberadas, sintetizadas o se presentan en sustratos apropiados o en condiciones oxidativas a consecuencia de tejido dañado por heridas o senescencia. Las oxidasas normalmente latentes en la membrana celular y los sustratos retenidos dentro de la vacuola, se unen cuando las células son dañadas o comienza la senescencia. La fuente del explante es importante, ya que los tejidos juveniles usualmente son menos propensos a la oxidación. La época del año también es determinante, debido a que varias especies presentan variación en la liberación de fenoles *in vitro* durante el año (George, 2008; Azofeifa, 2009).

De acuerdo con Pan y Staden (1998) la oxidación *in vitro* es un fenómeno que ocurre frecuentemente durante las etapas iniciales de cultivo, siendo un gran problema ya que provoca la muerte de los tejidos vegetales debido a la excesiva producción de polifenoles, debido posiblemente por el disparo de reacciones de defensa, principalmente estos compuestos fenólicos son liberados debido a heridas provocadas a las plantas, por lo que es fundamental reducirlos de los tejidos vegetales.

En el establecimiento de cultivos *in vitro*, el proceso de oxidación se considera un obstáculo y un gran impedimento, ya que es letal para los explantes, ocasionando grandes pérdidas (Bhat y Chandel, 1991), presentándose en gran diversidad de especies vegetales, como en monocotiledóneas (Huang y col.,

2002), dicotiledóneas (Pinto-Sintra, 2007) y en coníferas (Tang y Newton, 2005), en el género *Taxus* es un problema frecuente en las especies: *T. brevifolia* (Chee, 1995), *T. marei* (Chang y col., 2001), *T. baccata* (Mihaljević y col., 2002) y *T. wallichiana* (Hien y col., 2004).

La oxidación *in vitro* ocurre con más frecuencia en especies leñosas (Bhat y Chandel, 1991), es variable entre especies y puede presentarse en cualquier tejido u órgano. (Huang y col., 2002). Algo importante que se debe de considerar, es que dentro de una misma especie existen genotipos más predispuestos a oxidarse con mayor facilidad que otros (Li y col., 2007) e inclusive también existe dentro de un mismo explante mayor oxidación de alguna de sus partes (Rivero-Maldonado y col., 2001).

Para prevenir la oxidación de los explantes, George (2008) y Azofeifa (2009) recomienda las siguientes medidas, las que suelen combinarse para establecer tratamientos adecuados:

- a) Minimizar el daño causado al explante, reduciendo el período en el cual está siendo dañado durante la escisión y esterilización. Algunos agentes esterilizantes en particular pueden acentuarlo.
- b) Remover los compuestos fenólicos producidos, remojando los explantes algunas horas o dejándolos bajo una corriente de agua antes de esterilizar o transferir a condiciones *in vitro*. Se debe asegurar que los agentes esterilizantes fueron adecuadamente removidos. Aumentar las frecuencias de transferencia y cortar tejidos necrosados evita que se acumulen metabolitos tóxicos alrededor del explante aunque no es una alternativa del todo económica. Los medios líquidos permiten que los fenoles se difundan lejos del explante. Algunos agentes gelificantes como el agar pueden influir, por lo que se recomienda probar con gelrite<sup>®</sup> ó pytagel<sup>®</sup>. Una forma común de controlarlos es agregando al medio carbón activado o polivinilpirrolidona.
- c) Modificar el ambiente de manera que la producción de fenoles no sea óptima: disminuir la intensidad luminosa sobre las plantas madre determina la producción de brotes etiolados o semietiolados. La iniciación en oscuridad por varias semanas logra controlar la producción de fenoles en varias especies. Mantener el tejido a una temperatura ligeramente inferior a la óptima también puede prevenir la oxidación.



## Establecimiento *in vitro* de *Taxus globosa* Schldl.

- d) Modificar el potencial redox del tejido: mediante antioxidantes, los que pueden ser diluidos en una solución estéril para remojar los explantes después de la esterilización o agregados al medio de cultivo. Remojar los explantes en una solución antioxidante con ácido cítrico y ascórbico también reduce el pH, la que disminuye la actividad de la polifenoloxidasas, cuyo óptimo se encuentra en pH de 6.5.
- e) Reducir la actividad de las fenolasas y la disponibilidad de sustrato: hay dos iones particularmente asociados a esta actividad: fierro y cobre. Agentes quelantes, como EDTA, actúan también como antioxidantes.
- f) Alterar la composición del medio y los reguladores de crecimiento usados: generalmente la oxidación es más frecuente en medios con altas concentraciones de sales, como el medio basal MS. Se han registrado el incremento de fenoles en medios con los reguladores de crecimiento 2,4-D, TDZ y KIN.

Dentro del conjunto de trabajos *in vitro* en el género *Taxus* los investigadores han utilizado antioxidantes y absorbentes de compuestos fenólicos con el propósito de disminuir la oxidación de los tejidos vegetales (Tabla 5).

**Tabla 5.** Trabajos *in vitro* en el género *Taxus* en donde se presentó el proceso de oxidación y su solución.

Especie	Explante	Proceso <i>in vitro</i>	Solución	Referencia
<i>Taxus baccata</i>	Células en suspensión	Cultivos en suspensión	50 mg/L de ácido ascórbico	Hirasuna y col., 1996
<i>Taxus canadensis</i> <i>Taxus cuspidata</i>	Células en suspensión	Cultivos en suspensión	2.0 mM de glutamina 0.5 mM de ácido ascórbico 0.5 mM de ácido cítrico	Ketchum y Gibson, 1996
<i>Taxus chinensis</i>	Callos	Cultivo de callos	5 mg/L de ácido ascórbico 5 mg/L de Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Jiaru y col., 1999
<i>Taxus mairei</i>	Brotos	Proliferación de yemas axilares	1 g/L de carbón activado y 100 mg/L de AgNO <sub>3</sub>	Chang y col., 2001
<i>Taxus baccata</i>	Callos	Cultivo de callos	1.5 % de PVP	Mihaljevic y col.2002

## Establecimiento *in vitro* de *Taxus globosa* Schtdl.

Especie	Explante	Proceso <i>in vitro</i>	Solución	Referencia
<i>Taxus wallichiana</i>	Callos	Cultivos en suspensión	2 g/L de carbón activado	Hien y col., 2004
<i>Taxus baccata</i>	Callos	Cultivo de callos	1.5 % de PVP	Bruňáková y col., 2005
<i>Taxus baccata</i>	Callos	Cultivo de callos	glicina, ácido aspártico y arginina	Correa y col., 2006
<i>Taxus baccata</i>	Semillas	Germinación	100 mg/L de ácido ascórbico	Zarek, 2007
<i>Taxus cuspidata</i>	Células en suspensión	Cultivos en suspensión	2.0 mM de glutamina 0.5 mM de ácido ascórbico 0.5 mM de ácido cítrico	Ketchum y col., 2007
<i>Taxus globosa</i>	Callos	Cultivo de callos	0.5 mg/L de Cloruro de Clorocolina	Barrios y col., 2009
<i>Taxus baccata</i>	Callos	Cultivo de callos	500 mg/L de PVP	Ashrafi y col., 2010
<i>Taxus brevifolia</i>	Callos	Cultivo de callos	200 mg/L de ácido ascórbico 100 mg L de ácido cítrico	Khosroushahi y col., 2011
<i>Taxus globosa</i>	Callos	Cultivo de callos	Transferencia de callos cada 20 días	Barrales-Cureño y col., 2010
<i>Taxus baccata</i>	Callos	Cultivo de callos	0.1 mM de glutatona	Ghafoori y col., 2012
<i>Taxus baccata</i>	Callos	Cultivo de callos	Incubación en oscuridad 0.1 g/L de ac. ascórbico 0.1 g/L de ac. cítrico	Toulabi y col., 2015

### 1.3 Micropropagación

La micropropagación constituye una de las líneas de trabajo más importante de la biotecnología moderna dada la magnitud de su aplicación práctica actual, la cual se fundamenta en la clonación del material vegetal élite. El cultivo de tejidos vegetales se refiere al crecimiento o desarrollo de células, tejidos u órganos, aislados de una planta madre, en un medio de cultivo artificial y bajo condiciones de total asepsia. Existen tres técnicas de cultivo de tejidos a partir de los cuales se pueden obtener plantas completas: organogénesis, embriogénesis somática y proliferación de yemas axilares (Figura 5).

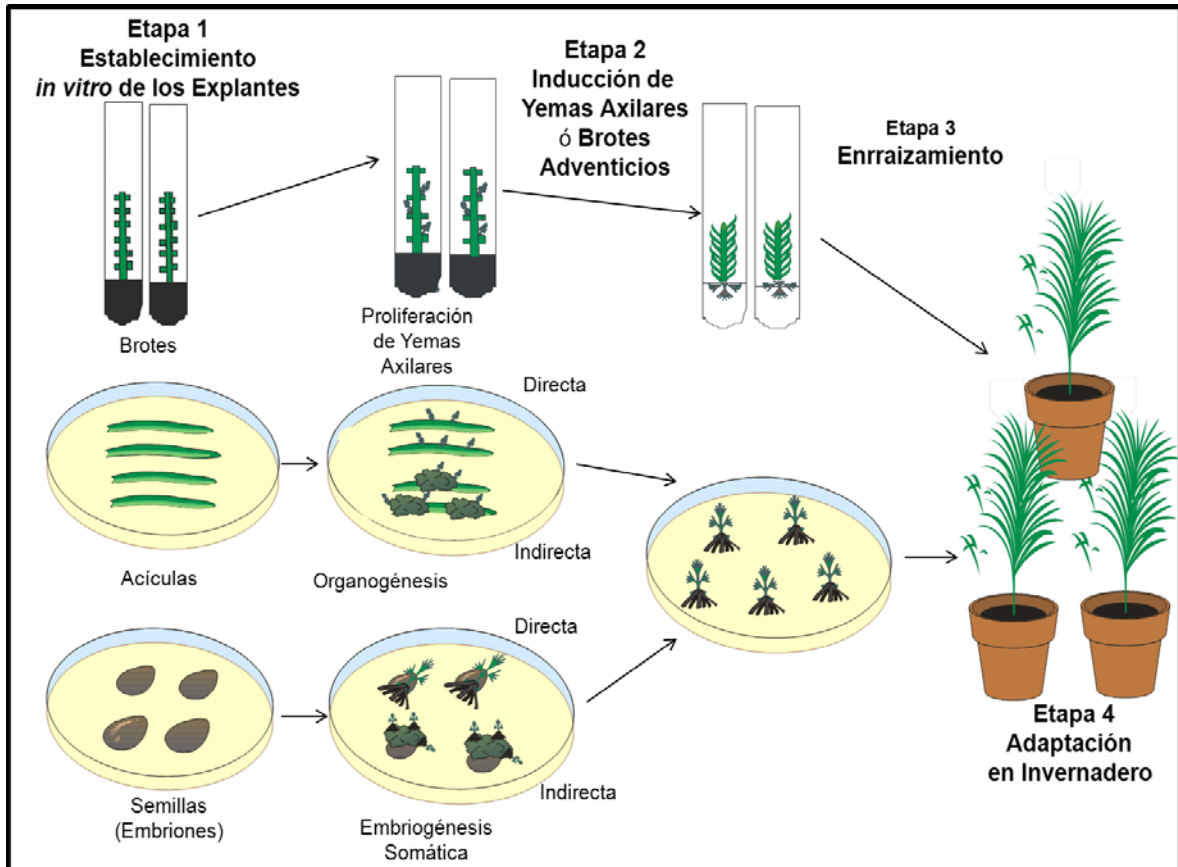


Figura 5. Técnicas de propagación *in vitro*.

### 1.3.1 Proliferación de yemas axilares

De las tres técnicas de micropropagación la que más se utiliza por ser rentable para una propagación masiva de plantas que conserven sus características genéticas deseadas, sin que exista variación somaclonal, es la proliferación de yemas axilares, la cual consiste en la multiplicación de brotes por la formación repetida de ramas axilares y los nuevos brotes formados sirven como explantes para repetir la proliferación; algunos brotes son finalmente enraizados para formar plántulas las cuales podrán crecer en condiciones *ex vitro*. La proliferación de yemas axilares se basa en el fenómeno llamado dominancia apical, que es el control regulador de crecimiento que la yema apical ejerce sobre las restantes regiones meristemáticas (yemas axilares) (George, 2008). Si la yema apical se corta mecánicamente se interrumpe la fuente de las hormonas inhibitorias (auxinas) empezando a crecer una o mas yemas axilares, dando origen a un nuevo brote (Cronquist, 1971). La primera teoría para explicar la dominancia apical se basó en el conocimiento de que los ápices con

crecimiento activo producen auxinas y que la alta concentración de auxinas suprime el crecimiento de yemas laterales, esta hipótesis se comprobó por medio de experimentos en los cuales se separa el ápice y se reemplaza por un bloque de agar conteniendo auxinas y se observa que la planta crece como si tuviera el ápice (Estrada-Girón, 2007).

### **1.3.2 Organogénesis y embriogénesis**

La organogénesis es definida como la aparición de nuevos órganos, observándose la formación de brotes adventicios (raíces y tallos) a partir de segmentos de tejido derivados de varios órganos (hojas, tallos, pétalos, raíces) y se puede obtener de forma directa o indirecta. La organogénesis directa se presenta en el explante inicial sin la previa formación de callo (células no diferenciadas) y en especies cuyos explantes ya están predeterminados para la morfogénesis. En la organogénesis indirecta si existe la desorganización de células (formación de callo) del explante original. Este tipo de propagación clonal es recomendable con fines de mejoramiento genético, ya que existe una gran probabilidad de que se produzca variación genética, también llamada variación somaclonal (Schwartz y Beaty, 2000) lo cual es importante para la búsqueda y manipulación de nuevos genotipos.

Esta técnica de micropropagación difiere de la embriogénesis somática, ya que en esta, la formación del nuevo individuo es bipolar: los meristemos apical y radicular se forman simultáneamente a partir de una célula somática (George, 2008).

### **1.3.3 Importancia económica de la micropropagación**

La micropropagación puede usarse como una alternativa redituable ya que tiene varias ventajas por encima de los métodos convencionales de propagación vegetativa las cuales sufren varias limitaciones.

Debnath y col. (2006) y Malik y col. (2012) enlistan las ventajas que tiene la micropropagación:

- a) El tiempo es relativamente corto y la producción del número de plantas es grande en un espacio reducido iniciando con un solo explante.
- b) La multiplicación de las plantas se lleva a cabo en un ambiente controlado, sin estar a expensas de las variaciones climatológicas.

- c) Las nuevas plantas se encuentran libres de microorganismos (hongos, bacterias, virus).
- d) Es rentable, al reducirse los costos (infraestructura y reactivos).
- e) Asegura el mantenimiento del germoplasma por muchos años.
- f) Proporciona una mayor tasa de multiplicación de las plantas y puede continuar a lo largo del año independiente del tiempo.

Aunado a esto, Sidhu (2010) señala que gracias a la micropropagación se ayuda a conservar las plantas amenazadas, que se pueden realizar mejoras genéticas (producción de clones con características deseadas) y la preservación del material genético se puede realizar por medio de la criopreservación (conservación con temperaturas que van por debajo de  $-70^{\circ}\text{C}$ ).

### 1.3.4 Proliferación de yemas axilares en el género *Taxus*

En los últimos 15 años se han realizado protocolos de regeneración *in vitro* del género *Taxus* (Tabla 6).

Otro tipo de trabajo que involucra una respuesta morfogénica *in vitro* fue la realizada por Chee (1995) utilizando tiamina provocó la estimulación de raíces adventicias en *Taxus brevifolia*. También se han realizado otras investigaciones *in vitro* para la obtención de plantas, como la germinación de semillas. Se ha realizado la germinación *in vitro* de varias especies de *Taxus sp.* (Flores y col., 1993; Chee, 1994), en *Taxus marei* (Chien y col., 1998), en *Taxus wallichiana* (Datta y Jha, 2004), en *Taxus baccata* (Zhiri y col., 2004; Zarek y col., 2007; Davarpanah y col., 2014), en *Taxus brevifolia* (Luan, 1996), así como en el híbrido *Taxus x media* Render. (Liao y col., 2006a).

En cuanto a la especie *Taxus globosa* Schldl., existen pocos estudios y los existentes están principalmente relacionados con aspectos botánicos y ecológicos (Muñoz-Gutiérrez y col., 2009; Soto-Hernández y col., 2011; Contreras-Medina y col., 2011), aunque algunos abordan también aspectos químicos (Guerrero y col., 2000; Ramos-Lobato y col., 2003), farmacológicos (Vargas y col., 2007) y microbiológicos (Rivera-Orduña y col., 2010). Cabe destacar que la propagación *in vitro* de la especie *Taxus globosa* tiene ventajas, ya que Shemluck y col. (2003) mencionan que el porcentaje promedio de paclitaxel en sus hojas es mayor que en otras especies de *Taxus* y recientemente Barrios y col. (2009) encontraron que la producción de paclitaxel es alta en el

## Establecimiento *in vitro* de *Taxus globosa* Schldl.

cultivo de callos (0.0269 mg.g<sup>-1</sup> en peso fresco). Aunado a esto, Soto y col. (2000) señalan que la mayor cantidad de paclitaxel se encuentra en el follaje, lo cual es de particular interés debido a que la extracción de este diterpeno se realizaría a partir del follaje y no de la corteza, lo cual contribuiría enormemente a su conservación.

**Tabla 6.** Proliferación de yemas axilares en el género *Taxus*.

Especie	Etapas	Medio Basal	Reguladores de crecimiento	Referencia
<i>Taxus x media</i>	Inducción de yemas axilares	WPM con vitaminas B5	1 mg/L de ANA + 0.1 mg/L de BA	Mistrzak y col., 2015
<i>Taxus baccata</i> L.	Inducción de yemas axilares	WPM	2 mg/L de BA	Sapam y Laishram, 2012
	Enraizamiento	MS al 50%	4 mg/L de IBA	
<i>Taxus baccata</i> L.	Inducción de yemas axilares	WPM	6.84 µM de Zeatina	Ibrahim y col., 2011
<i>Taxus baccata</i> L.	Inducción de yemas axilares	MS	2 mg/L de BA	Abbasin y col., 2010
	Enraizamiento	MS al 50%	8 mg/L de IBA	
<i>Taxus baccata</i> spp. <i>wallichiana</i>	Inducción de yemas axilares	WPM al 50%	0.05 mg/L de KIN	Kulkarni y Krishnamurthy, 2009
<i>Taxus cuspidata</i>	Inducción de yemas axilares	WPM	20 mg/L de BA	Olędska y col., 2009
	Enraizamiento	WPM al 50%	2.5 mg/L de IBA	
<i>Taxus wallichiana</i> Zucc.	Inducción de yemas axilares	MS al 50%	1 mg/L de BA	Nhut y col., 2007
	Enraizamiento	MS al 50%	5 mg/L de IBA ó 2.5 mg/L de IBA	
<i>Taxus baccata</i> L.	Inducción de yemas axilares	WPM	1.5 mg/L de Zeatina ó 2.84	Ewald, 2007
	Enraizamiento	L9	2 mg/L de IBA	
<i>Taxus x media</i>	Inducción de yemas axilares	MS	0.3 mg/L de BA	Hongbo y col., 2006
	Enraizamiento	MS	0.5 mg/L de AIA + 0.5 mg/L de ANA	
<i>Taxus x media</i>	Inducción de yemas axilares	WPM	22.19 µM de BA	Liao y col., 2006b
	Enraizamiento	MS	12.30 µM de IBA	
<i>Taxus mairei</i>	Inducción de yemas axilares	MS al 50%	2.5 mg/L de BA	Chang y col., 2001
	Enraizamiento	MS al 50%	2.5 mg/L de IBA	
<i>Taxus baccata</i> L.	Inducción de yemas axilares	WPM	22.19 µM de BA	Majada y col., 2000

### **1.3.5 Organogénesis y embriogénesis somática en el género *Taxus***

La organogénesis en especies leñosas y en coníferas está muy bien difundida, y se ha utilizado como principal vía para la propagación masiva de plantas en las últimas décadas (Bonga, 1981; Hicks, 1994). Con respecto a la micropropagación vía organogénesis del género *Taxus*, Chee (1995) obtuvo a partir de embriones zigóticos la organogénesis directa de la especie *Taxus brevifolia*, Datta y col. (2006), Das y col. (2008) y Hussain y col. (2013) obtuvieron la organogénesis indirecta de la especie *Taxus wallichiana* Zucc., mientras que Baharak y col. (2014) realizaron la organogénesis indirecta de la especie *Taxus baccata* L. (Tabla 7).

## **1.4 Metabolitos secundarios y cultivo de líneas celulares en suspensión**

### **1.4.1 Metabolitos secundarios**

Las plantas forman parte de nuestra dieta diaria, además de contener compuestos nutricionales, elaboran compuestos que han sido objeto de estudios por décadas. Dentro de esos compuestos se encuentran los metabolitos primarios (carbohidratos, aminoácidos, lípidos) los cuales desarrollan funciones de la vida básica de la planta, como la división celular y el crecimiento, la respiración, el almacenaje, y la reproducción, mientras que los metabolitos secundarios (alcaloides, terpenos, fenoles, glicósidos, flavonoides, aceites volátiles, taninos, resinas) son otros compuestos de bajo peso molecular, que son elaborados principalmente para el mantenimiento de los procesos de la vida de la planta con su entorno, como estrategia para protegerlas de los depredadores, permitirles competir ventajosamente en su hábitat, atraer polinizadores y simbiontes, inclusive para protegerlas contra el estrés que se va presentando a lo largo de su vida. (Collin, 2001; Namdeo, 2007). En la actualidad los metabolitos secundarios son utilizados para la elaboración de fármacos, pesticidas, colorantes, saborisantes y fragancias, entre otros (Trejo-Tapia y Rodríguez-Monroy, 2007).

Los metabolitos secundarios se encuentran distribuidos ampliamente en el reino vegetal, pero los que se encuentran en las plantas superiores son los que han despertado mayor interés, tal es el caso del paclitaxel, el cual es un diterpeno extraído de varias especies del género *Taxus* el cual tiene propiedades anticancerígenas (Barrales-Cureño y Ramírez-Sepúlveda, 2013).

**Establecimiento *in vitro* de *Taxus globosa* Schldl.**

**Tabla 7.** Propagación *in vitro* vía organogénesis y embriogénesis somática en el genero *Taxus*.

<b>Especie</b>	<b>Proceso <i>in vitro</i> / Etapa</b>	<b>Medio Basal</b>	<b>Reguladores de crecimiento</b>	<b>Referencia</b>
<i>Taxus brevifolia</i> Nutt.	<b>Organogénesis</b> Inducción de brotes adventicios	B5 al 50%	10 µM de BA	Chee, 1995
	Enraizamiento	MCM-SH al 50%	ABT (polvo enraizador)	
<i>Taxus wallichiana</i> Zucc.	<b>Organogénesis</b> Inducción de callo	WPM 50% + Vit. SH	2 mg/L de 2,4-D + BA 0.5 mg/L	Datta y col., 2006
	Inducción de brotes adventicios	WPM 50% + Vit. SH	2.5 mg/L de BA	
	Enraizamiento	MS + Vit. NN	2 mg/L de 2,4-D + Diferentes combinaciones de ANA e IBA	
<i>Taxus wallichiana</i> Zucc.	<b>Organogénesis</b> Inducción de callo	B5	5.0 µM de 2,4-D + 1.0 µM de KIN	Das y col., 2008
	Regeneración	WPM	5.0 µM de 2,4-D + 2.0 µM de BA	
<i>Taxus wallichiana</i> Zucc.	<b>Organogénesis</b> Inducción de callo	MS	2 mg/L de 2,4-D	Hussain y col., 2013
	Inducción de brotes adventicios	MS	0.5 mg/L de BA	
	Enraizamiento	MS 50%	8 mg/L de IBA	
<i>Taxus baccata</i> L.	<b>Organogénesis</b> Inducción de callo	MS 50%	1mg/L de 2,4-D + 1 mg/L de KIN	Baharak y col., 2014
	Inducción de brotes adventicios	MS	3 mg/L de KIN + 3 mg/L de BA	
	Enraizamiento	WPM	1,2 ó 3 mg/L de IBA	
<i>Taxus brevifolia</i> Nutt.	<b>Embriogénesis somática</b> Inducción de callo	MCM	160 µM de 2,4-D + 5µM de BA + 5 µM de ANA	Chee, 1996
	Regeneración	MCM	40 µM de ABA	
<i>Taxus wallichiana</i> Zucc.	<b>Embriogénesis somática</b> Inducción de callo	WPM 50% + Vit. SH	2 mg/L de ANA + 0.5 mg/L de BA	Datta y Jha, 2008
	Regeneración	WPM	0.1 mg/L de ANA + 0.5 mg/L de BA + 0.5 mg/L de KIN	



El cultivo de tejidos vegetales es una fuente promisoría para el abastecimiento de metabolitos secundarios, por lo que desde hace varias décadas el cultivo de líneas celulares en suspensión es una alternativa para la extracción de paclitaxel y otros taxanos (Maheshwari y col., 2008; Expósito y col., 2009; Malik y col., 2011).

### 1.4.2 Cultivo de líneas celulares en suspensión

Un cultivo de células en suspensión es una extensión del cultivo de callo o de tejidos, consistente en células y/o grupos de ellas dispersas y que están creciendo en un medio de cultivo líquido aerado (Arias y col., 2009).

El cultivo de líneas celulares en suspensión consta de tres fases principalmente:

- 1) Inducción de callo.
- 2) Establecimiento de líneas celulares en suspensión.
- 3) Extracción y cuantificación del metabolito secundario.

El inicio de las líneas celulares consiste en la inducción de callo, el cual es un conjunto de células parenquimatosas desdiferenciadas que guardan su totipotencialidad (Hellwings y col., 2004). Este es producido a partir de explantes *in vitro* como resultado de las lesiones y en respuesta a hormonas ya sea endógenas o proporcionadas en el medio de cultivo (Caponetti, 2000).

La iniciación de la división celular y la subsiguiente producción de callo requieren que se adicionen en las proporciones adecuadas una citocinina y una auxina. La auxina, en concentraciones de moderadas a elevadas, es el regulador de crecimiento primario que se utiliza para producir callo. Las principales auxinas incluyen al ácido indolacético (IAA), ácido naftalenacético (ANA) y el ácido 2,4-dicloro-fenoxiacético (2,4-D), en orden creciente de efectividad. Las citocininas, como la cinetina (KIN) ó benciladenina (BA) se proporciona en menor concentración si no está presente en cantidad adecuada dentro del explante. Aunque exteriormente los cultivos de masas de callo pueden aparecer como masas de células uniformes, en realidad su estructura es relativamente compleja con considerable variación morfológica, fisiológica y genética dentro del callo. El crecimiento sigue un patrón logarítmico típico, presentándose: a) un período lento de inducción de división celular que requiere auxina b) una fase de división celular rápida que implica la síntesis activa de DNA, RNA y proteína, seguida por

c) una cesación gradual de la división celular con desdiferenciación en células de parénquima más grandes y en células de tipo vascular (Bourgaud y col., 2001; Filová, 2014).

Las suspensiones de células tienen ventajas sobre los cultivos de callos en cuanto a que las células se desarrollan más o menos individualmente, las células tienen más acceso a los nutrientes del medio de cultivo y se evitan algunos de los gradientes y variaciones fisiológicas de los cultivos de callo (Trejo-Tapia y Rodríguez-Monroy, 2007).

Un cultivo en suspensión se inicia colocando una porción de callo friable o de tejido homogenizado en un medio líquido, de manera que las células se separen entre sí. Estas células se cultivan en varios aparatos. En uno de ellos (cultivo por lotes), las células se hacen crecer en un matraz colocando en un dispositivo agitador que permite que se mezclen el aire y el líquido. El crecimiento de las células sigue un patrón típico basado en cambios en las tasas de división celular. Primero, las células se dividen con lentitud (fase de retardo), luego con más rapidez (exponencial) incrementando a un estado constante (lineal) seguido por una tasa declinante (desaceleración), hasta que se llega a un estado estacionario. A este estado se le llama curva de crecimiento logarítmico. Se han innovado técnicas para aumentar la concentración de los metabolitos secundarios, como el uso de hongos, bioreactores, bombas de gas, elicitores, adición de proteínas, carbohidratos u otros (Bourgaud y col., 2001; Hellwings y col., 2004; Tabata, 2004).

### **1.4.3 Importancia del cultivo de líneas celulares en suspensión**

Los cultivos celulares vegetales *in vitro* constituyen actualmente una alternativa para la producción de sustancias de uso farmacéutico, agrícola e industrial, cuya producción comercial por los métodos convencionales (síntesis química) resulta difícil o económicamente no rentable. Estos cultivos *in vitro* constituyen asimismo una promesa para aumentar el rendimiento de los principios activos presentes en las plantas, así como para controlar más adecuadamente su producción (Veeresham y Chitti, 2013).

#### **1.4.4 Cultivos de callos en el género *Taxus***

Los callos son una proliferación de células indiferenciadas, que generalmente se utilizan para la extracción de metabolitos secundarios (Pant, 2014). En el género *Taxus* para la iniciación, la proliferación y mantenimiento de callos, así como en el cultivo de líneas celulares en suspensión, los medios basales más utilizados son B5 (Gamborg et al., 1968), MS (Murashige y Skoog, 1962) y el WPM (Loyd y McCown, 1981) y frecuentemente se suplementan con compuestos orgánicos como el hidrolizado de caseína, la polivinilpirrolidona (PVP), el ácido ascórbico y otros aminoácidos esenciales como glutamina, ácido aspártico, prolina y fenilalanina (Sabater-Jara y col., 2010). La mayoría de los grupos de investigación ha observado que los mejores reguladores de crecimiento son las auxinas (IBA, NAA, 2,4-D y Picloram) en una concentración de 1.0 a 10.0 mg/l en combinación con las citocininas (BA y KIN) en una concentración de 0.1 a 0.5 mg/l son eficaces para la iniciación de callo (Maheshwari y col., 2008) Tabla 8.

**Tabla 8.** Trabajos *in vitro* en la inducción de callo en varias especies del género *Taxus*.

<b>Especie</b>	<b>Explante Inicial</b>	<b>Medio Basal / Reguladores de Crecimiento</b>	<b>Morfología de los Callos</b>	<b>Referencia</b>
<i>Taxus cuspidata</i> <i>Taxus canadensis</i>	Brotos jóvenes	B5 1 mg/L de 2,4-D 1 mg/L de KIN	Friables amarillos claros	Fett-Neto y col., 1992
<i>Taxus brevifolia</i>	corteza	B5 1-2 mg/L 2,4-D	Friables café claro	Gibson y col., 1993
<i>Taxus cuspidata</i>	Brotos jóvenes	B5 0.5 mg/L de GA 1 mg/L de 2,4-D	Friables amarillos claros	Fett-Neto y col., 1993
<i>Taxus brevifolia</i> <i>Taxus baccata</i> cv <i>Repandens</i>	Tallos jóvenes y maduros y en acículas	B5 1-2 mg/L 2,4-D	Friables amarillos claros y cafés traslúcidos	Wickremesinhe y Arteca 1993
<i>Taxus brevifolia</i>	Cambium (líneas celulares)	B5 + Vit NN y KM 1 mg/L de Picloram 0.1 mg/L de KIN 0.1 mg/L de Ga <sub>3</sub> 0.1 mg/L de ABA	Friables café claro	Ketchum y col., 1995
<i>Taxus baccata</i>	Brotos	SH 0.03 mM de 2,4-D	Friables traslúcidos	Brukhin y col., 1996

**Establecimiento *in vitro* de *Taxus globosa* Schtdl.**

<b>Especie</b>	<b>Explante Inicial</b>	<b>Medio Basal / Reguladores de Crecimiento</b>	<b>Morfología de los Callos</b>	<b>Referencia</b>
<i>Taxus chinensis</i>	Brotes	MS ó B5 1 mg/L de 2,4-D	Friables	Jiaru y col., 1999
<i>Taxus yunnanensis</i>	Tallos jóvenes	B5 2 mg/L de 2,4-D 0.5 mg/L de KIN	Friables amarillos traslucidos	Luo y col., 1999
<i>Taxus cuspidata</i>	Semillas maduras e inmaduras	B5 + vit. 2 x MS 10 mg/L de 2,4-D 0.5 mg/L de Ga <sub>3</sub>	Friables café claro Amarillo	Son y col., 2000
<i>Taxus x media cv Hicksii</i>	Semillas, Brotes y Acículas	B5 5 mg/L de ANA	Friables amarillos traslucidos	Tang y col., 2001
<i>Taxus baccata</i>	Semillas	MS 3 mg/L de ANA 0.5 mg/L de KIN	Friables amarillos oscuros	Mihaljević y col., 2002
	Ramas jóvenes	MS 3 mg/L 2,4-D 0.5 mg/L de KIN	Friables amarillos claros	
<i>Taxus cuspidata var. nana</i>	Ramas jóvenes	B5 2 mg/L de 2,4-D 0.5 mg/L de KIN	Blancos a café amarillentos	Yoshida y col., 2002
<i>Taxus cuspidata</i>	Acículas	B5 4 mg/L de 2,4-D 0.5 mg/L de KIN	Café	Okada y col., 2004
<i>Taxus baccata</i> L. <i>Taxus baccata cv Aureova</i> .	Brotes	B5 6 mg/L de 2,4-D 0.5 mg/L de KIN	Friables amarillos café-claro	Bruňáková y col., 2004
<i>Taxus wallichiana</i>	Tallos jóvenes	B5 4 mg/L de 2,4-D 1 mg/L de KIN	Friables amarillos	Hien y col., 2004
<i>Taxus baccata</i>	Brotes Embriones	B5 3 mg/L de 2,4-D 0.5 mg/L de KIN	Friables blancos amarillos	Bruňáková y col., 2005
<i>Taxus baccata</i>	Acículas y tallos	B5 + Vit NN y KM 1 mg/L de Picloram 0.1 mg/L de KIN 0.1 mg/L de Ga <sub>3</sub> 0.1 mg/L de ABA	Friables amarillos translúcidos	Correa y col., 2006
<i>Taxus globosa</i>	Brotes	CIM 2.0 mg/L de ANA 0.1 mg/L de BA	Friables amarillos traslucidos	Barrios y col., 2009
<i>Taxus baccata</i>	Brotes jóvenes	B5 + 2x Vit B5 4 mg/L de 2,4-D 0.5 mg/L de KIN	Compactos	Ashrafi y col., 2010

**Establecimiento *in vitro* de *Taxus globosa* Schtdl.**

<b>Especie</b>	<b>Explant Inicial</b>	<b>Medio Basal / Reguladores de Crecimiento</b>	<b>Morfología de los Callos</b>	<b>Referencia</b>
<i>Taxus cuspidata</i> <i>Taxus baccata</i>	Brotos Acículas	WPM modificado 0.5 mg/L de BA 2.0 mg/L de ANA	Friables café claros	Bulgakov y col., 2011
<i>Taxus brevifolia</i>	Brotos	B5 2 mg/L de ANA 1.5 mg/L de AIA 0.2 mg/L de BA	Friables amarillos café	Khosroushahi y col., 2011
<i>Taxus globosa</i>	Acículas	B5 4.14 µM de Picloram	Friables verdes traslucidos	Barrales-Cureño y col., 2011
<i>Taxus baccata</i>	Brotos Acículas	B5 0.5 mg/L de ANA 0.4 mg/L de KIN 0.5 mg/L de 2,4-D	Friables café	Ghafoori y col., 2012
<i>Taxus globosa</i>	Acículas Brotos	B5 2mg/L de 2,4-D 0.5 mg/L de KIN 0.25 mg/L de Ga <sub>3</sub>	Friables traslucidos	Tapia y col., 2013
<i>Taxus spp.</i>	Brotos	WV modificado 2 mg/L de 2,4-D	Friables	Filová y Rovná, 2011
<i>Taxus wallichiana</i>	Brotos Peciolos	B5 4mg/L de 2,4-D 1 mg/L de KIN	Friables Verdes, café	Nhut y col., 2014
<i>Taxus x media</i>	Brotos	WR 5 M picloram	Friables café	Mistrzak y col., 2014
<i>Taxus brevifolia</i>	Brotos	MS 1.0 mg/L de KIN 1.5 mg/L de 2,4-D	Friables	Karimian y col., 2014
<i>Taxus baccata</i>	Acículas	WPM 2mg/L de ANA 0.25 mg/L de KIN	Friables café	Mahdinejad y col., 2015
<i>Taxus baccata</i>	Acículas	MS 2 mg/L de ANA 0.25 mg/L KIN	Friables café	Fakheri y col., 2015
<i>Taxus cuspidata</i>	Acículas	B5 0.76 M Acido 5- Aminolevulico	Friables amarillos	Yamamoto y col., 2015
<i>Taxus chinensis</i>	Brotos Peciolos	B5 1 mg/L de 2,4-D	Friables traslucidos café	Nan y col., 2015
<i>Taxus baccata</i>	Brotos	B5 2 mg/L de ANA	Friables Amarillos- Verdes	Toulabi y col., 2015

### 1.4.5 Cultivos de líneas celulares en suspensión en el género *Taxus*

El cultivo de líneas celulares en suspensión es una alternativa que se ha estado desarrollando en los últimos años (Expósito y col., 2009), para la producción y extracción del paclitaxel. Los cultivos de células en suspensión son normalmente inducidos del cultivo de callos ya establecidos, transfiriendo éstos a un medio líquido conveniente para su crecimiento (Tabata, 2004). Los primeros en realizar el cultivo de líneas celulares para la extracción exitosa del paclitaxel en el género *Taxus* fueron Christen y col. (1989), también ellos fueron los primeros en patentar la producción de paclitaxel (Christen y col., 1991).

Recientemente se han establecido varios cultivos de líneas celulares en el género *Taxus* (Cusidó y col., 2013), en los cuales su principal objetivo es el incremento en la producción de paclitaxel y otros taxanos. Para incrementar su producción se ha recurrido suplementar a los medios de cultivos con diferentes compuestos, como es el nitrato de plata (Pérez y col., 2004), el cloruro de clorocolina (Barrios y col., 2009), jasmonato de metilo (Yukimune y col., 1996; Furmanowa y col., 1997), diversos tipos de carbohidratos y lípidos (Ketchum y Gibson, 1996; Hirasuna y col., 1996; Yoshida y col., 2002), entre otros. El cultivo de líneas celulares en suspensión en el género *Taxus* se ha venido desarrollando en las últimas décadas (Tabla 9).

**Tabla 9.** Producción de paclitaxel por cultivo de líneas celulares en suspensión en diversas especies de *Taxus*.

<b>Especie</b>	<b>Producción de paclitaxel</b>	<b>Producción de paclitaxel (mg/L) por día</b>	<b>Procedimiento implementado</b>	<b>Referencia</b>
<i>Taxus cuspidata</i>	14.78 mg/L (a los 28 días)	0.527	Suspensión de líneas celulares	Ketchum y Gibson, 1996
<i>Taxus cuspidata</i>	3.4 mg/L (a los 9 días)	0.377	Elicitor abiótico (jasmonato de metilo)	Mirjarlili y Linden, 1996
<i>Taxus baccata</i> <i>Taxus brevifolia</i> <i>Taxus x media</i>	10.3 mg/L 48.3 mg/L 0.5 mg/L (a los 14 días)	7.87 3.45 0.035	Elicitor (jasmonato de metilo)	Yukimune y col., 1996
<i>Taxus cuspidata</i>	2 mg/L ( a los 14 días)	0.142	Biorreactor	Sun y Linden, 1999
<b>Especie</b>	<b>Producción</b>	<b>Producción</b>	<b>Procedimiento</b>	<b>Referencia</b>

## Establecimiento *in vitro* de *Taxus globosa* Schtdl.

	de paclitaxel	de paclitaxel (mg/L ) por día	implementado	
<i>Taxus chinensis</i>	36 mg/L (a los 37 días)	0.972	Elicitor abiotico (solventes organicos y carbohidratos)	Wang y col., 2001
<i>Taxus chinensis</i>	48 mg/L ( a los 10 días)	4.8	Elicitor abiótico (solventes orgánicos)	Zhang y Xu, 2001
<i>Taxus chinensis</i>	565 mg/L ( a los 14 días)	40.357	Bioreactor adicionando jasmonato de metilo	Wang y Zhong 2002
<i>Taxus chinensis var. mairei</i>	14.2 mg/L (a los 23 días)	0.617	De líneas celulares	Ma y col., 2002
<i>Taxus cuspidata</i>	23 mg/L (a los 20 días)	1.15	Elicitor (Paclitaxel)	Yuan y col., 2002
<i>Taxus chinensis</i>	70 mg/L (a los 14 días)	5	Elicitor abiótico (jasmonato de metilo ) en Biorreactor	Zhong y col., 2002
<i>Taxus chinensis</i>	5.7 mg/L (a las 24 h)	5.7	Elicitor biótico ( <i>Aspergillus niger</i> )	Lan y col., 2003
<i>Taxus canadensis</i>	54.4 mg/L (a los 14 días)	3.885	Elicitor abiótico (enzimas digestivas y jasmonato de metilo)	Roberts y col., 2003
<i>Taxus chinensis var. Mairei</i>	490 µg/L (a los 8 días)	61.25 µg	Con magnetic fields	Shang y col., 2004
<i>Taxus cuspidata</i>	0.25 mg/L (a los 7 días)	0.035	Cultivo de protoplastos con Elicitor abiótico (jasmonato de metilo)	Naill y Roberts, 2005
<i>Taxus chinensis var. mairei</i>	4 – 7 µg	4 – 7 µg	Aislamiento de hongo endógeno	Guo y col., 2006
<i>Taxus baccata</i>	19.91 mg/L (a los 28 días)	0.711	Elicitor abiotico (jasmonato de metilo)	Bonfill y col., 2006
<i>Taxus cuspidata</i>	2 a 3 mg/L (a los 12 días)	0.250	Células en suspensión y transformación genética con <i>A. tumefaciens</i> y rhizogenes	Ketchum y col. 2007
<i>Taxus yunnanensis</i>	6.4 mg/L (a los 12 días)	0.533	Elicitor abiótico (cerebrosidos)	Wang y col., 2007
<i>Taxus globosa</i>	0.0269 mg/L (a los 40 días)	0.00067	Elicitor abiótico (cloruro de clorocolina)	Barrios y col., 2009
<i>Taxus baccata</i>	811.222 µg (a los 21 días)	38.62 µg	Suspensión de líneas celulares	Ashrafi y col., 2010

## 2. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA

Al ser aprobado el paclitaxel por la FDA para su uso clínico como anticancerígeno, las investigaciones se han enfocado a la búsqueda de la mejor técnica para su extracción y producción. El objetivo es el abastecimiento al sector salud, pero debido a su estructura compleja, la síntesis química total es un proceso difícil, y no viable, mientras que para la semisíntesis es necesaria la utilización de precursores naturales, lo que las hace más costosas. A pesar de que existen plantaciones comerciales de *Taxus sp.*, aún se siguen usando árboles de poblaciones silvestres para la extracción del paclitaxel, lo que ha ocasionado una disminución en el número de individuos en sus áreas de distribución natural. Con base en esto, se pretende realizar el establecimiento *in vitro* de *Taxus globosa* Schltdl. con el propósito de reducir el tiempo de aprovechamiento, que sea económica y que ayude a conservar las poblaciones silvestres.

### 3. JUSTIFICACIÓN

*Taxus globosa* Schltdl. es una especie que en México tiene distribución discontinua y restringida a microhábitats. Su preservación es importante considerando su uso potencial para la producción de paclitaxel.

Debido a que su reproducción es principalmente sexual, y que las semillas que produce son pocas con un alto grado de dormancia, y a que es una especie de crecimiento lento, es indispensable implementar alternativas para su propagación. El uso de la biotecnología en los árboles forestales ofrece una gran alternativa, ya que la producción *in vitro* de plantas de *Taxus globosa* Schltdl. es una fuente promisoría de paclitaxel, además, en esta especie el alcaloide se localiza en el follaje en mayor proporción que en la corteza, con lo cual se reduciría el tiempo para su aprovechamiento y se preservarían las poblaciones naturales.



#### **4. HIPOTESIS**

El empleo adecuado de un medio de cultivo basal y la adición de antioxidantes como el ácido cítrico y el ácido ascórbico en acción conjunta reducen el oscurecimiento (oxidación) de los tejidos establecidos *in vitro*.

El empleo adecuado de un medio de cultivo basal y la acción de citocininas promueven la inducción de yemas axilares en explantes de *Taxus globosa* Schltdl. con y sin ápice.

#### **5. OBJETIVO GENERAL**

Realizar el establecimiento *in vitro* de explantes de *Taxus globosa* Schltdl. y ensayos para su micropropagación.

##### **5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 5.1.1 Evaluar la actividad del ácido ascórbico y el ácido cítrico para disminuir la oxidación de explantes de *Taxus globosa* Schltdl. en el establecimiento *in vitro*, así como el efecto a la ausencia de luz.
- 5.1.2 Evaluar los reguladores de crecimiento 6-furfurilaminopurina (KIN) 6-( $\gamma,\gamma$  dimetilalilamino) purina (2ip) en explantes de *Taxus globosa* Schltdl. con meristemo apical y decapitados con la finalidad de inducir yemas axilares.
- 5.1.3 Evaluar los reguladores de crecimiento 6-bencilaminopurina (BA) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) para la formación de callo en acículas de *Taxus globosa* Schltdl, y posteriormente realizar ensayos preliminares para la inducción de brotes adventicios.
- 5.4.4 Realizar ensayos preliminares para el establecimiento de cultivos celulares en suspensión de *Taxus globosa* Schltdl.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Fase 1: Establecimiento *in vitro* de *Taxus globosa* Schldl.

#### 6.1.1 Material vegetal

Se emplearon explantes maduros (aéreos) de árboles adultos de *Taxus globosa* Schldl., con un tamaño alrededor de 4 cm. colectados con el apoyo del Dr. Eduardo Estrada Castellón (Permiso SEMARNAT de colector científico: E. Estrada 16545). Dicho material vegetal proviene de una población ubicada en el Parque Nacional Cumbres de Monterrey, en el ejido La Trinidad, municipio de Montemorelos, Nuevo León. Los árboles se encuentran a una altitud de 1351 msnm y la vegetación predominante es bosque de *Carya-Quercus-Pinus*. Se colectó material vegetal de 10 árboles diferentes, asignándoseles la nomenclatura descrita en la tabla 10.

**Tabla 10.** Nomenclatura de los explantes de los árboles de *Taxus globosa*.

Ar1	Ar6
Ar2	Ar7
Ar3	Ar8
Ar4	Ar9
Ar5	Ar20

De cada árbol se utilizaron 100 explantes para formar el grupo experimental y 20 explantes para formar el grupo control.

#### 6.1.2 Desinfección de los explantes

Tanto el grupo control como el grupo experimental se sometieron a un pretratamiento: Para el grupo control se preparó una solución con antrak y bactrol ambos al 1%; para el grupo experimental además de incluir lo anterior, a la solución se le agregó ácido cítrico al 0.5% y polivinilpirrolidona (PVP) al 0.1%. Las dos soluciones con los explantes se mantuvieron bajo oscuridad al cubrirse los envases de plástico herméticos con papel aluminio durante 16 h en constante agitación, esto con la finalidad de reducir el proceso de oxidación que tienen los explantes con el efecto de la luz.

Después, los explantes se lavaron y se sometieron a un choque térmico: a 54°C durante 3 minutos y a 4°C durante otros 3 minutos. Luego se sumergieron en etanol al 70% durante 1 minuto.

## Establecimiento *in vitro* de *Taxus globosa* Schldl.

Ya en campana de flujo laminar horizontal, se realizó el tratamiento de desinfección: tanto el grupo control como el grupo experimental se sumergieron en hipoclorito de sodio al 2.5% con 5 gotas de tween 20 durante 30 minutos. Después, a ambos se les realizó dos enjuagues con agua bidestilada estéril. Por último se cortó el meristemo apical, la base y las acículas de los explantes antes de transferirlos al medio de cultivo, los explantes del grupo control se mantuvieron en agua bidestilada estéril y los del grupo experimental se sumergieron en una solución con 0.3% de ácido cítrico y 0.2% de ácido ascórbico durante 10 minutos (Figura 6).

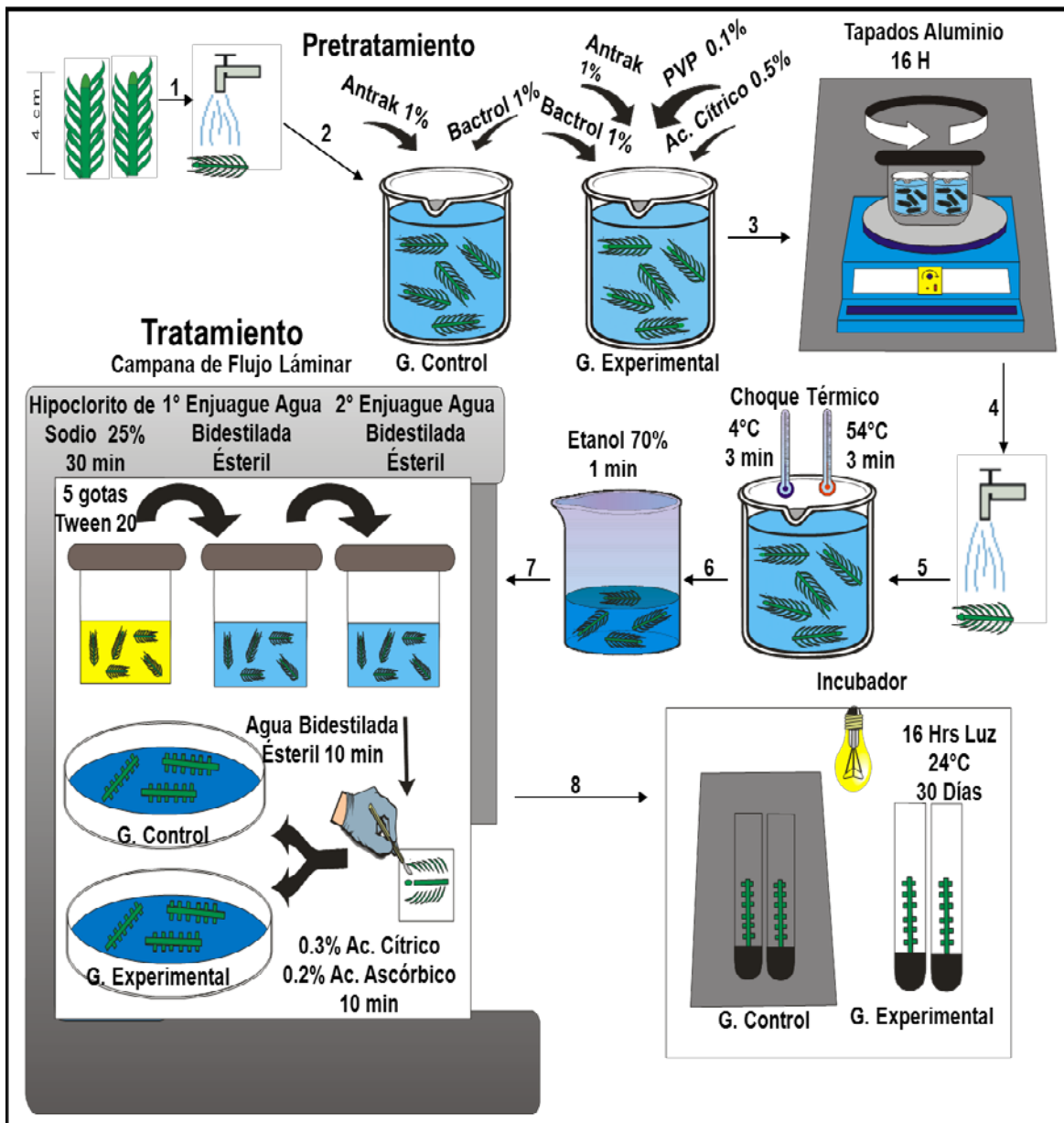


Figura 6. Proceso de desinfección de *Taxus globosa* Schldl.

### **6.1.3 Medio y condiciones de cultivo**

El medio de cultivo que se empleó tanto para el grupo control como para el grupo experimental fue: medio MS (Murashige y Skoog, 1962) al 50%, 1 mg/L de 6-bencilaminopurina (BA), 5 g/L de carbón activado, 30 g/L de sacarosa y 7.5 g/L de agar. El pH se ajustó a 5.7 usando 0.1 N de NaOH ó 0.1 M de HCl.

El medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121°C a una presión de 1 kg/cm<sup>2</sup> durante 15 min. El establecimiento se realizó en campana de flujo laminar horizontal. Como contenedores se utilizaron tubos de (25X150 mm), con 7 mL de medio de cultivo, colocándose 2 explantes por tubo. El ensayo duró 4 semanas, donde cada semana se observaron los cambios graduales de los explantes. Los dos grupos del ensayo se mantuvieron en el incubador a una temperatura de 24°C. El grupo control se colocó en un fotoperíodo de 16 h (3000 Lux de intensidad luminosa) (esto con la finalidad de observar el efecto de la luz en la oxidación de los explantes y la influencia de los antioxidantes), mientras el grupo experimental se mantuvo bajo oscuridad total.

Las variables de respuesta a evaluar con respecto a oxidación fueron: explantes normales, parcialmente oxidados y totalmente oxidados, donde para los explantes normales se tomaron en cuenta solo aquellos con tallo y acículas verdes; para los explantes parcialmente oxidados se tomaron en cuenta sólo aquellos con acículas oxidadas y tallo verde, y para los explantes totalmente oxidados, aquellos en donde tanto las acículas como el tallo presentaran oxidación. También se registró el porcentaje de contaminación de los explantes, ya sea por bacteria, hongo endógeno o exógeno.

## **6.2 Fase 2: Inducción de yemas axilares de *Taxus globosa* Schltldl.**

### **6.2.1 Material vegetal**

Se emplearon los brotes de *Taxus globosa* Schltldl., previamente establecidos *in vitro* provenientes del genotipo Ar8 del ensayo anterior con un tamaño alrededor de 4 cm.

### **6.2.1 Medio y condiciones de cultivo**

Se realizaron dos ensayos. En el primero los explantes conservaron su meristemo apical, mientras que en el otro los explantes se les retiró su ápice. El experimento consistió en 5 repeticiones por tratamiento y se transfirieron al medio con macro y microelementos de WPM (Lloyd y McCown, 1980) suplementado con 20 g/L de sacarosa, vitaminas B5 (Gamborg y col., 1968) y 7 g/L de agar. El pH en todos los tratamientos fue ajustado a un valor de 5.6 antes de ser esterilizados usando 0.1 N de NaOH ó 0.1 M de HCl. El medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121°C a una presión de 1 kg/cm<sup>2</sup> durante 15 min. Los explantes fueron colocados en tubos (25 x 150 mm) que contenían 7 mL de medio de cultivo y la transferencia se realizó en campana de flujo laminar. Los ensayos se incubaron a una temperatura de 25°C con un fotoperiodo de 16 h (3000 Lux). Se realizó un diseño factorial 4 x 3 donde un factor fue el 6-( $\gamma,\gamma$  dimetilalilamino) purina (2iP) en las concentraciones 0.0, 1.0, 4.0 y 7.0 mg/L y el otro 6-furfurilaminopurina (KIN) en las concentraciones 0.0, 5.0 y 10.0 mg/L (Tabla 11).

**Análisis estadístico:** Las variables a evaluar fueron: número de brotes y tamaño (en centímetros) para los nuevos brotes y para el brote original se evaluó el color, con una escala ordinal de: 0 = amarillo, 1 = rayado, 2 = verde y la apariencia: 0 = seco, 1 = marchito, 2 = poco vigoroso ó 3 = vigoroso.

Los datos se analizaron con el análisis de varianza (ANOVA) y se hicieron comparaciones múltiples de medias mediante prueba LSD.

**Tabla 11.** Tratamientos utilizados con sus respectivas concentraciones de reguladores de crecimiento para la inducción de yemas axilares.

Tratamiento		Concentración	
		2iP (mg/L)	KIN (mg/L)
Con meristemo	Sin meristemo		
T1	A	0.0	0.0
T2	B	1.0	0.0
T3	C	4.0	0.0
T4	D	7.0	0.0
T5	E	0.0	5.0
T6	F	1.0	5.0
T7	G	4.0	5.0
T8	H	7.0	5.0
T9	I	0.0	10.0
T10	J	1.0	10.0
T11	K	4.0	10.0
T12	L	7.0	10.0

### 6.3 Fase 3: Inducción de callo en acículas de *Taxus globosa* Schtdl.

#### 6.3.1 Material vegetal

Se emplearon las acículas provenientes de brotes de *Taxus globosa* Schtdl., previamente establecidos *in vitro* del genotipo Ar8.

#### 6.3.2 Medio y condiciones de cultivo para la inducción de callo

Las acículas se colocaron en cajas de Petri de 100 x 15, con 25 mL de medio por caja, 6 acículas por caja, puestas horizontalmente, 12 repeticiones por tratamiento. Se realizó un diseño factorial 4x5 donde un factor fue BA con cuatro niveles 0.0, 0.1, 0.3 y 0.5 mg/L y el otro 2,4-D con cinco niveles 0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg/L (Tabla 12). El medio basal fue B5 (Gamborg y col., 1968), suplementado con vitaminas B5 2x, 30 g/L de sacarosa, 10 g/L de agar, ajustado a un pH de 5.8.

El medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121°C a una presión de 1 kg/cm<sup>2</sup> durante 15 min. Los tratamientos se incubaron en oscuridad a 24 °C.

## Establecimiento *in vitro* de *Taxus globosa* Schldl.

**Análisis estadístico:** las variables de respuesta fueron la presencia (0) ó ausencia (1) de callo, la coloración: amarillo (0) ó crema (1) y la presencia (0) ó ausencia (1) de fenoles. Los datos se analizaron visualmente.

**Tabla 12.** Tratamientos con sus respectivas concentraciones de reguladores de crecimiento para inducción de callo.

Tratamiento	BA (mg/L)	2,4-D (mg/L)	Tratamiento	BA (mg/L)	2,4-D (mg/L)
T1	0.0	0.0	T11	0.3	0.0
T2	0.0	1.0	T12	0.3	1.0
T3	0.0	2.0	T13	0.3	2.0
T4	0.0	3.0	T14	0.3	3.0
T5	0.0	4.0	T15	0.3	4.0
T6	0.1	0.0	T16	0.5	0.0
T7	0.1	1.0	T17	0.5	1.0
T8	0.1	2.0	T18	0.5	2.0
T9	0.1	3.0	T19	0.5	3.0
T10	0.1	4.0	T20	0.5	4.0

### 6.4 Fase 4: Iniciación de la organogénesis indirecta de *Taxus globosa* Schldl.

#### 6.4.1 Material vegetal

Se emplearon los callos obtenidos de la Fase 3, los cuales presentaban las siguientes características: amarillos friables y marrones friables.

#### 6.4.2 Medio y condiciones de cultivo para la inducción de brotes adventicios

Se realizó un diseño factorial 6 x 4 donde un factor fue BA y el otro 2,4-D. Para BA fueron 6 niveles 0.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 y 7.0 mg/L y para 2,4-D fueron 4 niveles 0.00, 0.01, 0.03 y 0.06 mg/L (Tabla 13). El medio basal utilizado fue WPM con vitaminas SH, suplementado con 30 g/L de sacarosa. Se le agregó 1 g/L de carbón activado y 7.5 g/L de agar. Fue ajustado a un pH de 5.8 usando 0.1 N de NaOH ó 0.1 M de HCl.

## Establecimiento *in vitro* de *Taxus globosa* Schldl.

Los callos se colocaron en cajas de petri de 100 x 15, 2 cajas para cada tratamiento con 30 mL de medio cada una. Una réplica es igual aproximadamente a un 1 cm<sup>2</sup> de callo, 5 callos tratamiento.

El medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121°C a una presión de 1 kg/cm<sup>2</sup> durante 15 min. La siembra se realizó en campanas de flujo laminar. Los tratamientos se incubaron a una temperatura de 25°C con un fotoperíodo de 16 h (3000 Lux).

**Análisis estadístico:** en el ensayo, las variables de respuesta fueron: No hubo crecimiento de callo (0) ó Si hubo crecimiento de callo (1), la coloración del callo: marrón oscuro (0), marrón claro (1) ó verde-café (2), la consistencia: compacta (1) ó friable (2), la morfogénesis: no hubo (0), raíz (1), brotes adventicios (2) ó ambas (3) y presencia (1) ó ausencia (2) de oxidación. Los datos se analizaron visualmente.

**Tabla 13.** Tratamientos con sus respectivas concentraciones de reguladores de crecimiento para inducción de brotes adventicios.

Tratamiento	BA (mg/L)	2,4-D (mg/L)	Tratamiento	BA (mg/L)	2,4-D (mg/L)
TA2	0.0	0.0	TM2	0.0	0.03
TB2	3.0	0.0	TN2	3.0	0.03
TC2	4.0	0.0	TO2	4.0	0.03
TD2	5.0	0.0	TP2	5.0	0.03
TE2	6.0	0.0	TQ2	6.0	0.03
TF2	7.0	0.0	TR2	7.0	0.03
TG2	0.0	0.01	TS2	0.0	0.06
TH2	3.0	0.01	TT2	3.0	0.06
TI2	4.0	0.01	TU2	4.0	0.06
TJ2	5.0	0.01	TV2	5.0	0.06
TK2	6.0	0.01	TW2	6.0	0.06
TL2	7.0	0.01	TX2	7.0	0.06



## **6.5 Fase 5: Iniciación del cultivo de líneas celulares en suspensión de *Taxus globosa* Schltl.**

### **6.5.1 Material vegetal**

Se emplearon los callos obtenidos en el proceso de la Fase 3, cultivados durante 7 meses, los cuales presentaban las siguientes características: verdes friables y cremas friables.

### **6.5.2 Medio y condiciones de cultivo para el inicio de las líneas celulares en suspensión**

El medio basal fue B5 (Gamborg y col., 1968), suplementado con vitaminas B5 2x, 2 mg/L de 2,4-D, 30 g/L de sacarosa, 3 g/L de ácido cítrico y 2 g/L de ácido ascórbico, ajustado a un pH de 5.8. Se utilizaron matraces Erlenmeyer de 125 mL a los cuales se les colocó 30 mL de medio de cultivo. No se realizó ningún diseño factorial porque esta fase consistió solamente en la observación del establecimiento de las células en suspensión. Se utilizaron 5 matraces para los callos verdes friables y 5 matraces para los callos cremas friables. Se depósito un agregado celular por matraz, cada agregado celular equivalió a 2 cm<sup>2</sup> de callo.

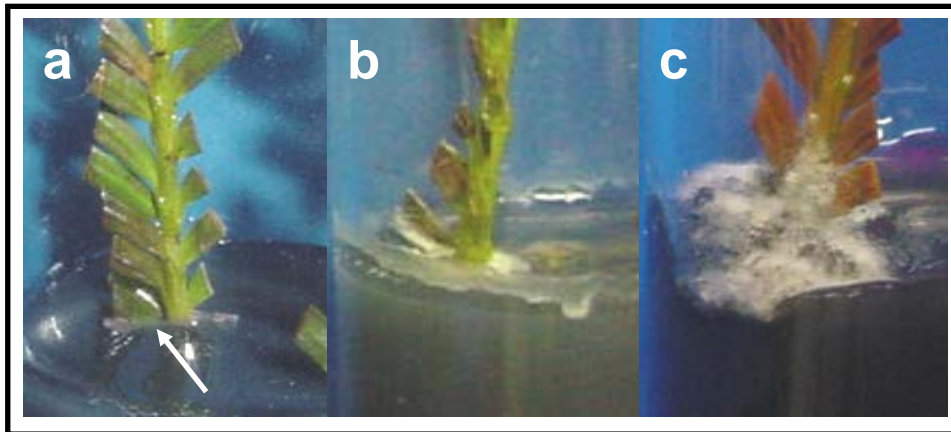
El medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121°C a una presión de 1 kg/cm<sup>2</sup> durante 15 min. Los matraces se colocaron en un agitador a 125 rpm. El fotoperíodo fue de 16 h a una temperatura de 25°C.

Las variables de respuesta fueron el crecimiento ó no crecimiento de células en suspensión, la coloración: crema ó verde de las células en suspensión y la presencia ó ausencia de fenoles. Los datos se analizaron visualmente.

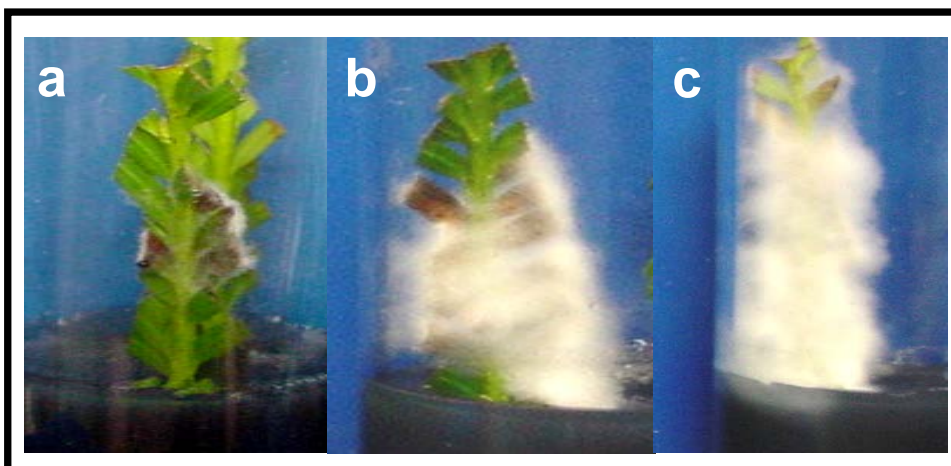
## 7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 7.1.1 Desinfección

El porcentaje de contaminación fue relativamente bajo registrándose sólo un 12%. Se observó el crecimiento de tres tipos de microorganismos: bacterias, hongos endógenos (simbióticos de la planta) y hongos exógenos (epifitos o introducidos por manipulación). En lo que concierne a las bacterias, se observaron dos tipos principales: colonias color blanco y color rosa (Figura 7a, b). Dentro de los hongos endógenos se observaron dos tipos: el primero con consistencia pétrea de color negro-grisáceo que crecía en la base del explante y dentro del medio de cultivo (Figura 7c) y el segundo de consistencia algodonosa que crecía ya sea en el tallo ó en las acículas, teniendo un crecimiento lento hasta cubrir todo explante (Figura 8).



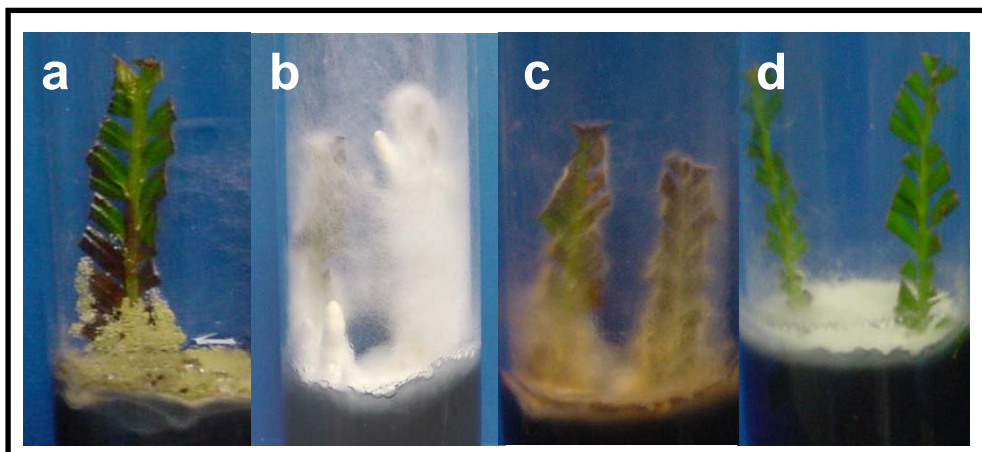
**Figura 7.** Contaminación por microorganismos en los explantes de los grupos experimentales después de 30 días de incubación. (a) Bacteria de color rosa en la base del explante. (b) Bacteria de consistencia lechosa. (c) Hongo endógeno de consistencia pétrea de color negro-grisáceo.



**Figura 8.** Contaminación por hongo endógeno de consistencia algodonosa. (a) Crecimiento a los 14 días de incubación. (b) Crecimiento a los 21 días. (c) Crecimiento a los 30 días.

## Establecimiento *in vitro* de *Taxus globosa* Schltl.

Los hongos exógenos fueron variados y a diferencia de los hongos endógenos, estos empezaban su desarrollo sobre la superficie del medio de cultivo o cerca de la base del explante, pero nunca sobre él, teniendo un crecimiento más rápido, llegando a cubrir la superficie del medio e incluso invadir al explante y paredes del tubo de cultivo (Figura 9).



**Figura 9.** Contaminación por hongos exógenos, donde la forma de crecimiento se da en todo el tubo, después de 30 días de incubación. (a) Hongo de color verde. (b) Hongo de algodónoso. (c) Hongo color pardo y consistencia algodónosa. (d) Hongo color blanco.

**Grupos controles:** la contaminación solo se observó en los Ar1, Ar8 y Ar9, en los tres casos solamente hubo un 5% respectivamente de cada árbol. La contaminación tanto en el Ar1 como en el Ar8 fue por hongo exógeno de consistencia algodónosa, mientras que en el grupo control del Ar9 la contaminación fue por hongo endógeno de consistencia pétrea (Tabla 14).

**Grupos experimentales:** Los porcentajes de contaminación en los grupos experimentales se pueden apreciar en la tabla 14. El árbol que tuvo mayor contaminación por bacteria fue el Ar8 con un 10%, le siguieron el Ar1 y el Ar20 los dos con 4% respectivamente, los árboles Ar4, Ar5, Ar7 y Ar9 no presentaron contaminación por bacteria (Tabla 14). El árbol que tuvo mayor contaminación por hongo endógeno, fue el Ar9 con un 10% de los explantes, le siguieron el Ar3 con 5% y los Ar2 y Ar20 con 4%, respectivamente (Tabla 14). El árbol que tuvo mayor contaminación por hongo exógeno fue el Ar2 con 15% explantes, siguiéndole el Ar9 con 10% y el Ar7 con 9% de explantes contaminados (Tabla 14).

Los árboles que presentaron mayor porcentaje de contaminación fueron: el Ar2, el Ar8 y el Ar9, todos con 20% de explantes contaminados, mientras que el

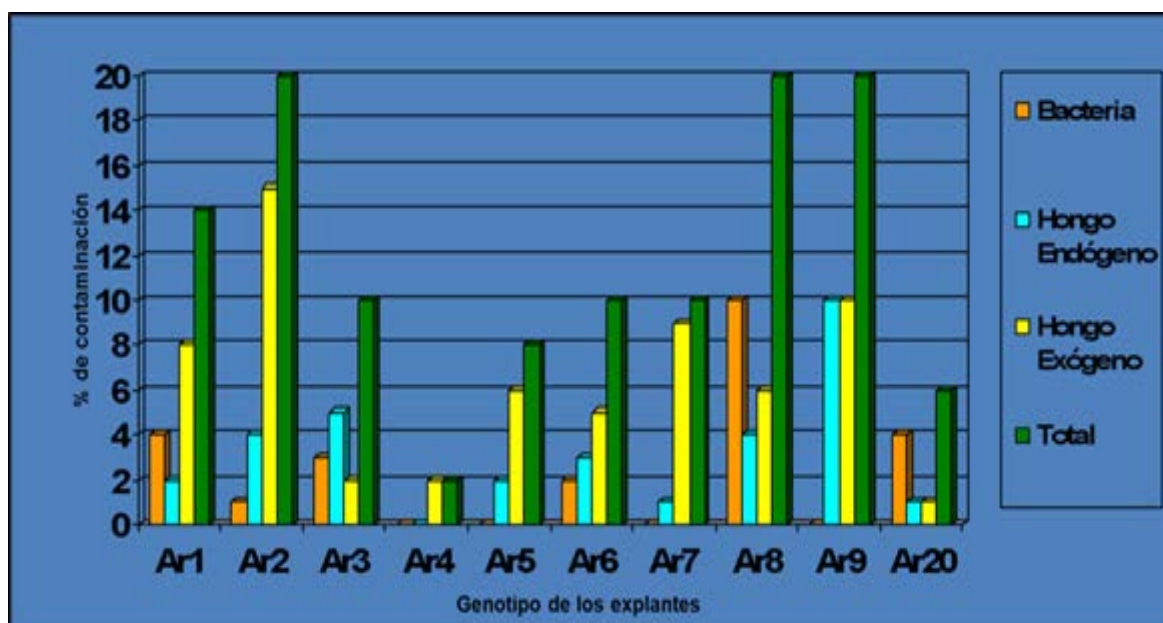
## Establecimiento *in vitro* de *Taxus globosa* Schldl.

Ar4 fue el que presento el porcentaje total menor de contaminación (Figura 10). El porcentaje total de contaminación en los explantes de los grupos experimentales consistió en la sumatoria de los porcentajes de contaminación tanto de bacteria como de hongos endógenos y exógeno (Figura 11).

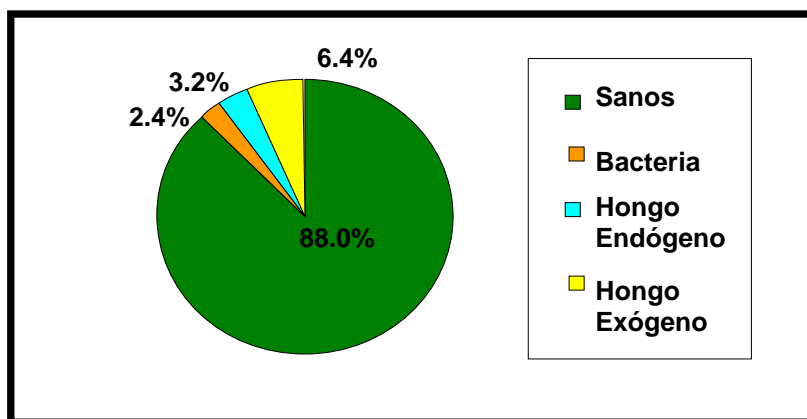
**Tabla 14.** Porcentajes de Contaminación de los grupos controles y experimentales de los 10 árboles utilizados.

Árbol	Total de Explantes		CB		CHEND		CHEXO		Conta. (%)		Conta. Total (%)	
	GC	GE	GC	GE	GC	GE	GC	GE	GC	GE	GC	GE
Ar1	20	100	0	4	0	2	1	8	5	14	1.5	12
Ar2	20	100	0	1	0	4	0	15	0	20		
Ar3	20	100	0	3	0	5	0	2	0	10		
Ar4	20	100	0	0	0	0	0	2	0	2		
Ar5	20	100	0	0	0	2	0	6	0	8		
Ar6	20	100	0	2	0	3	0	5	0	10		
Ar7	20	100	0	0	0	1	0	9	0	10		
Ar8	20	100	0	10	0	4	1	6	0	20		
Ar9	20	100	0	0	1	10	0	10	5	20		
Ar20	20	100	0	4	0	1	0	1	5	6		
<b>Total</b>	200	1000	0	24	1	32	2	64	15	120		

**GC**= Grupo Control; **GE**= Grupo Experimental; **CB**= Contaminación por Bacteria; **CHEND** = Contaminación por Hongo Endógeno; **CHEXO** = Contaminación por Hongo Exógeno; **Conta.** = Contaminación.



**Figura 10.** Porcentaje de contaminación de los grupos experimentales por bacteria, hongo endógeno y hongo exógeno de los 10 árboles utilizados.



**Figura 11.** Porcentaje total de contaminación en los grupos experimentales.

El porcentaje total de contaminación de los grupos experimentales a los 30 días de incubación fue del 12%, observándose que el porcentaje de contaminación es relativamente bajo, por lo que el protocolo es eficaz para el establecimiento *in vitro* de la especie *Taxus globosa* Schltld. Estos resultados son similares a los reportados por Barrales y col. (2011) en el establecimiento de acículas de *Taxus globosa* Schltld., quienes reportan un 20% de contaminación. Correa y col. (2006) en el establecimiento de brotes de *Taxus baccata*, reportan un 3.6% de contaminación y en la misma especie pero con semillas, Majada y col. (2000) mencionan un 14% de contaminación. Chang y col. (2001) tuvieron el 18% de contaminación en el establecimiento de brotes de *Taxus marei* y por último, Ibrahim y col. (2011) obtuvieron un 15% de contaminación en el establecimiento de brotes de *Taxus baccata*.

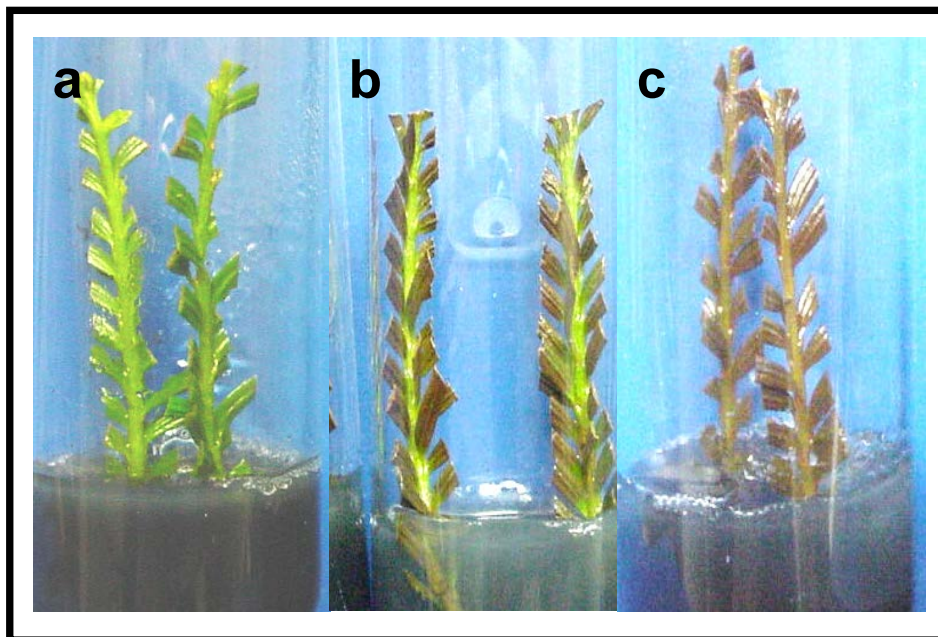
Caso contrario es el de los resultados que obtuvieron Hine-Gómez y Valverde-Cerdas (2003) en el establecimiento *in vitro* de la conífera *Cryptomeria japonica* (Taxocidaceae), ya que tuvieron un porcentaje de 46.6% de contaminación total a los 30 días de incubación, mencionando que es muy difícil trabajar con material vegetal proveniente de campo sin manejo previo. Nhut y col. (2007) mencionan que la contaminación *in vitro* también depende del tipo de explante, por lo que en ramas viejas de *Taxus wallichiana* el riesgo de contaminación es de hasta un 100%, mientras que se reduce hasta 10% en tallos y brotes jóvenes. Asimismo, se recomienda cortar los segmentos de 2 a 2.5 cm y colocarlos verticalmente para reducir el porcentaje de contaminación en brotes jóvenes. La utilización de antibióticos *in vitro* también reduce la contaminación por bacterias y hongos (Gibson y col., 1993). Otro factor que afecta el índice de

contaminación es el mencionado por Jiaru y col. (1999) quienes observaron que la estación del año de colecta del material vegetal es crucial, ya que en la especie *Taxus chinensis* los explantes colectados en primavera presentaban menos contaminación que los colectados en verano-otoño.

Una estrategia para evitar este tipo de contaminación es la utilizada por Kulkarni y Krishnamurthy (2009) que con un pretratamiento con antibióticos durante 16 horas previo al establecimiento *in vitro*, redujeron del 100% al 10% de contaminación en explantes maduros de *Taxus wallichiana*.

### **7.1.2 Oxidación**

En los grupos experimentales se observaron los tres tipos de respuesta esperada, es decir, explantes verdes (normales), oxidación parcial y oxidación total (Figura 12). Todos los grupos controles tuvieron una oxidación parcial o total, excepto el grupo control del Ar1 y el del Ar8, en los cuales no se presentó oxidación (Tabla 15).



**Figura 12.** Variables de respuesta esperadas en los explantes de los grupos experimentales después de 30 días de incubación. (a) Explantes verdes. (b) Explantes parcialmente oxidados. (c) Explantes totalmente oxidados.

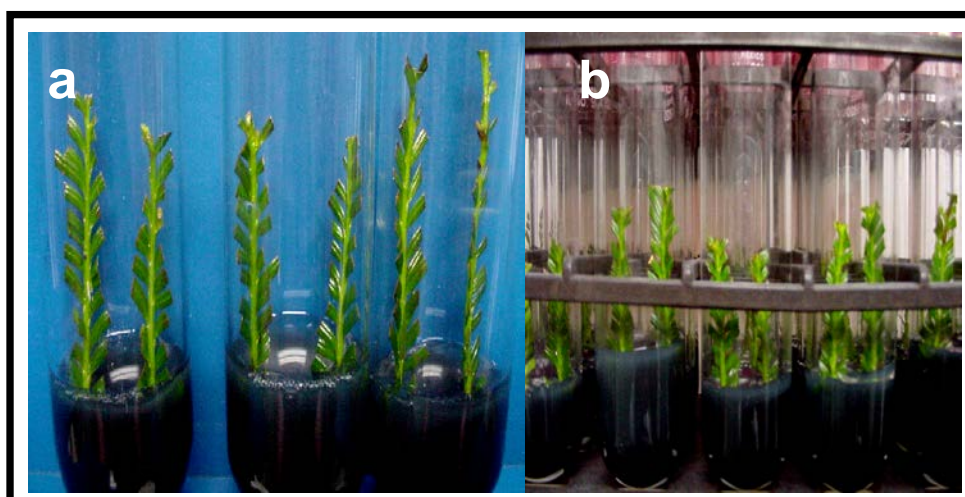
**Establecimiento *in vitro* de *Taxus globosa* Schtdl.**

**Tabla 15.** Porcentajes de oxidación de los grupos controles y experimentales de los 10 árboles utilizados.

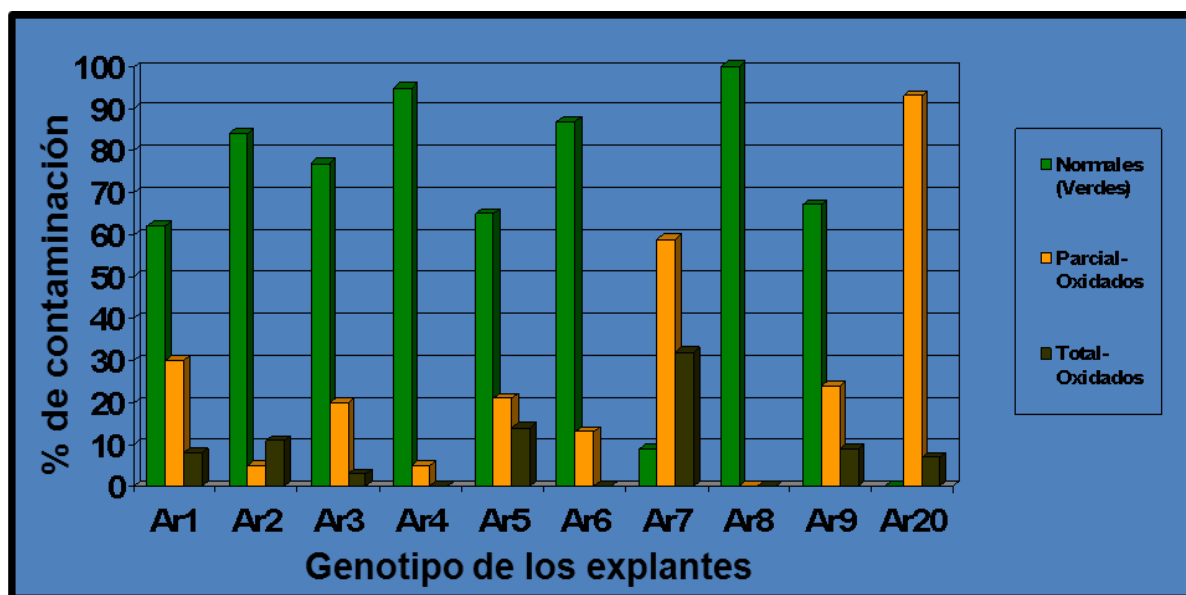
Árbol	Explantos normales (verdes)(%)		Explantos parcial-oxidados (%)		Explantos total-oxidados (%)		No. Total de explantes	
	GC	GE	GC	GE	GC	GE	GC	GE
Ar1	20	62	0	30	0	8	20	100
Ar2	2	84	10	5	8	11	20	100
Ar3	0	77	0	20	20	3	20	100
Ar4	0	95	0	5	20	0	20	100
Ar5	1	65	3	21	16	14	20	100
Ar6	0	87	0	13	20	0	20	100
Ar7	0	9	0	59	20	32	20	100
Ar8	20	100	0	0	0	0	20	100
Ar9	0	67	0	24	20	9	20	100
Ar20	0	0	15	93	5	7	20	100
<b>Total</b>	<b>43</b>	<b>646</b>	<b>28</b>	<b>270</b>	<b>129</b>	<b>84</b>	<b>200</b>	<b>1000</b>
<b>(%)</b>	<b>21.5</b>	<b>64.6</b>	<b>14</b>	<b>27</b>	<b>64.5</b>	<b>8.4</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

**GC=** Grupo control; **GE=** Grupo Experimental.

El mejor resultado se obtuvo con el árbol Ar8, ya que el 100% de sus explantes se mantuvieron totalmente verdes (Figura 13), le siguieron el Ar4 con 95%, el Ar6 con 87% y el Ar2 con 84% (Figura 14).

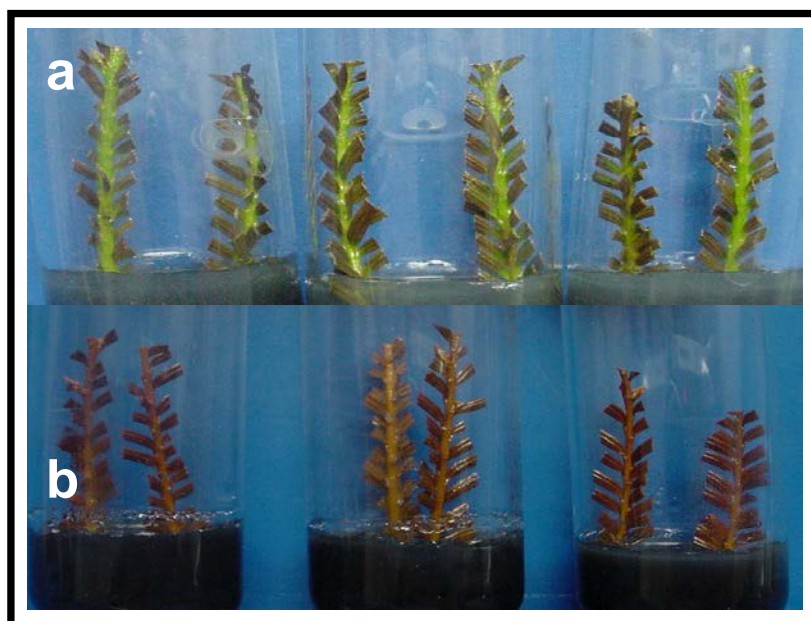


**Figura 13.** Explantes pertenecientes al Ar8 los cuales a los 3 días de incubación no presentaron ningún tipo de oxidación. (a) Explantes verde. (b) Explantes verdes puestos en una gradilla (vista general).



**Figura 14.** Porcentaje de oxidación de los 10 árboles utilizados de los grupos experimentales después de 30 día de incubación.

Por otro lado, el mayor índice de oxidación parcial en los grupos experimentales se presentó en los explantes del Ar20 con 93% (Figura 15a), siguiéndole el Ar7 con 59% y el Ar1 con 30% (Figura 14). En cuanto al mayor porcentaje de oxidación total en los grupos experimentales se presentó en los explantes del Ar7 con 32 % (Figura 15b), le siguieron el Ar5 con 14% y el Ar2 con 11% (Figura 14).

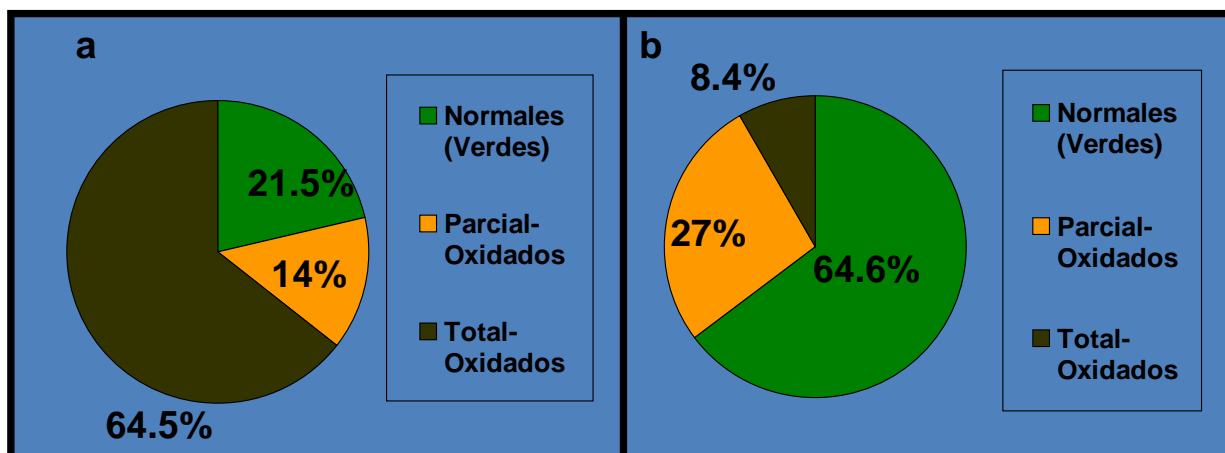


**Figura 15.** Explantes con diferentes grados de oxidación después de 30 días de incubación. (a) Explantes con oxidación parcial pertenecientes al Ar20. (b) Explantes con oxidación total pertenecientes al Ar7.



## Establecimiento *in vitro* de *Taxus globosa* Schltl.

Los porcentajes de oxidación de los grupos experimentales se presentan en la figura 16.



**Figura 16.** Porcentaje total de oxidación de los 10 árboles utilizados al término de 30 días. (a) grupos controles y (b) grupos experimentales.

La utilización de antioxidantes como el ácido ascórbico y el ácido cítrico ya sea en combinación o en acción independiente son eficaces para la reducción de la oxidación de los explantes. En este trabajo la utilización de una solución de ácido cítrico al 0.3 % y ácido ascórbico al 0.2% fue eficaz para disminuir la oxidación de los explantes, concordando con los resultados de Khosroushahi y col. (2011) quienes lograron la disminución de la oxidación en callos de *Taxus brevifolia* con la utilización de 200 mg/L de ácido ascórbico y 100 mg/L de ácido cítrico en acción independiente; Toulabi y col. (2015) utilizaron los mismos antioxidantes en acción conjunta pero con 0.1 g/L y observaron que la oxidación disminuyó en cultivos de callos de *Taxus baccata*. La utilización de 100 ml/L de ácido ascórbico disminuyó la oxidación de semillas de *Taxus baccata* en el proceso de germinación *in vitro* (Zarek y col., 2007). Ahmad y col. (2013) recomiendan para reducir el proceso de oxidación de los explantes la utilización de agentes adsorbentes como el carbón activado y la polivinilpirrolidona (PVP), así como antioxidantes como el ácido cítrico y el ácido ascórbico. Todos estos compuestos, además del ácido cítrico y del ácido ascórbico, se utilizaron para contrarrestar la oxidación de explantes de *Taxus globosa* Schltl. en el establecimiento *in vitro*.

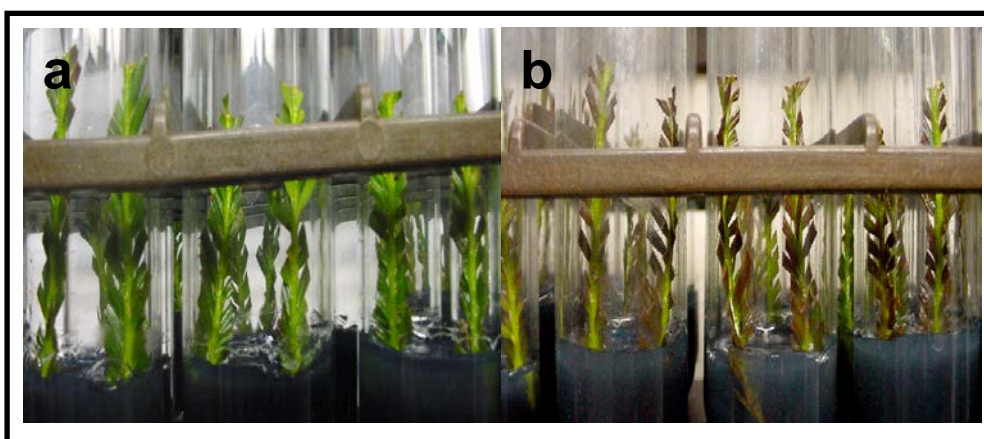
Se observaron dos casos particulares del comportamiento de los grupos controles tanto del Ar1 y el Ar20. En el caso del Ar1 el grupo control se conservó

## Establecimiento *in vitro* de *Taxus globosa* Schldl.

---

verde y el grupo experimental con diferentes grados de oxidación, por lo que se tuvo que realizar un segundo establecimiento en las mismas condiciones para verificar ese comportamiento.

Al término del segundo establecimiento del Ar1 el grupo control comenzó a oxidarse parcialmente, y al término de 24 h, la mayoría de los explantes se oxidaron totalmente. Se puede apreciar que el Ar1 en los dos establecimientos tiene un comportamiento disímil (Figura 17). Por lo que se puede decir que es una especie que tiene una forma de comportamiento muy errática en condiciones *in vitro*.

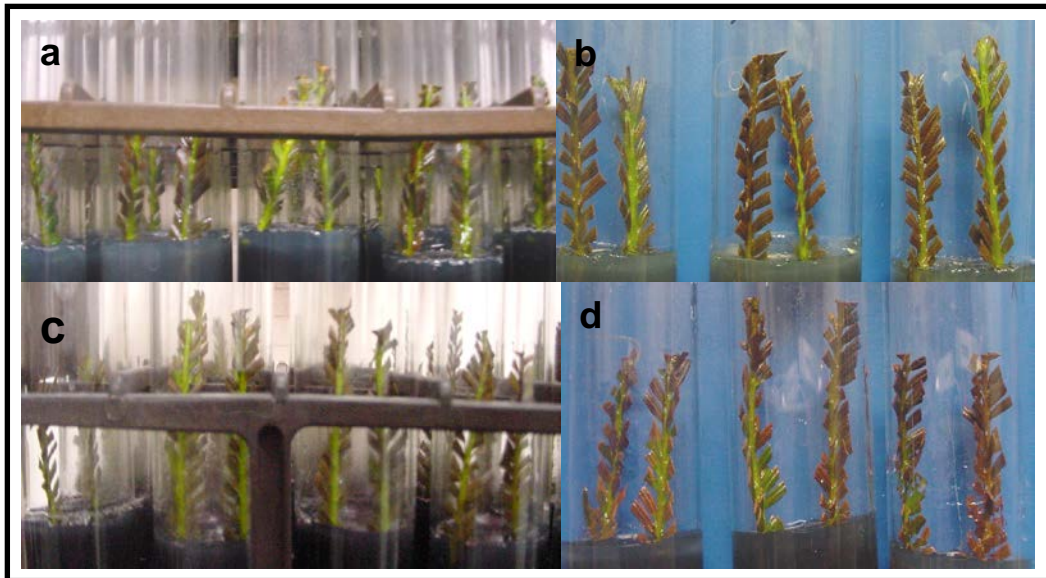


**Figura 17.** Comparación de los explantes del Ar1 en los dos establecimientos que se le realizaron. (a) Explantes del grupo control del primer establecimiento sin oxidación después de 30 días de incubación. (b) Explantes del grupo control del segundo establecimiento con diferentes grados de oxidación a las 24 horas de incubación.

El otro caso particular se observó en el grupo control y el grupo experimental del Ar20 ya que después de cuatro semanas del establecimiento, sus explantes se comportaron de una manera similar, ya que estos se oxidaron parcialmente, por lo que se realizó un segundo establecimiento en las mismas condiciones para comprobar su comportamiento. A la primera semana del segundo establecimiento del Ar20, el grupo control tuvo una oxidación parcial que comparándose con el grupo control del primer establecimiento tuvieron un comportamiento similar, caso parecido entre los dos grupos experimentales de los dos establecimientos, ya que estos tuvieron una oxidación parcial, teniendo también un comportamiento similar (Figura 18). En este caso se puede decir que el genotipo Ar20 tuvo un comportamiento similar en los dos establecimientos.

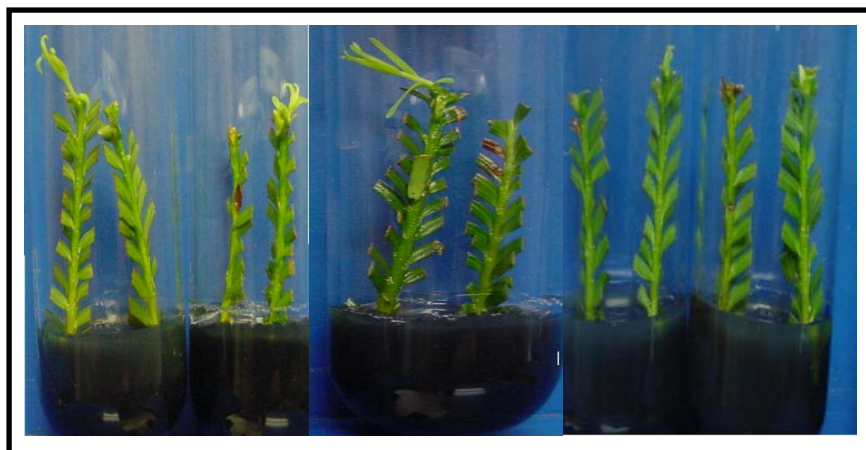
## Establecimiento *in vitro* de *Taxus globosa* Schldl.

En el caso del Ar8 no se realizó un segundo establecimiento ya que el grupo experimental también se conservó verde. Los grupos controles y experimentales de los árboles Ar2, Ar3, Ar4, Ar5, Ar6, Ar7 y Ar9 tuvieron el comportamiento esperado, por lo que no se realizó un segundo establecimiento.



**Figura 18.** Comparación de los explantes del Ar20 en los dos establecimientos que se realizaron, todos a los 30 días de incubación y presentando oxidación parcial. (a) Explantes del grupo control del primer establecimiento. (b) Explantes del grupo experimental del primer establecimiento. (c) Explantes del grupo control del segundo establecimiento. (d) Explantes del grupo experimental del segundo establecimiento.

Un acontecimiento que se presentó fue que en varios explantes del grupo control hubo inducción de brotes axilares, por lo que se pudiera decir que los genotipos dentro de una misma especie tienen diferentes potenciales (Figura 19).



**Figura 19.** Explantes del grupo control del Ar8 después de 30 días de incubación, donde se puede apreciar que hubo inducción de yemas axilares.

### 7.3 Inducción de yemas axilares

Tanto para el ensayo con los explantes que conservaban su meristemo apical como el ensayo con los explantes decapitados, el ANOVA determinó que solamente el número de brotes tenía un valor de significancia ( $p > 0.05$ ) (Tabla 16).

**Tabla 16.** Valores determinados por el ANOVA para No Brotes, Tamaño, Color y Apariencia en explantes con meristemo apical.

Explante	Valor de P para No Brotes	Valor de P para Tamaño	Valor de P para Color	Valor de P para Apariencia
Con meristemo apical	<b>0.0134</b>	0.0973	0.7716	0.0887
Decapitado	<b>0.0051</b>	0.2676	0.5675	0.2623

El Valor de P para ser significativo tiene que tener un valor ( $p > 0.05$ ).

En el ensayo donde los explantes conservaban su meristemo apical, el tratamiento en el cual se obtuvo el mayor número de brotes fue el T4 (7 g/L de 2iP) con un promedio de 5.8 brotes, y en el mismo grupo estadístico se ubicó el tratamiento T9 (10 mg/L de KIN) con un promedio de 4 brotes. Mientras que los tratamientos T3, T2, T10 y T5 fueron los que tuvieron menos brotes con un promedio de uno (Tabla 17).

En el ensayo donde los explantes se encontraban decapitados (sin ápice), el tratamiento en el cual se obtuvo el mayor número de brotes fue el K (10 mg/L de KIN + 4 mg/L de 2iP) con un promedio de 4.2 brotes, y en el mismo grupo estadístico se ubicó el tratamiento D con un promedio de 3.2 brotes. Mientras que en el tratamiento J (10 mg/L de KIN + 1 mg/L de 2iP) no presento ningún brote (Tabla 17).

**Establecimiento *in vitro* de *Taxus globosa* Schldl.**

**Tabla 17.** Valores determinados por la prueba de rangos múltiples (LSD) por tratamiento para el número de brotes en explantes con meristemo apical y decapitados.

Explantes con Meristemo Apical				Explantes Decapitados			
T*	No. Brotes	KIN (mg/L)	2iP (mg/L)	T*	No. Brotes	KIN (mg/L)	2iP (mg/L)
<b>T1</b>	1.8b	0	0	<b>A</b>	0.6b	0	0
<b>T2</b>	1.0a	0	1	<b>B</b>	0.6b	0	1
<b>T3</b>	1.0a	0	4	<b>C</b>	1c	0	4
<b>T4</b>	<b>5.8d</b>	0	7	<b>D</b>	<b>3.2d</b>	0	7
<b>T5</b>	1.4a	5	0	<b>E</b>	0.4b	5	0
<b>T6</b>	2.75b	5	1	<b>F</b>	0.6b	5	1
<b>T7</b>	2.4b	5	4	<b>G</b>	1.6c	5	4
<b>T8</b>	2.6b	5	7	<b>H</b>	3d	5	7
<b>T9</b>	<b>4.0c</b>	10	0	<b>I</b>	1.2c	10	0
<b>T10</b>	1.2a	10	1	<b>J</b>	0a	10	1
<b>T11</b>	2.6b	10	4	<b>K</b>	<b>4.2e</b>	10	4
<b>T12</b>	3.0b	10	7	<b>L</b>	2.4d	10	7

Los tratamientos seguidos por la misma letra no eran perceptiblemente diferentes en  $P < 0.05$  (En la prueba de rangos múltiples LSD).

\*T = Tratamiento.

En el ensayo donde los explantes que conservaron su meristemo apical, no se muestra una diferencia estadística significativa en la interacción de las citocininas KIN y 2iP ( $p > 0.05$ ), solamente se observó diferencia estadística ( $p > 0.05$ ) para la citocinina 2iP en el número de brotes y en la apariencia (Tabla 18), donde los tratamiento con la concentración 7 mg/L de 2iP mostró el mayor número de brotes 3.8 (Tabla 19).

En la apariencia las concentraciones de 0, 1 y 7 mg/L de 2iP fueron las que mostraban una mejor influencia en el brote original, donde según la escala ordinal corresponde a una apariencia vigorosa (Tabla 18).

## Establecimiento *in vitro* de *Taxus globosa* Schldl.

**Tabla 18.** Valores determinados por el ANOVA en los explantes con meristemo apical para No Brotes, Tamaño, Color y Apariencia, en la interacción de las citocininas KIN y 2iP.

Citocinina	Valor de P para No Brotes	Valor de P para Tamaño	Valor de P para Color	Valor de P para Apariencia
A: 2iP	<b>0.0248</b>	0.0516	0.5569	0.0222
B: KIN	<b>0.7933</b>	0.5029	0.2598	0.5922
Interacción AB	0.0226	0.1870	0.8933	0.2712

El Valor de P para ser significativo tiene que tener un valor ( $p > 0.05$ ).

**Tabla 19.** Valores determinados por la prueba de rangos múltiples (LSD) en el efecto de la concentración de 2iP para el número de brotes en explantes con meristemo apical.

2iP (mg/L)	No. Brotes	Apariencia
0	2.4b	2.4*
1	1.65 <sup>a</sup>	2.4333*
4	2.0b	1.9333*
7	3.8c	2.4*

Los tratamientos seguidos por la misma letra no eran perceptiblemente diferentes en  $P < 0.05$  (En la prueba de rangos múltiples LSD)

\*La escala ordinal propuesta para Apariencia del brote original es:  
0 = seco, 1 = marchito, 2 = poco vigoroso ó 3 = vigoroso.

En el caso de los explantes decapitados no hay diferencia estadística significativa ( $p > 0.05$ ), solo se observó diferencia estadística para la citocinina 2iP en el número de brotes y para KIN en la apariencia (Tabla 20), donde los tratamiento con la concentración 7 mg/L de 2iP mostró el mayor número de brotes 2.8 (Tabla 21). En cuanto a la apariencia, la concentración de 10 mg/L de KIN fue la que mostraba una mejor influencia sobre el brote original, donde según la escala ordinal corresponde a una apariencia poco vigorosa, mientras que las concentraciones de 0 y 5 mg/L de KIN le confieren una apariencia marchita (Tabla 21).

## Establecimiento *in vitro* de *Taxus globosa* Schldl.

**Tabla 20.** Valores determinados por el ANOVA en los explantes decapitados para No Brotes, Tamaño, Color y Apariencia, en la interacción de las citocinina KIN y 2iP.

Citocinina	Valor de P para No Brotes	Valor de P para Tamaño	Valor de P para Color	Valor de P para Apariencia
A: 2iP	0.0005	0.1108	0.4186	0.5518
B: KIN	0.4868	0.7945	0.2020	0.425
Interacción AB	0.1670	0.3211	0.7468	0.5203

El Valor de P para ser significativo tiene que tener un valor ( $p > 0.05$ ).

**Tabla 21.** Valores determinados por la prueba de rangos múltiples (LSD) en el efecto de la concentración de 2iP para el número de brotes y la concentración de KIN para la apariencia en explantes decapitados.

2iP (mg/L)	No. Brotes	KIN (mg/L)	Apariencia
0	0.7333a	0	1.8*
1	0.4a	5	1.8*
4	2.2666b	10	2.25*
7	2.8666c		

\* La escala ordinal propuesta para Apariencia del brote original es:  
 0 = seco, 1 = marchito, 2 = poco vigoroso ó 3 = vigoroso  
 Los tratamientos seguidos por la misma letra no eran perceptiblemente diferentes en  $P < 0.05$  (En la prueba de rangos múltiples LSD)

Se ha reportado que las citocininas son esenciales para la inducción de yemas axilares y brotes adventicios en coníferas (González y col., 1998). Según Martínez y col. (1991) las coníferas generalmente producen brotes adventicios en respuesta a la adición de citocininas no combinadas en el medio de cultivo. En los dos ensayos de *Taxus globosa* Schldl. el mayor número de brotes axilares se observa con la acción independiente de cada citocinina (Tabla 17) coincidiendo con Abbasin y col. (2010), Sapam y Laishram, (2012) y Chang y col. (2001) que

con la acción independiente de BA obtuvieron el mayor número de brotes, los dos primeros en *Taxus baccata* y el último en *Taxus mairei*. En el género *Taxus* no existe un lineamiento para la utilización de citocininas para la inducción de yemas axilares ya que algunos autores han utilizado con éxito la BA (Abbasin y col., 2010; Olęledska y col., 2009; Nhut y col., 2007; Liao y col., 2006a; Chang y col., 2001 y Majada y col., 2000), el 2ip (Ewald, 2007), la KIN (Kulkarni y Krishnamurthy, 2009) la Zeatina (Ibrahim y col., 2011) e inclusive combinación de una auxina (ANA) con una citocinina (BA) (Mistrzak y col., 2015), para la especie en estudio *Taxus globosa* Schldl. coincide con Ewald, (2007), ya que la mayor proliferación de yemas axilares correspondió a la acción independiente de la citocinina 2iP.

Otro factor que influye en la proliferación de yemas axilares es la utilización de explantes decapitados con el propósito de romper con la dominancia apical de las auxinas internas de los explantes. Majada y col. (2000) obtuvieron sus mejores resultados en explantes decapitados de *Taxus baccata* donde obtuvieron un promedio de 3.6 brotes con la concentración de 22.19  $\mu\text{M}$  de BA, contrario a los resultados en este estudio de *Taxus globosa* Schldl., ya que la mayor proliferación de yemas axilares se obtuvo en explantes que conservaban su meristemo apical con un promedio de 5.8 brotes con la concentración de 7 mg/L de 2iP.

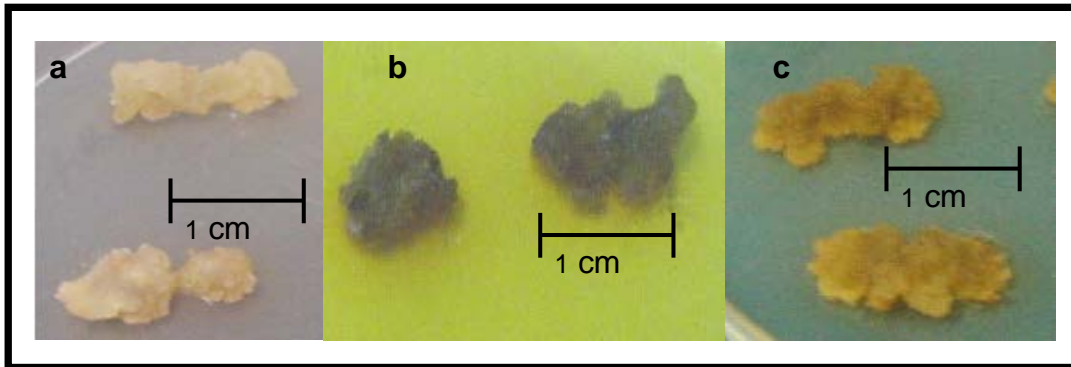
### 7.4 Inducción de callo

Al término de 4 semanas de incubación, se distinguieron morfológicamente 3 tipos de callo: amarillo friable, marrón compacto y marrón friable (Figura 20).

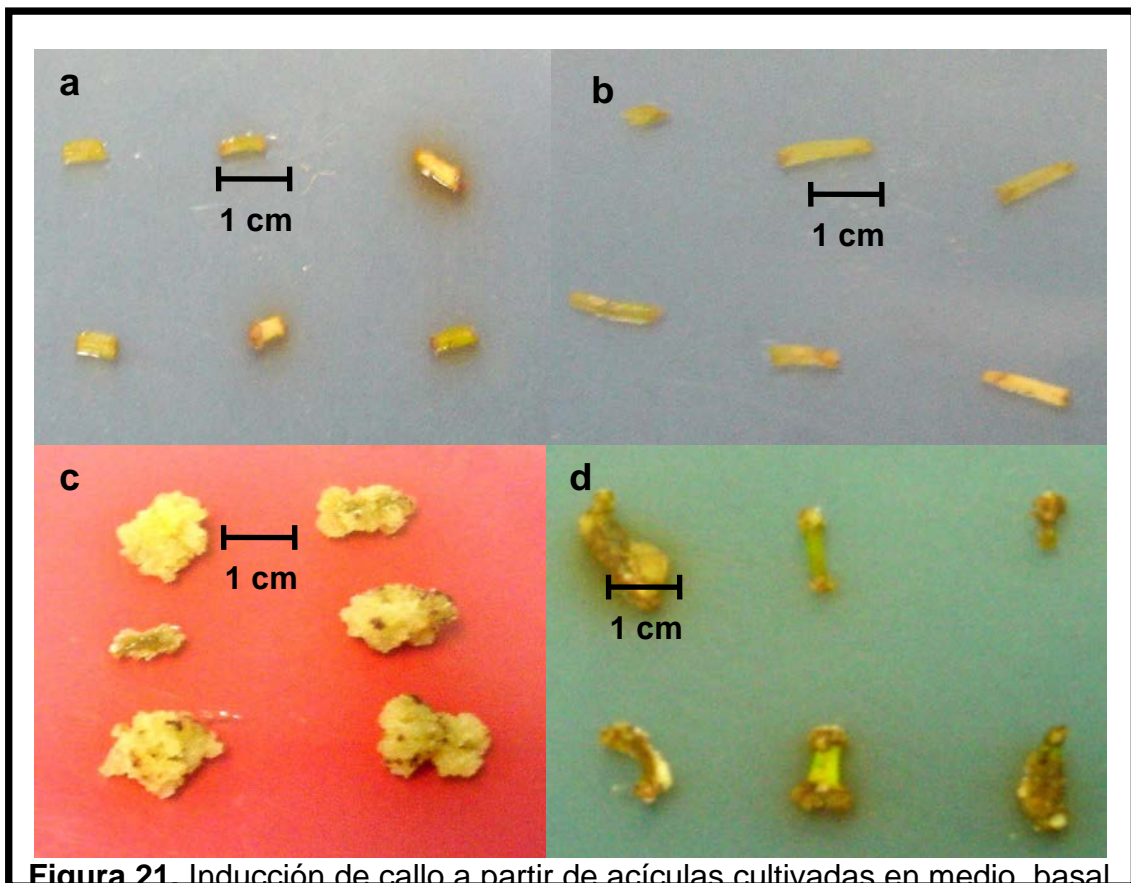
Los resultados obtenidos fueron: los tratamientos con BA, pero sin 2,4-D (T6, T11 y T16) no presentaron inducción de callo, siendo muy similares al tratamiento control (T1) (Figura 21a, b), mientras que la mejor inducción de callo se obtuvo en los tratamientos que contenían solo la auxina 2,4-D (T2, T3, T4 y T5) siendo el tratamiento T5 (4 mg/L de 2,4-D) donde se observó el mayor crecimiento de callo. Este callo fue de color amarillo y con una consistencia friable (Figura 21c). Por el contrario, en los tratamientos tanto con BA como con 2,4-D (T7, T8, T9, T10, T12, T13, T14, T15, T17, T18, T19 y T20), la formación de callo fue mínima, como en el caso del tratamiento T8 (2 mg/L de 2,4-D y 0.1 mg/L de BA), en el cual se observó muy poca inducción de callo, de color crema, poco friable,



además de la presencia de fenoles (Figura 21d). Los resultados de la interacción de BA y 2,4-D en la inducción de callo se muestran en la tabla 22.



**Figura 20.** Morfología de los tres tipos de callos que se observaron en la fase de inducción al término de 4 semanas de incubación: (a) amarillos friables, (b) marrones compactos y (c) marrones friables.



**Figura 21.** Inducción de callo a partir de acículas cultivadas en medio basal B5 durante 4 semanas en oscuridad. (a) Tratamiento control (T1). (b) Tratamiento T6 (0.1 mg/L de BA), que muestra semejanza con el tratamiento control, al no presentar inducción de callo. (c) Callo amarillo friable obtenido del Tratamiento T5 (4 mg/L de 2,4-D) y (d) Callo poco friable, crema y presencia de fenoles en el Tratamiento (T8) 2 mg/L de 2,4-D y 0.1 mg/L de BA.

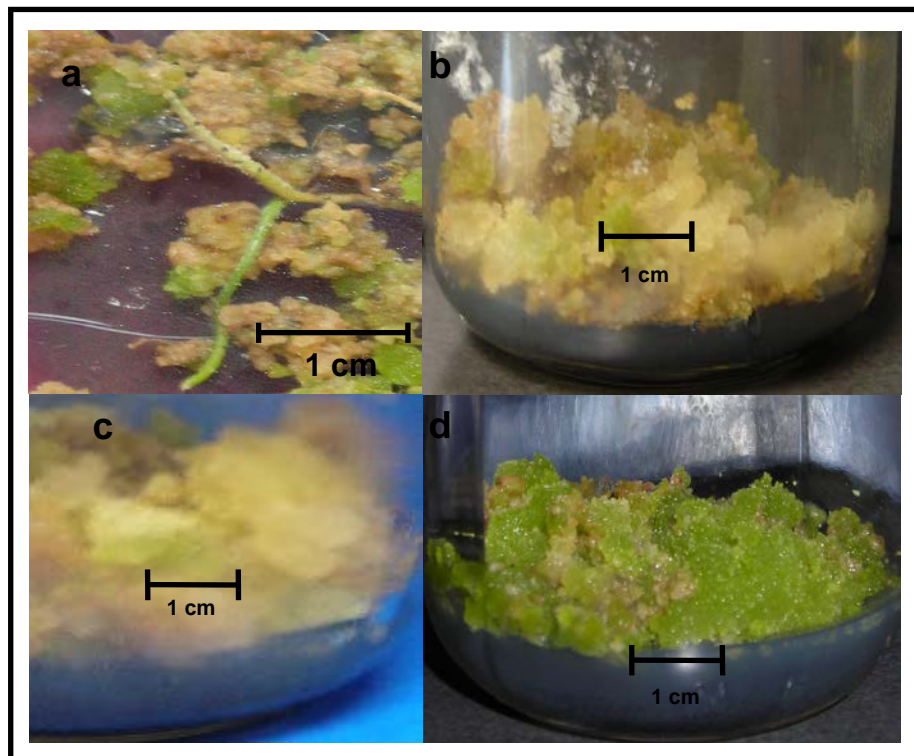
**Tabla 22.** Efecto de BA y 2,4-D en la inducción de callo de acículas de *Taxus globosa* Schltld y porcentaje de crecimiento de callo.

Tratamiento	BA (mg/L)	2,4-D (mg/L)	Porcentaje de inducción de callo (%)	Morfología del callo
T1	0.0	0.0	0	Sin inducción
T2	0.0	1.0	83.33	Amarillo friable
T3	0.0	2.0	83.33	Amarillo friable
T4	0.0	3.0	91.66	Crema friable
T5	0.0	4.0	100	Crema friable
T6	0.1	0.0	0	Sin inducción
T7	0.1	1.0	41.66	Amarillo friable
T8	0.1	2.0	41.66	Amarillo friable
T9	0.1	3.0	41.66	Amarillo friable
T10	0.1	4.0	41.66	Amarillo friable
T11	0.3	0.0	0	Sin inducción
T12	0.3	1.0	25.00	Compacto café
T13	0.3	2.0	25.00	Compacto café
T14	0.3	3.0	25.00	Compacto café
T15	0.3	4.0	25.00	Compacto café
T16	0.5	0.0	0	Sin inducción
T17	0.5	1.0	16.00	Compacto café
T18	0.5	2.0	16.00	Compacto café
T19	0.5	3.0	16.00	Compacto café
T20	0.5	4.0	16.00	Compacto café

Se seleccionaron los callos amarillos friables y cremas friables de los tratamientos T2, T3, T4 y T5 para su multiplicación. Se mantuvieron en el medio basal B5 (Gamborg y col., 1968) suplementado con vitaminas 2x B5, 4 mg/L de 2,4-D, 30 g/L de sacarosa y 10 g/L de agar, ajustado a un pH de 5.8, en oscuridad total a 25°C. El problema de oxidación de los callos se corrigió al agregar al medio de cultivo 1 g/L de carbón activado, este compuesto es importante adicionarlo en los trabajos *in vitro* ya que es un adsorbente de los compuestos fenólicos que desechan los tejidos vegetales (Thomas, 2008). Los callos se mantuvieron en este medio durante 3 meses, con resiembras mensuales, hasta que en algunos callos se observó el crecimiento de raíces (Figura 22a), esto debido a la concentración elevada de 2,4-D y la oscuridad total. Este proceso morfogénico no es deseable en el establecimiento de líneas celulares en suspensión por lo que se

## Establecimiento *in vitro* de *Taxus globosa* Schldl.

tuvo que corregir el problema. Se siguió con el mismo medio de cultivo solamente que se tuvo que disminuir la concentración de 2,4-D, el cual fue de 3 mg/L. Durante los siguientes 3 meses los callos se mantuvieron con el medio de cultivo y condiciones de incubación anteriores hasta que unos callos conservaron la coloración crema (Figura 22b) y otros se tornaron incoloros (Figura 22c), esto se debió al tiempo prolongado en oscuridad total, por lo que se cambiaron a un fotoperíodo de 16 h. Después del primer mes los callos se tornaron con una coloración verde (Figura 22d). Desde la selección de los callos friables de coloración amarilla y crema hasta que éstos se tornaran verdes, transcurrieron 7 meses, tiempo adecuado en el cual el crecimiento de callo ya eran viables para ser transferidos al medio líquido para la iniciación de las líneas celulares en suspensión y la organogénesis indirecta.



**Figura 22.** Situaciones que se presentaron en el mantenimiento y multiplicación de callo. (a) Rizogénesis, (b) Callos friables color crema, (c) Callo translucido y (d) Callos friables con coloración verde.

En la inducción de callos el material vegetal utilizado puede provenir de cualquier tejido u órgano vegetal y puede realizarse en diversidad de especies, pero para su iniciación requiere de varios factores como los componentes químicos minerales del medio utilizado, las concentraciones de los reguladores de crecimiento utilizados, la luz, la temperatura, la humedad y por supuesto la constitución genética de los genotipos de la planta (Caponetti, 2000), la consistencia y el color de los callos también son influenciados por esos mismos factores. Así, en el género *Taxus*, Hien y col. (2004) realizaron la inducción de callos utilizando tallos jóvenes y acículas de la especie *Taxus wallichiana* Zucc. siendo estos friables y de color amarillento o verde claro, y con la misma especie pero empleando semillas Datta y col. (2006) obtuvieron callos friables color crema y compactos de color amarillo o verde. Wickremesinhe y col. (1993) utilizando brotes jóvenes, brotes maduros y acículas obtuvieron callos friables ya sea amarillos claros o café claros de varias especies de *Taxus*. Generalmente los callos adecuados para iniciar una línea celular, tienen una consistencia friable. En este trabajo la mejor inducción de callo se obtuvo con el tratamiento T5 (4 mg/L de 2,4-D), éstos callos eran friables y de color amarillo, coincidiendo con Wickremesinhe y col. (1993) quienes con 1 o 2 mg/L de 2,4-D obtuvieron la mejor inducción de callo en *Taxus baccata* cv Densiformis y en *Taxus brevifolia* y con Jiaru y col. (1999) que con 1 mg/L de 2,4-D obtuvieron la mejor inducción de callos en *Taxus chilensis*, en su estudio el 2,4-D entre otras auxinas probadas fue la que les dio mejor resultado en la inducción de callo. Por el contrario, en este estudio, los tratamientos de BA en combinación con 2,4-D, la formación de callo fue mínima y se observó muy poca inducción, fue de color crema, poco friable, además de la presencia de fenoles. Este resultado difiere con los que obtuvieron otros autores, los cuales con la combinación de auxinas y citocininas obtuvieron los mejores resultados para la inducción de callo, como es el caso de Ashrafi y col. (2010) que con 4 mg/L de 2,4D en combinación de 0.5 mg/L de KIN obtuvieron la mejor inducción de callo en la especie *Taxus baccata* L., mientras que Hien y col. (2004) con 4 mg/L de 2,4-D en combinación de 1 mg/L de KIN obtuvieron los mejores callos en *Taxus wallichiana* Zucc. y con la misma especie pero con 2 mg/L de 2,4-D en combinación de 0.5 mg/L de BA Datta y col. (2006) también obtuvieron sus mejores callos.

El problema de oxidación de los callos se corrigió al agregar al medio de cultivo 1 g/L de carbón activado, el efecto benéfico del carbón activado se atribuye a su capacidad para atrapar sustancias inhibitorias o tóxicas del medio de cultivo que son producidas durante el autoclavado del medio o liberadas por el explante (Azofeifa, 2009). Existen otras alternativas para evitar este problema, como el utilizado por Ashrafi y col. (2010) quienes evitaron la oxidación de callos de *Taxus baccata* L. al agregar al medio de cultivo 500 mg/L de PVP (polivinilpirrolidona).

### 7.5 Inducción de brotes adventicios

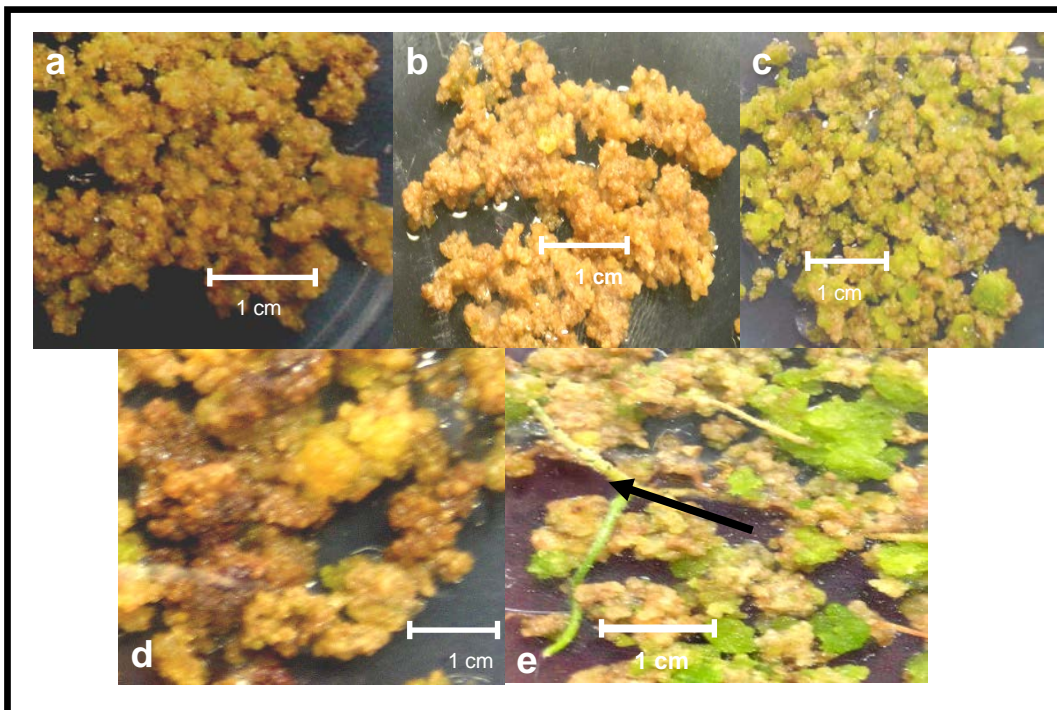
Al término de 4 semanas de incubación se observó crecimiento de callo en los tratamientos TB2, TD2, TI2, TL2, TN2, TR2, TU2, TV2, TW2 y TX2. Con respecto a la coloración se distinguieron tres diferentes tonalidades: callos café oscuro, callos café claro y callos verde-café (Figura 23a, b y c). Con respecto a la consistencia los tratamientos que presentaron callos friables fueron la gran mayoría a excepción de los tratamientos TA2 (control), TE2, TH2 y TT2 (Figura 23d), en los cuales la consistencia de los callos fue compacta. Con respecto al objetivo principal del ensayo, no hubo ninguna inducción de brotes adventicios en ningún tratamiento, y la única respuesta morfogénica consistió en rizogénesis en el tratamiento TR2 (Figura 23e). Con respecto a la oxidación en ningún tratamiento se presentó, ya que se corrigió al adicionar 1 g/L de carbón activado.

En la inducción de brotes adventicios de la especie *Taxus globosa* Schldl. solo se observó el crecimiento de callo y cambio en su coloración inicial. El explante inicial, la morfología del callo y la concentración de reguladores de crecimiento son factores importantes para obtener brotes adventicios. Datta y col. (2006) obtuvieron el mayor número de brotes adventicios de *Taxus wallichiana* Zucc., a partir de callos verdes compactos en el medio WPM al 50% con vitaminas SH con la acción de 2.5 mg/L de BA y con la misma especie Hussain y col. (2013) obtuvieron el mayor número de brotes adventicios a partir de callos verdes compactos y café friables usando el medio MS con la acción de 2.0 mg/L de BA y en *Taxus brevifolia* Nutt., Chee (1995) obtuvo brotes adventicios de callos café friables utilizando el medio B5 al 50% adicionado con 10  $\mu$ M de BA. En este caso fue necesario para la inducción de brotes adventicios la acción de una sola citocinina. Caso contrario en la investigación de Das y col. (2008) que en callos

## Establecimiento *in vitro* de *Taxus globosa* Schldl.

café friables de *Taxus wallichiana* Zucc., en el medio WPM con la interacción de 5.0  $\mu$ M de 2,4-D y 2.0  $\mu$ M de BA obtuvieron el mayor número de brotes adventicios. Baharak y col. (2014) obtuvieron brotes adventicios de *Taxus baccata* L. a partir de callos crema friables y café compactos adicionado con 3 mg/L de KIN y 3 mg/L de BA. En estos casos fue necesario la interacción de dos reguladores de crecimiento para la inducción de brotes adventicios.

En el caso de *Taxus globosa* Schldl. la única respuesta morfogénica que se obtuvo fue la rizogénesis en el tratamiento TR2 (7 mg/L de BA + 0.03 mg/L de 2,4-D). La inducción de raíces de los brotes adventicios se obtiene con la acción de auxinas ya sea en acción conjunta o independiente. Ewald (2007) obtuvieron la rizogénesis en brotes de *Taxus baccata* L. con la concentración de 2 mg/L de IBA y Hussain y col. (2013), obtuvieron raíces en brotes adventicios de *Taxus wallichiana* Zucc., con la concentración de 8 mg/L de IBA, mencionando que la IBA es la auxina mas eficiente para la formación de raíces en brotes.



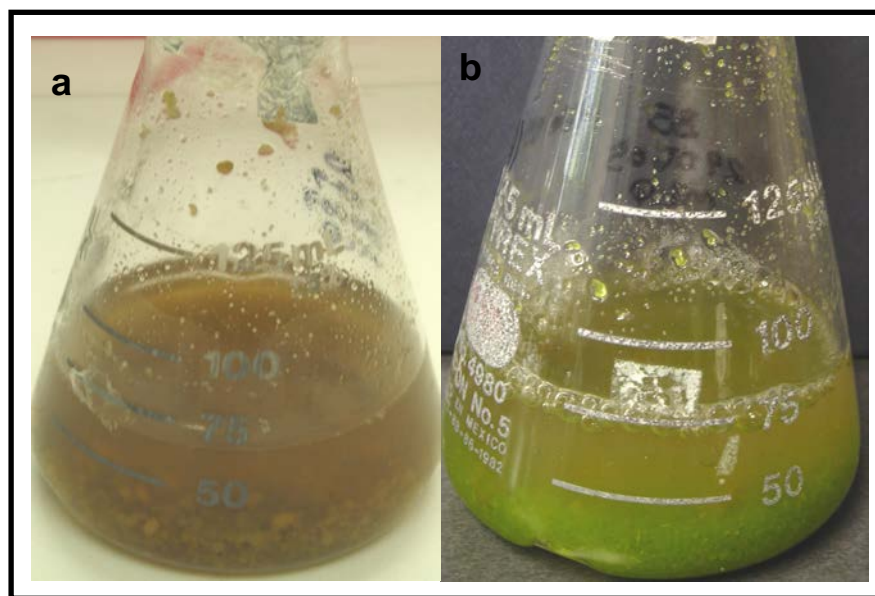
**Figura 23.** Crecimiento de callo en la Inducción de brotes adventicios al término de las 4 semanas de incubación. (a) Callo friable café oscuro. (b) Callo friable café claro. (c) Callo friable verde-café. (d) Callo compacto café oscuro y (e) Callo friable verde-café con rizogénesis.

### 7.6 Iniciación del cultivo de líneas celulares en suspensión

Después de 30 días de incubación de los medios de cultivo en suspensión, se evaluó visualmente las variables de respuesta (crecimiento celular, coloración de los callos y el proceso de oxidación).

Se observó el crecimiento de callo y una turbidez del medio líquido, considerándose estas dos respuestas como indicadores del crecimiento celular en suspensión. No se presentaron cambios en la coloración de los clusters éstos conservaron la coloración inicial (cremosa y verde). En cuanto al proceso de oxidación no se presentó debido a los antioxidantes (3 g/L de ácido cítrico con 2 g/L de ácido ascórbico) que fueron agregados al medio de cultivo (Figura 24). Posteriormente se transfirieron al medio basal B5 (Gamborg y col., 1968), suplementado con vitaminas B5 2x, 2 mg/L de 2,4-D, 30 g/L de sacarosa, 3 g/L de ácido cítrico y 2 g/L de ácido ascórbico, ajustado a un pH de 5.8. Se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 mL a los cuales se les colocó 25 mL de medio de cultivo y se les inoculó 5 mL del medio celular en suspensión.

El medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121°C a una presión de 1 kg/cm<sup>2</sup> durante 15 minutos. Los matraces se colocaron en un agitador a 125 rpm. El fotoperíodo fue de 16 h, a una temperatura de 25°C. Este procedimiento con el propósito del mantenimiento y multiplicación celular, para posteriores trabajos.



**Figura 24.** Aspecto de las líneas celulares en suspensión contenidas en los matraces al término de 30 días. (a) Callos friables crema y (b) Callos friables verde.

En los medios de cultivo celular en suspensión, las células individuales se distribuyen en forma homogénea a través del medio de cultivo y por estar rodeadas del mismo, se facilita la transferencia de nutrientes y oxígeno hacia el citoplasma, y con ello al incremento de metabolitos secundarios (Arias y col., 2009). La acumulación de metabolitos secundarios es un resultado dinámico entre la formación del producto, la transportación, el almacenamiento y la degradación (Vanisree y Tsay, 2004).

En las suspensiones celulares es necesario considerar dos etapas en el proceso, una de crecimiento celular seguida de una acumulación del metabolito secundario (Pérez y col., 2004). Durante el proceso se analizó visualmente el crecimiento celular, ya que hubo incremento de los agregados celulares inoculados, así como la turbidez del medio, caso contrario a lo acontecido por Hien y col. (2004) que en el cultivo de células en suspensión de *Taxus wallichiana* no se presentó en el medio líquido incremento celular, siendo la coloración del medio nítida, considerando estos dos factores como indicadores de que no existió crecimiento celular. El color rojo claro en el medio líquido es indicador de un proceso de oxidación celular (Wickremesinhe y Arteca, 1994; Hirasuna y col., 1996), esta coloración no se presentó debido a la incorporación al medio de 3 mg/L de ácido cítrico y de 2 mg/L de ácido ascórbico, ya que estos en acción conjunta actuaron como antioxidantes.

Para la acumulación de metabolitos secundarios es importante considerar diversos factores de cultivo. El incremento del paclitaxel en medios de cultivo en suspensión es influenciado por: el medio basal (Fett-Neto y col., 1993), la especie (Yukimune y col., 1996), dentro de una misma especie la línea celular y los reguladores de crecimiento (Ketchum y col., 1995; Ketchum y Gibson, 1996), la luz (Pérez y col., 2004; Tang y col., 2001), la adición de carbohidratos y aminoácidos (Syklovska-Baranek y Furmanowa, 2005; Ketchum y col., 1995) entre otros. En la figura 25 se presenta el proceso que se llevó a cabo para el cultivo de células en suspensión. Este trabajo es importante para futuras investigaciones para el incremento y extracción de paclitaxel en la especie *Taxus globosa* Schldl.



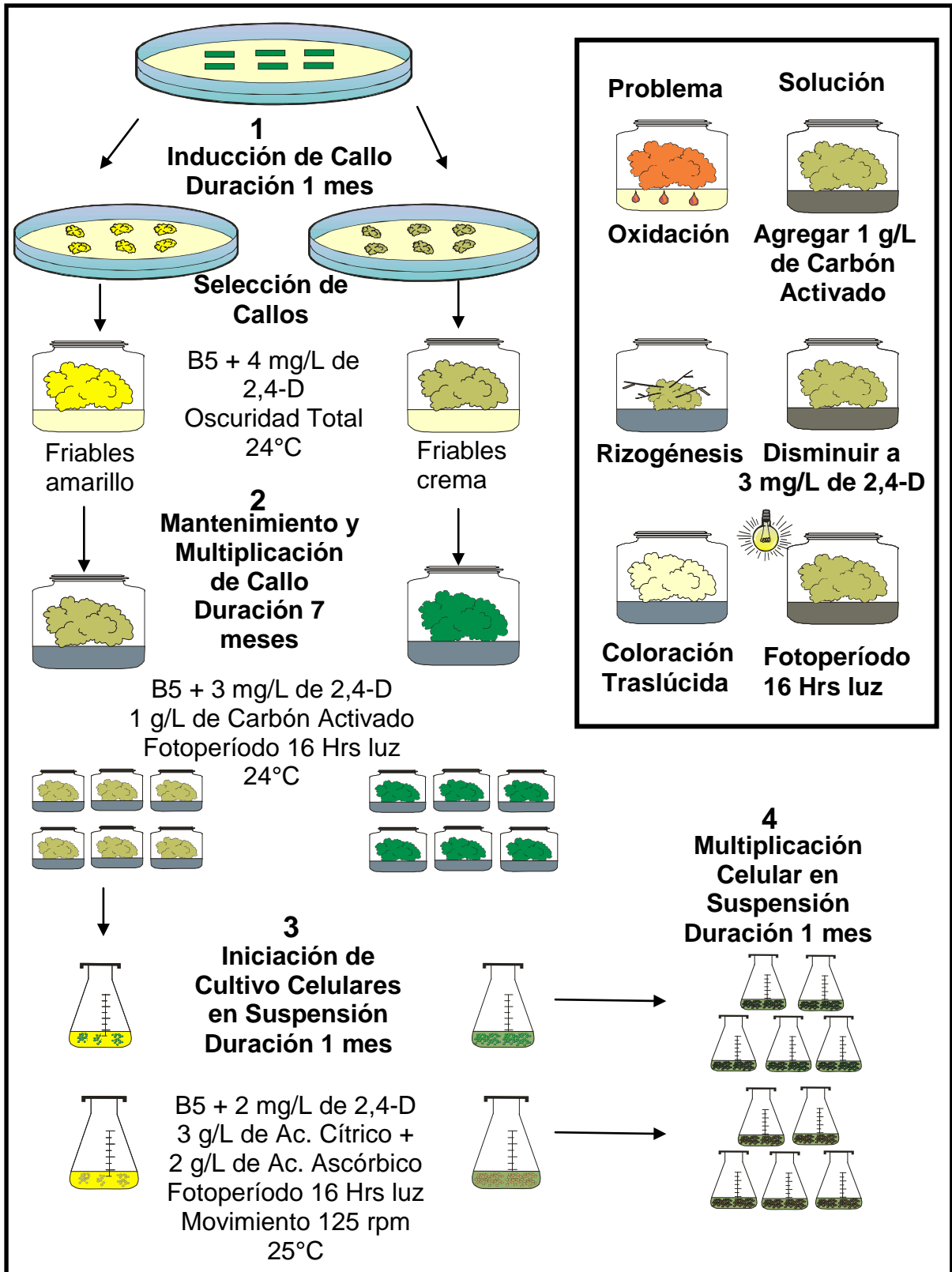


Figura 25. Proceso para la iniciación del cultivo de células en suspensión de *Taxus globosa* Schtdl.

## **8. CONCLUSIONES**

El protocolo de desinfección desarrollado fue efectivo para el establecimiento *in vitro* de *Taxus globosa* Schldtl.

Un factor importante para la reducción de la oxidación de los explantes fue al mantenerlos en oscuridad total con la adición de PVP al 0.1% y de ácido cítrico al 0.5% a la solución del pretratamiento durante las 16 hrs previas al establecimiento.

Se demostró que el grado de oxidación de los explantes se disminuyó considerablemente con la utilización del ácido cítrico y el ácido ascórbico en acción conjunta.

En la especie *Taxus globosa* Schldtl es recomendable que en los ensayos para la proliferación de yemas axilares, los explantes conserven su ápice (meristemo apical) y la acción independiente en concentraciones altas de las citocininas (KIN y 2iP) siendo el 2iP la citocinina que obtuvo mayor promedio de brotes. Cuando al explante se le somete a la decapitación de su meristemo apical, para la mejor inducción de brotes axilares es necesario la interacción de dos citocininas a concentraciones altas.

Para estudios posteriores se recomienda para la inducción de brotes adventicios la acción independiente de alguna citocinina. Para la inducción de brotes adventicios a partir de callos en el género *Taxus* la citocinina que mayormente utilizada es la BA en concentraciones de 1.0 a 3.0 mg/L.

El regulador de crecimiento 2,4-D es la auxina que tiene mayor potencial para la inducción de callo. Los callos friables ya sea de coloración amarilla o verde son los que tienen mejores características para ser sometidos a respuestas morfogénicas.

En la inducción del callo es importante que el explante inicial se mantenga bajo oscuridad total. Posteriormente durante 2 meses estos callos deben ser transferidos a condiciones de luz.

La oxidación y la rizogénesis de los callos se evitaron al agregar al medio de cultivo 1 g/L de carbón activado y se disminuyó la dosis del 2,4-D a 3 mg/L.

La oxidación del cultivo celular en suspensión se evitó al agregar 3 mg/L de ácido cítrico en acción conjunta de 2 mg/L de ácido ascórbico.

## **9. PERSPECTIVAS**

La columna vertebral del trabajo de tesis fue la realización del establecimiento *in vitro* de la especie *Taxus globosa* Schltl. la cual se concluyó en forma satisfactoria.

Paulatinamente se realizaron otros ensayos con la especie *Taxus globosa* Schltl. Se trabajó con la proliferación de yemas axilares, la iniciación de la organogénesis y el cultivo de líneas celulares en suspensión, esto debido a la poca existencia de trabajos biotecnológicos y con el objetivo de ganar paso y conocer más del comportamiento bajo condiciones *in vitro* de la especie.

Para la conclusión del cultivo de líneas celulares en suspensión, se recomienda realizar el monitoreo del crecimiento celular y la extracción del paclitaxel para conocer su concentración, cabe mencionar que el presente trabajo queda como material de apoyo y abre la puerta a futuras líneas de investigación.

**Establecimiento *in vitro* de *Taxus globosa* Schldl.**

**ANEXO I.** Sales minerales componentes de los medios basales MS (Murashige y Skoog, 1962), WPM (Lloyd y McCown, 1980), B5 (Gamborg y col., 1968) y SH (Schenk y Hildebrandt, 1972) y mezclas de vitaminas adicionadas.

<b>Componentes</b>	<b>Murashige y Skoog, 1962 (MS)</b>	<b>Lloyd y McCown, 1980 (WPM)</b>	<b>Gamborg y col., 1968 (B5)</b>	<b>Schenk y Hildebrandt, 1972 (SH)</b>
<b>Macronutrientes</b>	<b>Concentracion (mg/L)</b>			
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	400	---	---
KNO <sub>3</sub>	1900	---	3000	2500
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	440	96	150	200
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	370	370	500	400
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	170	---	---
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	---	556	---	---
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	---	990	---	---
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	---	---	150	300
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	---	---	134	---
<b>Micronutrientes</b>				
MnSO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O	22.3	22.3	10	10
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	8.6	8.6	2	1
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	6.2	3	5
KI	0.83	---	0.75	1
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0.25	0.25	0.25	0.1
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0.025	0.25	0.025	0.2
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0.025	---	0.025	0.1
<b>Fuente de hierro</b>				
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	27.8	27.8	28	15
Na <sub>2</sub> EDTA . 2H <sub>2</sub> O	37.3	37.2	---	20
<b>Vitaminas</b>				
Mio-Inositol	100	100	100	1000
Acido nicotínico	0.5	---	1	5
Piridoxina . HCl	0.5	---	---	0.5
Glicina	2	---	1	---
Tiamina . HCl	0.1	0.4	10	5

## BIBLIOGRAFÍA

- Abbasin Z., Zamani S., Movahedi S., Khaksar G. y Sayed-Tabatabaei B.E. 2010. *In vitro* micropropagation of yew (*Taxus baccata*) and production of plantlets. *Biotechnol.* 9: 48-54.
- Allison T.D. 1990. The influence of deer browning on the reproductive biology of Canada yew (*Taxus canadensis* Marsh.). *Oecol.* 83: 523-529.
- Ahmad I., Hussain T., Ashraf I., Nafees M., Maryam, Rafay M. e Iqbal M. 2013. Lethal effects of secondary metabolites on plant tissue culture. *American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* 13 539-547.
- Arias M., Aguirre A., Angarica M., Montoya C. y Restrepo J. 2009. Aspectos ingenieriles del cultivo *in vitro* de células vegetales para la reproducción de metabolitos secundarios. *Dyna.* 76:109-121.
- Ashrafi S., mofid M.R., Otroshi M., Ebrahimi M. y Khoroshahli M. 2010. Effects of plant growth regulators on the callogenesis and taxol production in cell suspensión of *Taxus baccata* L. *Trakia J. Sci.* 8: 36-43.
- Azofeifa A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agro. Mesoamer.* 20: 153-175.
- Baharak B. S., Mansoor O., Reza N. M., Farhad H. A., Sepideh K. J., Mehdi S. y Mohammad S. 2014. Effect of explants, salts concentration medium and hormone treatments on *Taxus baccata in vitro* culture. *Int. J. Biosci.* 5: 1-9.
- Barrales-Cureño H. J., Soto-Hernández R. M., Ramos-Valdivia A. C., Trejo-Téllez L. I., Martínez-Vázquez M., Ramírez-Guzmán M. E., San Miguel-Chávez R., Luna-Palencia G. R. y López-Uptón J. 2010. Extracción y cuantificación de taxoides por HPLC en hojas *in situ* y en callos inducidos *in vitro* de *Taxus globosa* Schlecht. *S. J. Rural Development.* 2: 103-114.
- Barrales-Cureño H. J. y Ramírez-Sepúlveda M. F. 2013. Una revisión sobre la producción de taxoides anticancerígenos en cultivos *in vitro* de callos y células de *Taxus* spp. *Rev. Colomb. Biotechnol.* 15: 167-177.
- Barrios H., Zhang Y.L., Sandoval C. y Xiao Z.A. 2009. Increase of taxol production in *Taxus globosa* shoot callus by chlorocholine chloride. *Open Nat. Prod. J.* 2: 33-37.
- Beyl C.A. 2000. Getting started with tissue culture – media preparation, sterile technique, and laboratory equipment. En: Trigiano R.N. y Gray D.J. (eds), *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises* 2<sup>da</sup> Edición. CRC Press LLC Boca Ratón, Florida. Pp 21-38.
- Bhat S.R. y Chandel P.S. 1991. A novel technique to overcome browning in tissue culture. *Plant Cell Rep.* 10: 358-36.

- Bhojwani S.S. y Dantu P.K. 2013. General requirements and techniques. En: Plant Tissue Culture: An Introductory Text. 1<sup>ra</sup> Edition Springer The Netherlands.
- Bimer A. 2005. Abraxane™ Review. HOPA News. Verano 2005. Pp. 1-4. [www.hoparx.org](http://www.hoparx.org).
- Blanco E., Vasco F., Abella I. y Cortés Simón. 2008. Tejo y cultura: de la tradición etnobotánica a la farmacología científica. II Jornades sobre el teix a la Mediterrània occidental. Pp 63-78.
- Bonfill M., Expósito O., Moyano E., Cusido R. M., Palazón J. y Piñol M.T. 2006. Manipulation by culture mixing and elicitation of paclitaxel and Baccatin III production in *Taxus baccata* suspension cultures. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 42: 422–426.
- Bonga J.M. 1981. Organogénesis *in vitro* of tissues from mature conifers. *In vitro* 17: 511-518. © 1981 Tissue Culture Association, Inc.
- Bourgaud F., Gravot A., Milesi S. y Gontier E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Sci.* 161: 839–851.
- Brukhin V.B., Moleva I.R., Filonova L.H., Grakhov V.P., Blume Y.B. y Bozhkov P. V. 1996. Proliferative activity of callus cultures of *Taxus baccata* L. in relation to anticancer diterpenoid taxol biosynthesis. *Biotechnol. Lett.* 18: 1309-1314.
- Bruňáková K., Babincová Z., Takáč M. y Čellárova E. 2004. Selection of callus cultures of *Taxus baccata* L. as a potential source of paclitaxel production. *Eng. Life Sci.* 4: 465-469.
- Bruňáková Z., Babincová Z. y Čellárova. 2005. Production of taxanes in callus and suspension cultures of *Taxus baccata* L. En: Hvoslef-Eide A. K. y Preil W. (eds). Liquid Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation. Springer. The Netherlands. Pp. 567-574.
- Bulgakov V. P., Tchernoded G. K., Veselova M.V., Fedoreyev S.A., Muzarok T.I. y Zhuravlev Y.N. 2011. Catechin production in cultured cells of *Taxus cuspidata* and *Taxus baccata*. *Biotech. Lett.* 33: 1879-1883.
- Caponetti J.D. 2000. Nutrition of callus cultures. En: Trigiano R.N. y Gray D.J. (eds). Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises. 2<sup>da</sup> edición. CRC Press LLC Boca Ratón, Florida. Pp. 39-44.
- Centelles J. J. e Imperial S. 2010. Paclitaxel: descubrimiento, propiedades y uso clínico. *Fitoterapia.* 29: 68-75.
- Chang S.H, Ho C.K., Chen Z.Z y Tsay J.Y. 2001. Micropropagation of *Taxus mairei* from mature trees. *Plant Cell Rep.* 20: 496–502.
- Chee P.P. 1994. *In Vitro* Culture of Zygotic Embryos of *Taxus* Species. *HortSci.* 29: 695–697.

## Establecimiento *in vitro* de *Taxus globosa* Schltdl.

---

- Chee P.P. 1995. Organogenesis in *Taxus brevifolia* tissue cultures. *Plant Cell Rep.* 14: 560–565.
- Chee P.P. 1996. Plant regeneration from somatic embryos of *Taxus brevifolia*. *Plant Cell Rep.* 16: 184-187.
- Chien C. T., Kuo-Huang L. L. y LIN T. P. 1998. Changes in ultrastructure and abscisic acid level, and response to applied gibberellins in *Taxus mairei* seeds treated with warm and cold stratification. *Ann. Bot.* 81: 41-47.
- Christen A.A., Bland J. y Gibson D.M. 1989. Cell culture as a means to produce taxol. *Proc. Am. Asso. Cancer Res.* 30: 566.
- Christen A.A., Gibson D.M. y Bland J. 1991. Production of taxol or taxol-like compounds in cell culture. US Patent No. 5,019,504.
- Christenhusz M.J.M., Reveal J.L., Farjon A., Gardner M.F. Mill R.R. y Chase M.W. A new classification and linear sequence of extant gymnosperms. *Phytotaxa.* 19: 55-70.
- Collin H.A. 2001. Secondary product formation in plant tissue cultures. *Plant Growth Reg.* 34: 119-134.
- Collins D., Mill R.R. y Möller M. 2003. Species separation of *Taxus baccata*, *T. Canadensis* y *T. cuspidate* (Taxaceae) and origins of their reputed hybrids inferred from RAPD and cpDNA data. *Amer. J. Bot.* 90: 175-182.
- Contreras-Medina R. y Luna-Vega I. 2001. Presencia de *Taxus globosa* Schlecht. (Taxaceae) en el estado de Chiapas, México. *Polibotánica* 12: 51-55.
- Contreras-Medina R., Luna-Vega I. y Ramírez-Martínez J. C. 2011. Representatividad del tejo mexicano (*Taxus globosa* Schltdl., Taxaceae) en las áreas naturales protegidas de Mesoamérica. *S. J. Rural Development.* 2: 52-60.
- Correa Y.M., Niño J. y Mosquera O.M. 2006. Cuantificación de taxol y baccatin III en callos de *Taxus baccata* por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). *Ciencia et Técnica Año XII.* 32: 431- 435.
- Cope E. A. 1998. Taxaceae: The genera and cultivated species. *Bot. Rev.* 64: 291-322.
- Cope R. B. 2005. The dangers of yew ingestion. *Toxicology Brief.* Septiembre Pp. 646-650.
- Cronquist A. 1971. Introducción a la botánica. Edit. Continental. México.
- Cusidó R. M., Vidal H., Gallego A., Abdoli M. y Palazón J. 2013. Biotechnological production of taxanes: A molecular approach. *Recent Advan. Pharmac. Sci.* 3: 91-107.

- Danishefsky S.J., Masters J.J., Young W.B., Link J.T., Snyder L.B., Magee T.V., Jung D.K., Isaacs R.C.A., Bornmann W.G., Alaimo C.A., Coburn C.A. y Di Grandi M.J. 1996. Total synthesis of baccatin and taxol. *J. Am. Chem. Soc.* 118: 2843-2859.
- Das K., Dang R., Ghanshala N. y Rajasekharan P.E. 2008. *In vitro* establishment and maintenance of callus of *Taxus wallichiana* Zucc. For the production of secondary metabolites. *Nat. Prod. Radiance.* 7: 150-153.
- Datta M.M. y Jha S. 2004. Embryo culture of *Taxus wallichiana* (Zucc.). *J. Plant Biotechnol.* 6: 213-219.
- Datta M.M., Majumder A. y Jha S. 2006. Organogenesis and plant regeneration in *Taxus wallichiana* (Zucc.). *Plant Cell Rep.* 25: 11-18.
- Datta M.M. y Jha S. 2008. Plant regeneration through somatic embryogenesis in *Taxus wallichiana*. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 17: 37-44.
- Davarpanah S. J., Lahouti M. y Karimian R. 2014. Micropropagation of common yew using embryo culture. *J App. Biotechnol. Rep.*1: 77-80.
- Debnath M., Malik C. P. y Bisen P. S. 2006. Micropropagation: a tool for the production of high quality plant-based medicines. *Current Pharmac. Biotech.* 7: 33-49.
- Delahunty J.L. 2007. The ethnobotanical history and holocene extent of yew (*Taxus baccata* L.) on the irish landscape. *J. Ethnobiol.* 27: 204-217.
- Dempsey D. y Hook I. 2000. Yew (*Taxus*) species – chemical and morphological variations. *Pharma. Biol.* 38: 274-280.
- Denis J.N., Greene A.E., Guenard D., Gueritte-Voegelein F., Mangatal L. y Potier P. 1988. A highly efficient, practical approach to natural taxol. *J. Am. Chem. Soc.* 110: 5917-5919.
- Erdemoglu I., Sener B. y Palittapongarnpim P. 2003. Antimycobacterial activity of *Taxus baccata*. *Pharm. Biol.* 41: 614-615.
- Estrada-Girón X. "Establecimiento de un banco de germoplasma *in vitro* de las especies mezcaleras *Agave angustifolia* Haw. y *Agave cupreata* Trel. & Berger.". Director: Rodríguez Garay Benjamín. Tesis de Maestría. Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías. Guadalajara, Jalisco, Junio 2007.
- Ewald D. 2007. Micropropagation of yew (*Taxus baccata* L.). En: Jain S.M. y Häggman H. (eds). Springer. The Netherlands. Pp. 117-123.
- Expósito O, Bonfill M., Moyano E., Onrubia M., Mirjalili M.H., Cusidó R.M. y Palazón J. 2009. Biotechnological production of taxol and related taxoids: current state and prospects. *Anti-Cancer Agen. Med. Chem.* 9: 109-121.



- Fakheri B. A., Mahdinejad N. y Ghanbari S. 2015. Investigation of the effects of growth regulators on callus induction in *Taxus baccata* L. *Biol. Forum. Inter. J.* 7: 732-735.
- Farjon A. 2001. World checklist and bibliography of conifers. Second edition. The Royal Botanic Gardens at Kew, Richmond, U.K. Pp. 294-303.
- Fauzee N. J. S., Dong Z. y Whang Y. L. 2011. Taxanes: promising anti-cancer drugs. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 12: 837-851.
- Fett-Neto A. G., DiCosmo F., Reynolds W. F. y Sakata K. 1992. Cell culture of *Taxus* as a source of the antineoplastic drug taxol and related taxanes. *Biotechnol.* 10: 1572-1575.
- Fett-Neto A.G., Melanson S.J., Sakata K. y DiCosmo F. 1993. Improved growth and taxol yield in developing calli of *Taxus cuspidata* by medium composition modification. *Nature Biotechnol.* 11: 731-734.
- Fernández C., López D., Alonso N., Toribio M. y Alegre J. 2004. Conservación y caracterización de poblaciones de tejo. *Agricultura* 869: 950-957.
- Filová A. y Rovná K. 2011. *Taxus* spp. As a source of natural anticancer compounds. *Acta Fytotech. Zootech. Special Number.* Pp 24-27.
- Filová A. 2014. Production of secondary metabolites in plant tissue cultures. *Res. J. Agric. Sci.* 46: 236-245.
- Flores T., Wagner T. L. y Flores H. E. 1993. Embryo culture and taxane production in *Taxus* spp. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 29: 160-165.
- Florin R. On the morphology and relationships on the Taxaceae. *Bot. Gazette.* 110: 31-39.
- Fu Y., Li S., Zu Y., Yang G., Yang Z., Luo M., Jiangs S., Wink M. y Efferth T. 2009. Medicinal chemistry of paclitaxel and analogues. *Current Med. Chem.* 16: 1-20.
- Furmanowa M., Glowniak K., Syklovska-Baranek K., Zgórká G. y Józefczyk A. 1997. Effect of picloram and methyl jasmonate on growth and taxane accumulation in callus culture of *Taxus x media* var. *Hatfieldii*. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 49: 75-79.
- Gamborg O. L., Miller R.A. y Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cell. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.
- Gao L.M., Möller M., Zhang X.M., Hollingsworth M.L., Liu J., Mill R.R., Gibb M. y Li D.Z. 2007. High variation and strong phylogeographic pattern among cpDNA haplotypes in *Taxus wallichiana* (Taxaceae) in China and North Vietnam. *Mol. Ecol.* 16: 4684-4698.

- García-Aranda M. A., Estrada-Castillón E., Jurado-Ybarra E. y González-Uribe D. U. 2011. Análisis de once poblaciones naturales de *Taxus globosa* en la Sierra Madre Oriental. *Madera y Bosques*. 17: 93-104.
- Ge G.B., Zhang Y.Y., Hao D.C., Hu Y., Luan H.W. Liu X.B., He Y.Q., Wang Z.T. y Yang L. 2008. Chemotaxonomic study of medicinal *Taxus* Species with fingerprint and multivariate analysis. *Planta Med.* 74: 773-779.
- Gennari C., Carcano M., Donghi M., Mongelli N., Vanotti E. y Vulpetti A. 1997. Taxol Semisynthesis: A Highly Enantio- and Diastereoselective Synthesis of the Side Chain and a New Method for Ester Formation at C-13 Using Thioesters. *J. Org. Chem.* 62: 4746-4755.
- George E. F. 2008. Plant Tissue Culture Procedure – Background. En: George E. F., Hall M. A. y De Klerk G. J. (eds). *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3<sup>rd</sup> Edition. Springer The Netherlands. Pp. 1-28.
- George E. F. y Debergh P. C. 2008. Micropropagation: Uses and Methods. En: George E. F., Hall M. A. y De Klerk G. J. (eds). *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3<sup>rd</sup> Edition. Springer The Netherlands. Pp. 29-64.
- Ghafoori R., Bernard F., Abolmaali S. y Mousavi A. 2012. Improved effect of glutathione on the induction and growth of *Taxus baccata* L. callus. *Annals Biol. Res.* 3: 1726-1730.
- Gibson D.M., Ketchum R.E.B, Vance N.C. y Christen A.A. 1993. Initiation and growth of cell lines of *Taxus brevifolia* (Pacific yew). *Plant Cell Rep.* 12: 479-482.
- González M. V., Rey M., Tavazza R., Lamalfa S., Cuzzo L. y Ancora G. 1998. *In vitro* adventitious shoot formation on cotyledons of *Pinus pinea*. *Hort Sci.* 33: 749-750.
- Guénard D., Gueritte-Voegelein F. y Potier P. 1993. Taxol and taxotere: discovery, chemistry, and Structure-Activity Relationships. *Acc. Chem. Res.* 26: 160-167.
- Guerrero B., Castillo J., Aguilar M.I. y Delgado G. 2000. 5A,7B,9A,10B,13A-pentaacetoxy-4(20),11-Taxadiene (7B-acetoxy-taxusin) and other constituents from the bark of the mexican yew, *Taxus globosa* (Taxaceae). *J. Méx. Chem. Soc.* 44: 148-150.
- Guo B.H., Wang Y.C., Zhou X.W., Hu K., Tan F., Miao Z.Q. y Tang K .X. 2006. An endophytic Taxol-producing fungus BT2 isolated from *Taxus chinensis* var. *Afr. J. Biotechnol.* 5: 875-877.
- Gurbuz I., Erdemoglu N., Yesilada E. y Sener B. 2004. Anti-ulcerogenic lignans from *Taxus baccata* L. ©Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, Tübingen. Pp. 233-236.

## Establecimiento *in vitro* de *Taxus globosa* Schldl.

---

- Hao D.C., Huang B.L. y Yang L. 2008. Phylogenetic Relationships of the genus *Taxus* inferred from chloroplast intergenic spacer and nuclear coding DNA. *Biol. Pharm. Bull.* 31: 260-265.
- Hall R. D. 2000. Plant cell culture initiation. *Mol. Biotechnol.* 16: 161-173.
- Heining U. y Jennewein S. 2009. Taxol: A complex diterpenoid natural product with an evolutionarily obscure origin. *Afr. J. Biotechnol.* 8: 1370-1385.
- Heinstein P.F. y Chang C.J. 1994. Taxol. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45: 663-674.
- Hellwigs S., Drossard J., Twyman R. M. y Fischer R. 2004. Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nature Biotechnol.* 22: 1415-1422.
- Hicks G. S. 1994. Shoot induction and organogenesis *in vitro*: a developmental perspective. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 30: 10-15.
- Hien N.T.T., Khiem D.V., Vu N.H., Don N.T. y Nhut D.T. 2004. Primary study on the induction and growth of callus of *Taxus wallichiana* ZUCC., a valuable medicinal plant in lam dong province. *J. Agricul. Sci. Technol.* 4: 79-85.
- Hine-Gómez A. y Valverde-Cerdas L. 2003. Establecimiento *in vitro* de *Cryptomeria japonica* (Taxocidaceae). *Rev. Biol. Trop.* 51: 683-690.
- Hirasuna T.J., Pestchanker L.J., Srinivasan V. y Shuler M.L. Taxol production in suspension cultures of *Taxus baccata*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 44: 95-102.
- Holton R.A., Somoza C., Kim H.B., Liang F., Biediger R.J., Boatman P.D., Shindo M., Smith C.C., Kim S., Nadizadeh H., Suzuki Y., Tao C., Vu P., Tang S., Zhang P., Murthi K.K., Gentile L.N. y Liu L.H. 1994a. First total synthesis of Taxol. 1. Functionalization of the B Ring. *J. Am. Chem. Soc.* 116: 1597-1598.
- Holton R.A., Kim H.B., Somoza C., Liang F., Biediger R.J., Boatman P.D., Shindo M., Smith C.C., Kim S., Nadizadeh H., Suzuki Y., Tao C., Vu P. Tang S. Zhang P., Murthi K.K., Gentile L.N. y Liu J.H. 1994b. First total synthesis of taxol. 2. Completion of the C and D Rings. *J. Am. Chem. Soc.* 116: 1599-1600.
- Hongbo S., Shuiyuan J., Liye C., Changxing Z., Jinmin W., Biao L. y Qingjie G. 2006. A primary investigation on the eco-environmental improvement in the western China by the use of *in vitro* propagation techniques of *Taxus* (*Taxus media*). *Pak. J. Biol. Sci.* 9: 1995-1998.
- Huang L.C., Lee Y.L., Huang B.L., Kuo C.I. y Shaw J.F. 2002. High polyphenol oxidase activity and low titratable acidity in browning bamboo tissue culture. *In Vitro Cell Dev. Bio. Plant.* 38: 358-365.
- Hussain A., Qarshi I. A., Nazir H., Ullah I., Rashid M. y Shinwari Z. K. 2013. *In vitro* callogenesis and organogenesis in *Taxus wallichiana* Zucc. The Himalayan yew. *Pak. J. Bot.* 45: 1755-1759.

- Ibrahim O., Gercheva P., Nacheva L. e Ivanova V. 2011. Silver nitrate as an effective agent for *in vitro* surface-sterilization protocol of *Taxus baccata* shoot explants. *J. Mountain Agricul. Balkans*. 14: 894-906.
- Ibrahim O., Gercheva P., Nacheva L. y Ivanova V. Biotechnological approaches for propagation of *Taxus baccata* L. and endangered plant with important ornamental and pharmaceutical value. Proceedings of fourth International Symposium " Ecological approaches towards the production of safety food ". 09 June, 2011, Ploudiv, Bulgaria. Pp 111-116.
- Jenkins P.R. 1996. The synthesis of taxoids from glucose. *Pure Appl. Chem*. 68: 771-774.
- Jennewein S. y Croteau R. 2001. Taxol: biosynthesis, molecular genetics, and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 57: 13–19.
- Jiaru L., Manxi L., Huirong C., Zhenbin W. y Junjian W. 1999. Callus initiation and subculture of *Taxus chinensis*. *J. For. Res*. 10: 11-14.
- Kane M.E. 2000. Propagation from preexisting meristems. En: Trigiano R.N. y Gray D.J. (eds), *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises 2<sup>da</sup> Edición*. CRC Press LLC Boca Ratón, Florida. Pp. 75-86.
- Karimian R., Lahouti M. y Davarpanah S. J. 2014. Effects of different concentrations of 2,4-D and kinetin on callogenesis of *Taxus brevifolia* nutt. *J. Appl. Biotechnol. Rep*. 1: 167-170.
- Ketchum R.E.B., Gibson D.M. y Greenspan G. 1995. Media optimization for maximum biomass production in cell cultures of pacific yew. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult*. 42: 185-193.
- Ketchum R.E.B. y Gibson D.M. 1996. Paclitaxel production in suspension cell cultures of *Taxus*. *Plant Cell Tiss Org. Cult*. 46: 9-16.
- Ketchum R.E.B., Wherland L. y Croteau R.B. 2007. Stable transformation and long-term maintenance of transgenic *Taxus* cell suspension cultures. *Plant Cell Rep*. 26: 1025-1033.
- Khosroushahi A. Y., Naderi-Manesh H. y Simonsen H. T. 2011. Effect of Antioxidants and carbohydrates in callus cultures of *Taxus brevifolia*: evaluation of browning, callus growth, total phenolics and paclitaxel production. *BiolImpacts* 1:37-45.
- Kingston D.G.I., Gunatilaka A.A.L. y Ivey C.A. 1992. Modified taxols a method for the separation of taxol and cephalomannine. *J. Nat. Prod*. 55: 259-261.
- Krauze-Baranowska M. y Wiwart M. 2003. Antifungal activity of biflavones from *Taxus baccata* and *Ginkgo biloba*. ©Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, Tübingen. Pp. 65-69.

- Kulkarni A. A. y Krishnamurthy K. V. 2009. Contamination control and enhanced axillary budding from mature explants of *Taxus baccata* ssp. *wallichiana*. En Kumar A. Shekhawat N. S. (eds), Plant tissue culture and molecular markers. I.K. International Publishing Put. Ltd., Nueva Delhi, India. Pp. 1-28.
- Kusama H., Hara R., Kawahara S., Nishimori T., Kashima H., Nakamura N., Morihira K., y Kuwajima I. 2000. Enantioselective total synthesis of (-)-taxol. *J. Am. Chem. Soc.* 122: 3811-3820.
- Lan W.Z., Yu L.J., Li M.Y. y Qin W.M. 2003. Cell death unlikely contributes to taxol production in fungal elicitor-induced cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. *Biotechnol. Lett.* 25: 47-49.
- Lesney M.S. 2004. Natural products from plants remain at the core of modern medicinal chemistry. Today's Chemistat Work. Julio Pp. 26-32.
- Li J., Davis C.C., Del Tredici P. y Donogue M.J. 2001. Phylogeny and Biogeography of *Taxus* (Taxaceae) inferred from sequences of the internal transcribed spacer region of nuclear ribosomal DNA. ©*President and Fellows of Harvard College*. Pp. 267-274.
- Li Z., Duan S., Kong J., Li S., Li Y. y Zhu Y. 2007. A single genetic locus in chromosome 1 controls conditional browning during the induction of calli from mature seeds of *Oryza sativa* ssp. *Indica*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 89: 237-245.
- Liao Z., Gong Y., Pi Y., Chen M., Tan Q., Tan F., Sun X. y Tang K. 2006a. Rapid and efficient *in vitro* germination of embryos from *Taxus media* Rehder. *Asian J. Plant Sci.* 5: 139-141.
- Liao Z., Chen M., Sun X. y Tang K. 2006b. Micropropagation of endangered plant species. Plant Cell Culture Protocols. Second Edition. En Loyola-Vargas V. M. y Vázquez-Flota F. (eds). © Humana Press Inc., Totowa, NJ. Pp. 179-185.
- Liguo F., Li-Kuo F., Nan L. y Mill R.R. 1999. Taxaceae. *Flora of China*. 4: 89-96.
- Liu X., Dong M., Chen X., Jiang M., Lv X. y Zhou J. 2008. Antimicrobial activity of an endophytic *Xylaria* sp. YX-28 and identification of its antimicrobial compound 7-amino-4methylcoumarin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78: 241-247.
- Lloyd G. y McCown B. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by the use of shoot-tip culture. *Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 30 : 421-427.
- López-Upton J. y García-Martí X. 2015. *Taxus globosa* Schldl. (Taxaceae). Distribution and diagnosis of an endangered yew. *Earth Sci.* 4: 80-88.
- Luan E. C., Allen S. E. y Bolyard M.G. 2006. Transient Gus in zygotic embryos of *Taxus brevifolia*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 32: 81-85.

- Luo J.P., Mu Q. y Gu Y.H. 1999. Protoplast culture and paclitaxel production by *Taxus yunnanensis*. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 59: 25-29.
- Luo J., Liu L. y Wu C.D. 2001. Enhancement of paclitaxel production by abscisic acid in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. *Biotechnol. Lett.* 23: 1345-1348.
- Ma Z.Y., Yuan Y. J., Wu J. C. y Zeng A.P. 2002. Apoptotic cell death in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei*. *Biotechnol. Lett.* 24: 573-577.
- Mahdinejad N., Fakheri B. A. y Ghanbari S. 2015. Effects of growth regulators on *in vitro* callogenesis of *Taxus baccata* L. *Biol. Forum. Inter. J.* 7: 142-145.
- Maheshwari P., Garg S. y Kumar A. 2008. Taxoids: Biosynthesis and *in vitro* production. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* 3: 71-87.
- Majada J. P., Sierra M. I. y Sánchez-Tamés R. 2000. One step more towards taxane production through enhanced *Taxus* propagation. *Plant Cell Rep.* 19: 825-830.
- Malik S., Cusidó R. M. Mirjalili M. H., Moyano E., Palazón J. y Bonfill M. 2011. Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: A review. *Proc. Biochemis.* 46: 23-34.
- Malik C. P., Garg P., Singh Y. y Grover S. 2012. Medicinal use, chemical constituents and micropropagation of three potential medicinal plants. *Int. J. Life Sci. Pharma Res.* 2: 57-76.
- Mann J. 2002. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. *Nature.* 2: 143-148.
- Martínez P.C., Harry I.S. y Torpe T.A. 1991. *In vitro* regeneration of plantlets of Canary Island pine. *Acta Hort.* 289: 131-132.
- Mihaljević S., Bjedov I., Kovač M., Levanić D. L. y Jelaska S. 2002. Effect of Explant Source and Growth Regulators on *in vitro* Callus Growth of *Taxus baccata* L. Washingtonii. *Food Technol. Biotechnol.* 40: 299-303.
- Mirjalili N. y Linden J.C. 1996. Methyl jasmonate induced production of taxol in suspension cultures of *Taxus cuspidata*: ethylene interaction and induction models. *Biotechnol. Prog.* 12: 110-118.
- Mistrzak P., Celejewska-Marciniak H., Szpula W. J., Olszowska O. y Kiss A.K. 2015. Identification and quantitative determination of piroresinol in *Taxus x Media* Rehder. needles, cell suspension and shoot cultures. *Acta Soc. Bot. Pol.* 84 125-132.

- Möller M., Gao L. M., Mill R. R., Li D. Z., Hollingsworth M. L. y Gibby M. 2007. Morphometric analysis of the *Taxus wallichiana* complex (Taxaceae) based on herbarium material. *Bot. J. Linnean Soc.* 155: 307-335.
- Morihira K., Hara R., Kawahara S., Nishimori T, Nakamura N., Kusama H., y Kuwajima I. 1998. Enantioselective total synthesis of taxol. *J. Am. Chem. Soc.* 120: 12980-12981.
- Muñoz-Gutiérrez L., Vargas-Hernández J. J., López-Úpton J., Soto-Hernández M. 2009. Effect of cutting age and substrate temperature on rooting of *Taxus Globosa*. *New Forests.* 38: 187-196.
- Murashige T. y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-479.
- Naill M.C. y Roberts S.C. 2005. Culture of isolated single cells from *Taxus* suspensions for the propagation of superior cell populations. *Biotechnol. Lett.* 27: 1725–1730.
- Namdeo A.G. 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A Review. *Pharma. Rev.* 1:69-79.
- Nan D., Zhe X., Bing H., Lijuan H., Shaomei L. y Chunyan Y. 2015. Optimization of callus induction and subculture conditions of *Taxus chinensis*. *JPSI.* 4: 33-35.
- Nhut D.T., Hien N.T.T., Don N.T. y Khiem D.V. 2007. *In vitro* shoot development of *Taxus wallichiana* Zucc. A valuable medicinal plant. En: Jain S.M. y Häggman H. (eds). Springer. The Netherlands. Pp. 107-116.
- Nhut D. T., Nguyen P. L.H., Don N.T., Hien N.T.T., Huy N.P., Nam N.B., Vinh B.T. y Luan T. C. 2014. Induction, growth and paclitaxel content of needle and petiole derived calli in Himalayan yew (*axus wallichiana* Zucc.) under light-emitting diodes. *Acta Biol. Cracovien.* 56:1-8.
- Niedz R.P. y Bausher M.G. 2002. Control of *in vitro* contaminations of explants from greenhouse – and field-grown trees. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 38: 468–471.
- Nicolaou K.C., Yang Z. Liu J.J., Ueno H., Nantermet P.G., Guy R.K., Claiborne C. F., Renaud J., Couladouros E. A., Paulvannan K. y Sorensen F. J. 1994. Total synthesis of taxol. *Nature.* 367: 630-634.
- Nisar M., Khan I., Simjee S.U., Gilani A.H., Obaidullah y Perveen H. 2008. Anticonvulsant, analgesic and antipyretic activities of *Taxus wallichiana* Zucc. *J. Ethnopharmacol.* 116: 490-494.
- Oberlies N.H. y Kroll D.J. 2004. Camptothecin and Taxol: historic achievements in natural products research. *J. Nat. Prod.* 67: 129-135.
- Okada K., Tachibana S. y Shiraishi M. 2004. Electron microscopic observation of

- plastid containing taxol-like substances in callus cells of *Taxus cuspidata* var. *Nana*. *Pak. J. Biol. Sci.* 7: 2139-2148.
- Olędska H., Gajdzis-Kuls D., Gaska A., Stefańska K., Bogdanowicz A., Mistrzak P. y Olszowska O. 2009. Paclitaxel and cephalomannine in *in vitro* cultures of *Taxus cuspidata* Sieb. et. Zucc. Shoots and plantlets. *Herba. Pol.* 55: 231-236.
- Pan M.J. y Van Staden J. 1998. The use of charcoal in *in vitro* culture – A review- *Plant Growth Reg.* 26: 155–163.
- Pant D.D. 2000. Inclusion of Taxaceae in a separate order, Taxales. *Curr Sci.* 79: 278-279.
- Pant B. 2014. Application of plant cell and tissue culture for the production of phytochemicals in medicinal plants. En: Adhikari R. y Thapa S. (eds.) Infectious diseases and nanomedicine II. Springer India Pp 25-39.
- Pérez N., Barbón R., Capote A., Jiménez E. y Wilken D. 2004. Producción de taxoides en callos y suspensiones celulares de *Taxus chinensis* mediante el uso de elicitores abióticos. *Biotechnol. Veg.* 4: 171-176.
- Pinto-Sintra A.L. 2007. Establishment of embryogenic cultures and plant regeneration in the Portuguese cultivar 'Touriga Nacional' of *Vitis vinifera* L. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 88: 253–265.
- Pouvelle B., Farley P.J., Long C.A. y Taraschi T.F. 1994. Taxol arrests the development of blood-stage *Plasmodium falciparum in vitro* and *Plasmodium chabaudi adami* in malaria-infected mice. *J. Clinical Inves.* 94: 413-417.
- Ramírez-Sánchez S. E., López-Uptón J., García-De los Santos G., Vargas-Hernández J. J. Hernández-Livera A. y Ayala-Garay O. J. 2011. Variación morfológica de semillas de *Taxus globosa* Schtdl. Provenientes de dos regiones geográficas de México. *Rev. Fitotecnica Mexicana.* 34 93-99.
- Ramos-Lobato N.A., Soto-Hernández M., Zavala-Chávez F. y Rodríguez-González M.T. 2003. Taxoides en el Follaje del Tejo Mexicano (*Taxus globosa* Schelecht). *Revista Chapingo Serie Horticultura.* 9: 29-38.
- Renneberg R. 2007. Yew trees, paclitaxel synthesis and fungi. *Biotechnol. J.* 2: 1207-1209.
- Rivera-Orduña F.N., Suárez-Sánchez R.A., Flores-Bustamante Z.R., Gracida-Rodríguez J.N. y Flores-Cotera L.B. 2010. Diversity of endophytic fungi of *Taxus globosa* (Mexican yew). *Fungal Diversity.* DOI10.1007/s13225-010-0045-1.
- Rivero-Maldonado G.C., Ramírez-Villalobos M. del C. y León-de-Sierralta S. 2001. Tipo de explante en el establecimiento *in vitro* del guanábano (*Annona muricata* L.). *Rev. Fac. Agron. (LUZ).* 18: 258-265.
- Roberts S.C., Naill M., Gibson D.M. y Shuler M.L. 2003. A simple method for



## Establecimiento *in vitro* de *Taxus globosa* Schldl.

---

- enhancing paclitaxel release from *Taxus Canadensis* cell suspension cultures utilizing cell wall digesting enzymes. *Plant Cell Rep.* 21:1217-1220.
- Sabater-Jara A. B., Tudela L. R. y López-Pérez A.J. 2010. *In vitro* culture of *Taxus* sp.: strategies to increase cell growth and taxoid production. *Phytochem. Rev.* 9: 343-356.
- Sapam S. y Laishram J. M. 2012. *In vitro* micropropagation of english yew (*Taxus baccata* L.) from Manipur, India. *NeBIO.* 3: 12-15.
- Schenk R.U. y Hildebrandt A. C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50: 199-204.
- Schiff P.B., Fant J. y Horwitz S. B. 1979. Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol. *Nature.* 277: 665-667.
- Schiff P.B. y Horwitz S.B. 1980. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77: 1561-1565.
- Schwartz O.J. y Beaty R. M. 2000. Organogenesis. En : Trigiano R.N. y Gray D.J. (eds), *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises* 2<sup>da</sup> Edición. CRC Press LLC Boca Ratón, Florida. Pp. 125-137.
- Schwentner O. 2008. Supervivencia y crisis del tejo (*Taxus baccata* L.) en el área cantábrica. II Jornades sobre el teix a la Mediterrània occidental. Pp 35-40.
- Shang G.M., Wu J.C. y Yuan Y.J. 2004. Improved cell growth and taxol production of suspension cultured *Taxus chinensis* var. *mairei* in alternating and direct current magnetic fields. *Biotechnol. Lett.* 26: 875-878.
- Sharma H. y Garg M. 2015. A review of traditional use, phytoconstituents and Biological activities of Himalayan yew, *Taxus wallichiana*. *J. Integr. Med.* 13: 80-90.
- Shemluck M.J., Estrada E., Nicholson R. y Brobst S.W. 2003. A preliminary study of the taxane chemistry and natural history of the mexican yew, *Taxus globosa* Schldl. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 72: 119-127.
- Sidhu Y. 2010. *In vitro* micropropagation of medicinal plants by tissue culture. *Plymouth Stud. Sci.* 4: 432-449.
- Son S.H., Choi S.M., Lee Y.H., Choi K.B., Yun S.R., Kim J.K., Park H.J., Kwon O. W., Noh E.W., Seon J.H. y Park Y.G. 2000. Large-scale growth and taxane production in cell cultures of *Taxus cuspidata* (Japanese yew) using a novel bioreactor. *Plant Cell Rep.* 19: 628-633.
- Soto M., Sanjurjo M., González M.T. Cruz D. y Giral F. 2000. El Tejo mexicano (*Taxus globosa* Sch.) Potencial de su aprovechamiento en Taxol. *Ciencia Ergo Sum.* 7: 277-279.

- Soto-Hernández M., López-Upton J., Vargas-Hernández J. J., Muñoz-Gutiérrez L. y San Miguel-Chávez R. 2011. Estado de conservación de *Taxus globosa* en México. *S. J. Rural Development*. 2: 61-68.
- Spjut R.W. 2007a. A phylogeographical analysis of *Taxus* (Taxaceae) based on leaf anatomical characters. *J. Bot. Res. Inst. Texas*. 1: 291-332.
- Spjut R.W. 2007b. Taxonomy and nomenclature of *Taxus* (Taxaceae). *J. Bot. Res. Inst. Texas*. 1: 203-289.
- Sun X. y Linden J.C. 1999. Shear stress effects on plant cell suspension cultures in a rotating wall vessel bioreactor. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 22: 44-47.
- Syklowska-Baranek K. y Furmanowa M. 2005. Taxane production in suspension culture of *Taxus x media* var. *Hicksii* carried out in flasks and bioreactor. *Biotechnol. Lett.* 27: 1301-1304.
- Tabata H. 2004. Paclitaxel production by plant cell culture technology. *Adv. Biochem Engin. Biotechnol.* 7: 1-23.
- Tang C.W., Zalat E. y Mavituna F. 2001. Initiation, growth and immobilisation of cell cultures of *Taxus* spp. for paclitaxel production. En Hofman M. y Thonart P. (eds) Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. Pp. 429-448.
- Tang W. y Newton R.J. 2005. Plant regeneration from callus cultures derived from mature zygotic embryos in white pine (*Pinus strobus* L.). *Plant Cell Rep.* 24: 1-9.
- Tapia N., Zamilpa A., Bonfill M., Ventura E., Cruz-Vega D., Del Villar A., Cruz-Sosa F. y Osuna L. 2013. Effect of the culture medium and biotic stimulation on taxane production in *Taxus globosa* Schltdl. *in vitro* cultures. *Acta Physiol. Plant.* 35:3447-3455.
- Thomas T. D. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotech. Adv.* 26: 618-631.
- Toulabi S.B., Moieni A., Ghanati F. y Emami F. 2015. Investigation of the effects of the basal medium, auxin and antioxidants on the induction and maintenance of callus and taxol production in yew (*Taxus baccata*). *J. Adv. Biol. Biotech.* 3: 58-67.
- Trejo-Tapia G. y Rodríguez-Monroy M. 2007. La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales *in vitro*. *Interciencia.* 32: 669-674.
- Vanisree M., Lee C.Y., Lo S.F., Nalawade S.M., Lin C.Y. y Tsay H.S. 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45: 1-22.

- Van Rozendaal E. L. M. Kurstjens S. J. L., Van Beek T. A. y Van Den Berg R. G. 1999. Chemotaxonomy of *Taxus*. *Phytochemistry*. 52: 427-433.
- Vargas R., Flores-Cotera L.B., Maldonado F., Flores Z.R., Pérez R.M. 2007. Relaxant and antispasmodic effect in isolated guinea pig ileum treated with extracts of *Xylaria* sp. An endophytic fungus of the mexican yew, *Taxus globosa*. *Pharmacologyonline*. 2: 134-145.
- Veeresham C. y Chitti P. 2013. Therapeutic agents from tissue cultures of medicinal plants. *Nat. Prod. Chem. Res.* 1: 1-5.
- Walji A.M. y MacMillan D.W.C. 2007. Strategies to bypass the taxol problem enantioselective cascade catalysis, a new approach for the efficient construction of molecular complexity. © Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York. 10: 1477-1489.
- Wall M.E. y Wani M.C. 1977. Antineoplastic agents from plants. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 17: 117-132.
- Wall M.E. y Wani M.C. 1995. Camptothecin and taxol: discovery to Clinic-Thirteenth Bruce F. cain memorial award lecture. *Can. Resear.* 55: 753-760.
- Walsh V. y Goodman J. 2002. From taxol to taxol: The changing identities and ownership of an anti-cancer drug. *Med. Anthropol.* 21: 307-336.
- Wani M.C., Taylor H.L., Wall M.E, Coggan P. y McPhail A.T. 1971. Plant Antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* 93: 2325-2327.
- Wang C., Wu J. y Mei X. 2001. Enhanced taxol production and release in *Taxus chinensis* cell suspension cultures with selected organic solvents and sucrose feeding. *Biotechnol. Prog.* 17: 89-94.
- Wang Z.Y. y Zhong J.J. 2002. Repeated elicitation enhances taxane production in isuspension cultures of *Taxus chinensis* in bioreactors. *Biotechnol. Lett.* 24: 445-448.
- Wang J.W., Zheng L.P. y Tan R.X. 2007. Involvement of nitric oxide in cerebroside induced defense responses and taxol production in *Taxus yunnanensis* suspension cells *Appl Microbiol Biotechnol.* 5: 1183-1190.
- Wender P.A. y Mucciari T.P. 1992. A new and practical approach to the Synthesis of taxol and taxol analogues: the pinene. *J. Am. Chem. Soc.* 114: 5878-5879.
- Wickremesinha E.R.M. y Arteca R.N. 1993. *Taxus* callus cultures: Initiation, growth optimization, characterization and taxol production. *Plan Cell, Tis Org Cul* 35: 181-193.

- Yamamoto S., Hayashi S., Furusaki S. y Shioya S. 2015. %-aminolevulinic acid promotes callus growth and paclitaxel production in high-grown *Taxus cuspidata* suspension cultures. *Eng. Life Sci.* 15: 116-121.
- Yared J.A. y Tkaczuk K.H.R. 2012. Update on taxane development: new analogs and new formulations. *Drug Design, Development and Therapy.* 6: 371-384.
- Yoshida M., Muranaka T., Itoh K. y Tachibana S. 2002. Stimulation of the Production of taxol by oligosaccharides in *Taxus cuspidata* variety nana callus cultures. *Pak. J. Biol. Sci.* 5: 461-465.
- Yuan Y.J., Ma Z.Y., Wu J.C. y Zeng A.P. 2002. Taxol-induced apoptotic cell death in suspension cultures of *Taxus cuspidate*. *Biotechnol. Lett.* 24: 615-618
- Yukimune Y., Tabata H., Higashi Y. y Hara Y. 1996. Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. *Nature Biotechnol.* 14: 1129-1132.
- Zamudio R.S. 1992. "Familia Taxaceae" Flora del Bajío y de sus regiones adyacentes. Instituto de Ecología A.C. Centro Regional del Bajío. *Patzcuaro Fascículo 9* Pp. 1-6.
- Zarek M. 2007. A practical method for overcoming the dormancy of *Taxus baccata* isolated embryos under *in vitro* conditions. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 43: 623-630.
- Zavala-Chávez F., Soto-Hernández M. y Rodríguez-González M.T. 2001. El romerillo (*Taxus globosa* Schlecht.): Biología, dificultades y Perspectivas de su uso. *Revista Chapingo Serie Horticultura.* 7: 77-94.
- Zavala-Chávez F. 2001. Análisis demográfico preliminar de *Taxus globosa* Schlecht. en el Parque Nacional El Chico, Hidalgo, México. I: Población de adultos y algunas características del hábitat. *Ciencia Ergo Sum* 8: 169-174.
- Zhang C.H. y Xu H.B. 2001. Improved paclitaxel production by *in situ* extraction and elicitation in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. *Biotechnol. Lett.* 23: 189-193.
- Zhiri A., Jaziri M., Homes J., Vanhaelen M. y Shimomura K. 1994. Factors affecting the *in vitro* rapid germination of *Taxus* embryos and the evaluation of taxol content in the plantlets. *Plant Cell, Tiss. Org. Cul.* 39: 261-263.
- Zhong J.J., Pan Z.W., Wang Z.Y., Wu J.Y., Chen F., Takagi M. y Yoshida T. 2002. Effect of mixing time on taxoid production using suspension cultures of *Taxus chinensis* in a centrifugal impeller bioreactor. *J.Biosci. Bioenginner.* 94: 244-250.
- Zwawiak J. y Zaprutko L. 2014. A brief history of taxol. *J. Med. Sci.* 83: 47-52.