



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Producción de células transformadas genéticamente
estables de *Taxus globosa*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

(B I Ó L O G A)

P R E S E N T A:

ARACELY ARANDAL MARTÍNEZ

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. IRMA BERNAL LUGO

2009





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Datos del Jurado.

Datos del alumno.

Arandal

Martínez

Aracely

58-82-79-71

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología.

300233034

Datos del tutor.

Dra. en Ciencias Químicas (Bioquímica)

Irma

Bernal

Lugo

Datos del Sinodal 1

Doctor

Víctor Manuel

Chávez

Ávila

Datos del Sinodal 2

Doctora

Patricia

Guevara

Fefer

Datos del Sinodal 3

Doctora

Josefina

Herrera

Santoyo

Datos del Sinodal 5

Doctor

Elpidio

García

Ramírez

Datos del Trabajo escrito.

“Producción de células transformadas genéticamente estables de *Taxus globosa*”.

92 páginas

2009.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional para Ciencia y Tecnología por el financiamiento otorgado a esta investigación través del proyecto CONACYT-CONAFOR-2005-14739 “Producción de taxol *in vitro* de *Taxus globosa*”

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del conjunto E del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM. La dirección estuvo a cargo de la Dra. Irma Bernal Lugo y se contó con la asesoría de la M. en C. María Teresa de Jesús Olivera Flores.

La parte del trabajo correspondiente a la identificación de proteínas, se realizó en el Laboratorio 114, bajo la asesoría del Dr. Octavio Guerrero Andrade y el Dr. Elpidio García Ramírez.

DEDICATORIAS.

A mi padre, a quien admiró profundamente y con su ejemplo me enseñó el significado de la responsabilidad y la superación.

A mi madre por nunca dejarme renunciar y hacer que siempre me esforzara

A los dos los amo y les agradezco todas las oportunidades y el amor que me han dado. Este es su logro

A mis hermanos Karina y Ricardo quienes han sido un ejemplo para mí. Los quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

A Mayte por su apoyo y comprensión, pero sobretodo por haberme brindado su amistad y confianza.

Al Dr. Pilo y a Tavo por su valiosa ayuda y colaboración para poder terminar este trabajo.

A la Dra. Bernal por haberme dado la oportunidad de participar en este proyecto.

A Luis, quien siempre creyó en mí, por el amor, el cariño y el placer de compartir y cumplir mis sueños que ahora también son tuyos.

A mis compañeros de laboratorio: Rocío, Javier, Iván, Innan, Mony, Mary, Yadith, Manuel y Carlos por todos los buenos y malos momentos que compartimos y por haber hecho que mi estancia en el laboratorio fuera más agradable.

A mis amigos de toda la vida: Víctor, Lore, Bere, Angel y Ricardo por todas las gratas experiencias compartidas y que pese a la distancia y las diferencias han estado conmigo, mostrándome el significado de la amistad.

A mi mejor amigo Ricardo por alentarme a seguir adelante y estar conmigo siempre.

A mi tía Xochitl por creer en mí y ser una gran amiga.

En fin a todas las personas que de manera directa o indirecta contribuyeron a la realización de este trabajo.

INDICE

I) RESUMEN	1
II) INTRODUCCIÓN	2
III) ANTECEDENTES	4
3.1 Generalidades de <i>Taxus globosa</i> Schlecht	4
3.1.1 Clasificación taxonómica	5
3.1.2. Descripción botánica	6
3.1.3 Distribución geográfica de <i>Taxus globosa</i> Schlecht	7
3.1.4 Hábitat	8
3.1.5 Usos tradicionales	8
3.2 Síntesis y producción de Taxol	10
3.3 Cultivo de tejidos vegetales	12
3.3.1 Cultivo de callos	14
3.3.2 Cultivo de células en suspensión	16
3.3.3 Cultivo celular de <i>Taxus spp</i>	17
3.4. Transformación genética de plantas	19
3.4.1 Genes de informadores o reporteros	22
3.4.2 Selección con herbicidas	24
3.4.3 Selección con el antibiótico higromicina	26
3.5 Métodos de transformación genética en plantas	27
3.5.1 El sistema de <i>Agrobacterium spp</i>	29
3.5.2 Bombardeo de micropartículas	32

3.5.3 Transformación genética de <i>Taxus spp</i>	34
IV) JUSTIFICACIÓN	36
V) OBJETIVOS	37
5.1 Objetivo general	37
5.2 Objetivos específicos	37
VI) MATERIALES Y MÉTODOS	38
6.1. Ruta crítica	38
6.2 Material biológico	39
6.2.1 Método de desinfección	39
6.3 Preparación de medios de cultivo	40
6.3.1 Selección de medios de cultivo	40
6.4 Determinación de las curvas de crecimiento de los callos y células en suspensión de <i>Taxus globosa</i>	42
6.5 Determinación de la concentración del glufosinato de amonio e higromicina	42
6.6 Transformación genética por biobalística	43
6.7 Preparación de balas con ADN para la transformación genética por biobalística	43
6.8 Bombardeo de callos y explantes de <i>Taxus globosa</i> con pistola de baja presión	44
6.9 Prueba de expresión transitoria de <i>gus</i>	47
6.10 Western blot	47
6.11 Transformación con <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	48
VII) RESULTADOS	49
7.1 Desinfección de explantes	49

7.2 Selección de medios de cultivo	50
7.3 Inducción, proliferación y mantenimiento de los cultivos de <i>Taxus globosa</i>	50
7.4 Determinación de las curvas de crecimiento de los callos y de <i>Taxus globosa</i>	52
7.5 Determinación de la dosis letal 50% de glufosinato de amonio en los cultivos celulares de <i>Taxus globosa</i>	53
7.6 Determinación de la dosis letal 50% de higromicina	55
7.7 Transformación genética por biobalística	55
7.8 Prueba de expresión transitoria de <i>gus</i>	56
7.9 Identificación de la proteína β -glucoronidasa en callos de <i>T. globosa</i>	59
7.10 Observación de la proteína verde fluorescente	60
7.11. Transformación genética por medio de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	61
VIII) DISCUSIÓN	63
8.1 Desinfección de explantes	63
8.2 Selección de medios de cultivo	63
8.3 Inducción, proliferación y mantenimiento de los cultivos de <i>Taxus globosa</i>	64
8.4 Determinación de las curvas de crecimiento de los callos y células en suspensión de <i>Taxus globosa</i>	66
8.5 Determinación de la dosis letal 50 %de glufosinato de amonio e higromicina	67
8.6. Transformación genética de <i>Taxus globosa</i>	69
IX) CONCLUSIONES	75
X) ANEXOS	76
XI) BIBLIOGRAFÍA	87

I. RESUMEN

La producción biotecnológica de metabolitos secundarios en cultivos celulares de plantas provee una alternativa atractiva para incrementar el contenido de productos de interés farmacéutico. Uno de ellos, cuya importancia radica en su actividad antineoplásica es el paclitaxol (Taxol®), producido de forma natural en árboles de la familia Taxaceae. Sin embargo, su obtención a partir de las fuentes naturales es costosa por la dificultad que representa su extracción y el bajo contenido del mismo, por lo que una alternativa ante esta limitante es utilizar como fuente del paclitaxol cultivos celulares productores de este antineoplásico, lo cual implica sistemas celulares prolíferos capaces de ser transformados genéticamente. Por lo tanto el objetivo de este trabajo fue obtener la producción de células vegetales transformadas genéticamente de *T. globosa* Schl a partir de explantes de acículas y tallo. Se logró establecer cultivos celulares sólidos y líquidos, los cuales se caracterizaron en cuanto a su cinética de crecimiento. Se determinaron las dosis letales de los agentes de selección; higromicina y glufosinato de amonio. La transformación se llevó a cabo utilizando los plásmidos pCambia 1302 para Biobalística y pEarlygate103 para *Agrobacterium tumefaciens*, ambos plásmidos contienen el promotor constitutivo 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor y al gen reportero *gfp*, por medio del cual se identificaron las células transformadas. Se lograron estandarizar las condiciones de transformación para las células en suspensión de *Taxus globosa* en ambos sistemas.

II. INTRODUCCIÓN

Las plantas producen una gran variedad de metabolitos secundarios en comparación con otros sistemas biológicos, que históricamente han sido usados en la industria farmacéutica, alimentaria, cosmética y química.

Hasta ahora el número total de metabolitos secundarios de plantas excede los 22,000 de los cuales diversos compuestos han sido usados directamente como fármacos. Sin embargo un gran número de compuestos con estructura química compleja no pueden ser explotados de manera natural a gran escala debido a los altos costos de producción y el bajo rendimiento de los ingredientes activos. Ejemplo de lo anterior y cuya importancia radica en su actividad antineoplásica es el paclitaxol (Taxol®), un diterpeno que se produce en forma natural en la corteza de los árboles del género *Taxus*, siendo las especies más utilizadas *T. baccata* en Europa, *T. brevifolia* en Estados Unidos y *T. yunnanensis* en China (Tabata, 2006 y Wani *et al.*, 1971).

En México, el género *Taxus* se encuentra representado por su única especie *T. globosa*, la cual está catalogada como una especie en peligro de extinción por la NOM-ECOL-059-2001. Existen pocos estudios de esta especie que enfoquen su interés al paclitaxol. Aunque se sabe que cuenta con mayores cantidades de paclitaxol (0.01 % en peso seco de follaje) en comparación con otras especies como *T. baccata*, *T. brevifolia*, *T. cuspidata* y *T. media*, lo que le da un particular interés, debido a que la extracción de este fármaco se haría del follaje y no de la corteza, lo cual contribuiría enormemente a su conservación (Soto *et al.*, 2000). Sin embargo, su purificación de esta fuente resulta incosteable por la gran cantidad de aceites y fenoles presentes en el tejido.

El cultivo de tejidos vegetales es una atractiva tecnología, para resolver los problemas de producción de metabolitos secundarios. La aplicación de la ingeniería genética a este sistema, abre numerosas posibilidades no solo para la producción a gran escala de

compuestos químicos naturales de manera continua y estable, sino también a través del uso de transgenes permitiendo la sobreexpresión de los genes involucrados en la síntesis de los compuestos químicos en líneas celulares.

El progreso en la transformación genética de *Taxus* spp. no solo provee la posibilidad de transformar de manera estable células de *Taxus* spp. también proporciona un sistema para caracterizar nuevos genes relacionados con el metabolismo del paclitaxol (Vongpaseuth y Roberts, 2007a). Sin embargo, se ha encontrado que la optimización de los parámetros de transformación es altamente dependiente de la línea celular, por lo que la estandarización de éstos en los cultivos de *Taxus globosa* es indispensable para su aprovechamiento.

Por lo anterior, el objetivo general de este trabajo fue establecer un protocolo de transformación para la producción de células transformadas genéticamente de *Taxus globosa*.

III. ANTECEDENTES

3.1 Generalidades de *Taxus globosa*

Taxus globosa fue descrita por primera vez por el botánico alemán Diederich Franz Leonhard von Schlechtendal en 1838 a partir de material colectado por Christian Ehrenberg. Schlechtendal describió la planta como un árbol de 20 pies que crecía cerca de Huajolote, México y que presentaba semillas en el mes de Septiembre. En su descripción, Schlechtendal consideró al tejo mexicano muy similar al tejo Europeo (*Taxus baccata*), pero con diferencias morfológicas en el fruto, manifestando que el del primero era más esférico y comprimido y que estas diferencias eran más evidentes en los frutos jóvenes (Melvin *et al.*, 2003).

En México sólo se conoce una especie representando al género *Taxus*: *Taxus globosa* Schlecht, conocida comúnmente como granadillo, romerillo, palmira, tejo, tlatscal (Zamudio, 1992). Es una de las cuatro especies de *Taxus* existentes en América y su status no ha sido esclarecido, debido a la falta de información en nuestro país. Actualmente se encuentra catalogada como especie rara en las listas oficiales de la Norma Oficial Mexicana, por lo tanto se trata de una planta cuya población es biológicamente viable, pero escasa de manera natural, pudiendo estar restringida a un área reducida muy específica (Zavala-Chávez, 2002).

Un análisis demográfico preliminar realizado en el Parque Nacional el Chico, Hidalgo, México concluye que existen 2.3 ejemplares juveniles por cada adulto masculino y 5.3 por cada adulto femenino que pueden permanecer en fase juvenil hasta más de 18 años con estos datos es difícil argumentar sobre el carácter raro o de riesgo de *T. globosa* en el área. (Zavala-Chávez, 2002).

La escasez de *T. globosa* ha llamado la atención debido a que aparentemente es un recurso genético que puede estar en peligro, en caso de que no se logre su conservación *ex situ* o se promueva su permanencia *in situ*. (Zavala-Chávez, 2002).

Aunque los aspectos biológicos básicos de esta especie, tales como: ciclo reproductivo, mecanismos de dispersión y los agentes específicos involucrados o su dinámica poblacional son poco conocidos, estudios sobre la propagación de esta especie reportan que de manera asexual (estacas), al haber aplicado 10,000 ppm de Acido Indolbutirico (AIB) en la parte basal de las estacas, se logró hasta un 89.9% de emisión de raíces. Además la propagación vía sexual (semillas) se ve favorecida cuando las semillas se almacenan en un ambiente húmedo durante 5 meses a 23°C y después a 2°C por tres meses para finalmente sembrarlas, tratamiento con el cual se ha logrado un 34% de germinación. Sin embargo no se descarta la idea de usar Acido Giberelico (GA₃) como pretratamiento, ya que las semillas de *Taxus* presentan latencia causada por la alta concentración de Acido abscisico y, como consecuencia, bajo desarrollo de los embriones (Nicholson y Munn, 2003; Zavala-Chávez, 2001).

3.1.1 Clasificación taxonómica

Taxus globosa es un árbol perennifolio, el cual ha sido clasificado taxonómicamente de la siguiente manera.

División: Coniferophyta

Clase: Pinopsida

Orden: Taxales

Familia: Taxaceae

Género: *Taxus*

Especie: *Taxus globosa* (Zamudio, 1992)

3.1.2 Descripción botánica

Árbol bajo o arbusto, perennifolio, dioico, de 6 a 18 m de alto; tronco erecto de 30 a 50 cm de diámetro, muy ramificado, con las ramas colgantes, formando una copa redondeada o extendida; corteza 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 linear lanceoladas, ligeramente falcadas, de 2 a 3.7 cm de largo y de 2 a 3 mm de ancho, 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 y con hileras de estomas. Estróbilos masculinos axilares, ubicados en la parte inferior de la ramas, solitarios o rara vez en espigas compactas de 2 a 4, con un pedúnculo corto, con 4 a 5 brácteas membranosas en la base del estróbilo, imbricadas, amarillentas; estróbilos formados por 7 a 14 conjuntos de sacos polínicos con filamentos cortos, que surgen en el ápice del pedúnculo; microsporófilas peltadas con 4 a 7 sacos polínicos, los cuales presentan dehiscencia longitudinal y tejido conectivo uniendo los sacos. Óvulos solitarios (no asociados en estróbilos), ubicados en las axilas de las hojas, dispuestos en la parte posterior de las ramas, rodeados por varias brácteas membranosas, verdes, con el margen escarioso; semillas sin ala, ovoides u oval-ovoides de 5 a 7 mm de largo por 4 mm de ancho, de color café, con el ápice apiculado, cubiertas parcialmente por un arilo carnoso de color rojo. A pesar de que algunos autores han ubicado a *T. globosa* como una subespecie de *T. baccata*, *T. globosa* se distingue por sus hojas más largas y delgadas, agudas, claramente falcadas y por las semillas ovoides más gruesas (Zamudio, 1992).

En la figura 1A se muestra una rama de *T. globosa* creciendo a las orillas de las cañadas en el Parque Ecológico del Chico Hidalgo, y en la figura 1B la semilla madura de *T. globosa* rodeada por el arilo rojo.



Figura 1. A) Rama de *Taxus globosa* creciendo a las orillas de las cañadas. B) Semilla madura de *T. globosa* rodeada por el arilo.

3.1.3 Distribución geográfica de *Taxus globosa*

La familia Taxaceae presenta de tres a cinco géneros y unas 15 especies. Se encuentra distribuida en el Hemisferio Norte y en Nueva Caledonia. En México *T. globosa* se distribuye en la Sierra Madre Oriental (Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí, Querétaro, Hidalgo y Veracruz), Sierra de Juárez, Oaxaca y la Meseta Central de Chiapas, así como en Guatemala en la Sierra de Minas, Sierra de Cuchumatanes y Cadena Volcánica (Standley y Steyermark, 1958; Islebe *et al.*, 1994), en el sur de El Salvador (Silba, 1984) y en las Cordilleras de Celaque y Tilarán en Honduras. Zamudio (1992) considera que esta especie tiene una distribución aparentemente disyunta¹. En la figura 2, se muestra la distribución de *T. globosa* en México específicamente en las zonas del bajío y el Estado de Chiapas.

¹ La distribución disyunta de una población corresponde a individuos o conjunto de individuos que crecen en forma aislada.

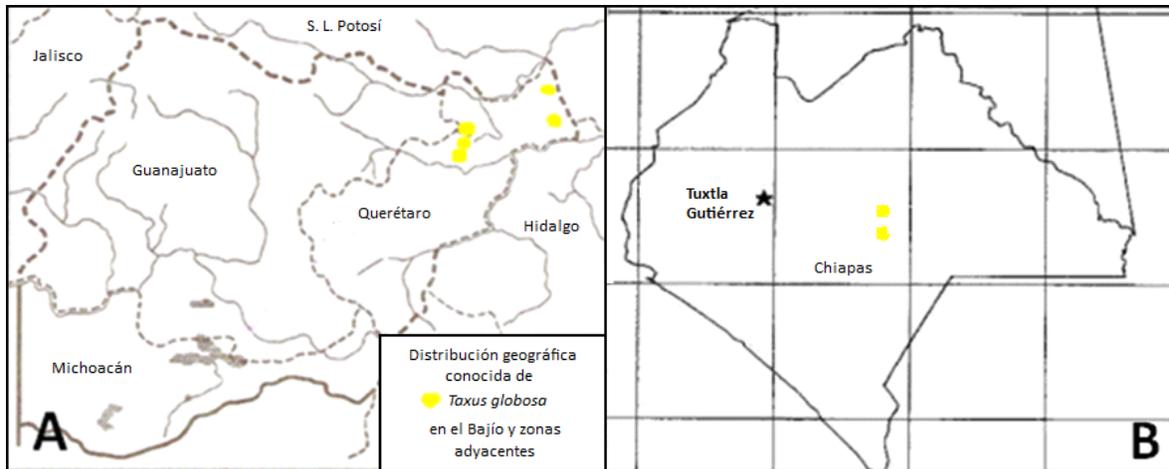


Figura 2. Distribución geográfica conocida de *Taxus globosa*: A) En el Bajío y zonas adyacentes y B) Estado de Chiapas, México (Zamudio, 1992).

3.1.4 Hábitat

En general, se sabe que *T. globosa* comprende árboles tolerantes a la sombra, cuyo crecimiento parece ser lento. Se encuentra formando parte de distintos tipos de vegetación en el país, pero aparentemente es más común en los bosques mesófilos de oyamel, pino encino y coníferas en México. Los individuos adultos frecuentemente se han encontrado en el fondo de cañadas húmedas, en altitudes que van de 1000 a 2,800 msnm (Zamudio, 1992).

Análisis de suelo realizados por Zavala-Chávez (2001) han mostrado que esta especie crece en suelos con un pH que varía de 5.1 a 6.3, con una conductividad eléctrica de 0.04 a 0.10 mmhos/cm, el total de materia orgánica observado fue de 8.7 a 26.1%; los niveles de nitrógeno de 0.44 a 1.31%; fósforo, de 4 a 20 ppm, y la clase de textura fue franca.

3.1.5 Usos tradicionales

El uso económico de las especies de *Taxus* en Norteamérica data desde las civilizaciones prehispánicas. Las especies de varios bosques de Norteamérica fueron utilizadas para la elaboración de armas, herramientas, objetos culinarios, equipo de soporte y como objetos artesanales para sus rituales. *Taxus canadensis* del Este de Norteamérica y *Taxus brevifolia*

del Noroeste del Pacífico fueron utilizadas con fines terapéuticos por un numeroso grupo de indígenas para aliviar los dolores reumáticos, coágulos, parálisis, gonorrea y dolores de pulmón (Melvin *et al.*, 2003).

Las distintas especies de *Taxus* se usan localmente como leña, carbón o plantas de ornato y en Europa la madera de este árbol se emplea desde tiempos remotos en la ebanistería (Zamudio, 1992). Las hojas y la semilla de algunas especies de *Taxus* son venenosas al hombre y al ganado, por la presencia de un alcaloide llamado taxina; además la madera es rica en taninos. En América no presenta importancia económica destacada, pero en Europa las plantas de este género fueron empleadas en la medicina tradicional como abortivas, las variedades hortícolas de *Taxus baccata* L. se han cultivado ampliamente en parques y jardines, la madera se emplea en la construcción de muebles y en la fabricación de arcos por su flexibilidad (Zamudio, 1992). En Nuevo León se ha reportado el uso de la madera para la construcción así como también para la fabricación de cercas (Melvin *et al.*, 2003). Con el descubrimiento en 1992 del compuesto paclitaxol para el tratamiento de cáncer, el uso económico de este género ha entrado en una nueva fase.

Existen pocos estudios de *T. globosa* que enfoquen su interés al paclitaxol. De los primeros estudios reportados están los de Strobel *et al.* (1993) en el cual describen brevemente a *T. globosa*.

Soto *et al.* (2000) detectaron la presencia de paclitaxol en corteza y follaje de *T. globosa*. Los niveles de paclitaxol encontrados oscilaron entre 0.013 a 0.085%, en corteza y acículas respectivamente. De acuerdo a estos datos se observa una mayor acumulación de paclitaxol en el follaje que en la corteza. La mayor proporción de paclitaxol en el follaje de *T. globosa* le da un particular interés, debido a que la extracción de este fármaco se obtendría a partir del follaje y no de la corteza, lo cual contribuiría enormemente a su conservación; por otro lado, este mismo estudio plantea la posibilidad de un cultivo celular a partir de hojas que, posiblemente, contendría mayor concentración de paclitaxol,

al seleccionar líneas celulares altamente productoras. Resultados sobre la valoración biológica demostraron la presencia de actividad estabilizadora de microtúbulos en las fracciones obtenidas de corteza, acículas y tallos jóvenes, actividad más frecuente en corteza y acículas que en tallo

3.2 Síntesis y producción de Paclitaxol

El paclitaxol fue aislado de *Taxus brevifolia*, en 1963 por Wall y Wani en Research Triangle Institute y la estructura fue finalmente elucidada en 1971. Es un diterpeno tricíclico polioxigenado altamente sustituido caracterizado por un anillo taxano el cual es diferente de otros taxanos conocidos por la presencia del anillo oxetano (anillo-D). La potente actividad antimetabólica está restringida a los taxanos, como el paclitaxol ya que poseen un N-benzoil-3-fenilserina en la cadena del carbono -13. El esqueleto diterpeno del paclitaxol, es como en otros terpenoides derivado de la vía independiente del mevalonato, localizada en el cloroplasto. Esta vía opera en paralelo con la vía clásica acetato/mevalonato citosólica para la biosíntesis de isopentenil difosfato (IPP). Mientras que el precursor universal terpenoide derivado de la vía acetato/mevalonato, generalmente es usado en la biosíntesis de sesquiterpenos, fitoesteroles y triterpenos, el IPP derivado de la vía de plastidio y 1 deoxi-D-xilulosa- 5-fosfato es empleada en la biosíntesis de carotenoides, fitol, plastoquinona, isoprenos, monoterpenos y diterpenos (Jennewein y Croteau.,2001; Rowinsky *et. al*,1990).

En los últimos cinco años se han hecho más avances en la identificación de genes responsables de la biosíntesis de paclitaxol, un proceso que requiere de aproximadamente doce reacciones enzimáticas involucradas en la construcción del esqueleto tetracíclico y la adición de los grupos funcionales hidroxilo y acilo. La sobreexpresión de los genes involucrados en la síntesis de este compuesto en líneas celulares puede ser una buena estrategia para mejorar la producción de este fármaco (Walter y Croteau, 2001).

El paclitaxol se puede obtener por diferentes métodos. Naturalmente es producido por los árboles del género *Taxus*, siendo las especies más utilizadas *T. baccata* en Europa, *T. brevifolia* en Estados Unidos y *T. yunnanensis* en China. En México, el paclitaxol se produce en *T. globosa*, sin embargo el sistema de extracción natural de este metabolito secundario ha progresado lentamente ya que es escaso y es difícil su aislamiento, extracción y preparación a gran escala. Además se sabe que de un árbol de cien años en promedio, se obtienen 3 kg de corteza de los cuales se aíslan apenas 300 mg de este compuesto, de tal forma que se requieren 10 kg de corteza de tres árboles centenarios para obtener un gramo de paclitaxol lo que le toma al árbol cerca de cien años alcanzar las dimensiones adecuadas (diámetro de 25 cm y altura de 6 a 9 m) que permitan explotar su corteza, además de que el descortezamiento mata al árbol. Así mismo el paclitaxol es poco soluble en medio acuoso, impidiendo el desarrollo de una formulación clínica sustentable (Wani *et al.*, 1971; Appendino *et al.*, 1993).

Existen pocos organismos que producen paclitaxol entre ellos a un diverso grupo de hongos endofíticos de especies de *Taxus* (*Taxomyces andreanae*, *Pestalotiopsis*, *Fusarium* y *Alternaria*). Sin embargo este sistema microbiano no tiene una producción sostenible del fármaco (Stierle *et al.*, 1993). Un sistema de producción biológico más prometedor es el cultivo celular de *Taxus* que responde a la elicitación con metil jasmonato que incrementa la síntesis de paclitaxol (Ketchum *et al.*, 1999). Los niveles de producción de taxoides en cultivos celulares son sustancialmente más altos que de los sistemas microbianos, pero no suficientemente altos o seguros todavía para servir como un recurso comercial.

Además de su fuente natural, el paclitaxol puede ser obtenido a través de la síntesis química, aunque con un rendimiento bajo debido a la alta complejidad de la molécula. Otro método de obtención de paclitaxol es la semisíntesis que consiste en modificar químicamente un precursor como por ejemplo 10-deacetilbacatina III o bacatina III. Aunque este procedimiento de semisíntesis es eficiente, la purificación de los precursores a partir del tejido vegetal requiere de un gran esfuerzo en la separación de los

intermediarios deseados de los abundantes fenoles, lípidos y otros compuestos dentro de la planta. El aislamiento del paclitaxol y otros taxoides útiles mediante el cultivo de células de *Taxus* requiere de pocos pasos de purificación de tejidos intactos porque las cantidades de sustancias mezcladas son bajas; sin embargo el rendimiento de la producción de taxoides en cultivo celular es también bajo, para ser comercialmente viable (Ketchum y Croteau, 1999)

3.3 Cultivo de Tejidos Vegetales.

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) puede ser definido como un conjunto de técnicas en donde segmentos u órganos de una planta (explante) se cultiva asépticamente en un medio artificial de composición química definida y se incuba bajo condiciones ambientales controladas.

Los cultivos de células y tejidos vegetales *in vitro* constituyen actualmente una alternativa para producir sustancias de uso farmacéutico, agrícola o industrial; cuya producción comercial por métodos convencionales (síntesis química o extracción de las plantas que las sintetizan) resulta difícil o económicamente desfavorable (Ramachandra y Ravishankar, 2002; Archana *et al*, 2001). Estos cultivos constituyen una promesa para aumentar el rendimiento de los principios activos de interés presentes en las plantas, así como para controlar adecuadamente su producción, además de permitir la oportunidad de utilizarlos como catalizadores en la síntesis de otros compuestos que no estén presentes en ellos, gracias a su capacidad catalítica (Hurtado y Merino, 1994; Flores 2004) así como por ser una herramienta utilizada en la modificación estructural de moléculas para obtener compuestos con características diferentes y propiedades benéficas (Ramachandra y Ravishankar, 2002).

Esto es posible ya que el CTV se basa en la totipotencialidad celular, es decir, cada célula contiene en el genoma la información completa requerida para dar lugar a una copia

exacta de la planta parental, así como presentar todo su repertorio enzimático, lo cual se expresa con un manejo adecuado de las condiciones nutricionales, hormonales y ambientales (Pérez *et al*, 1999).

Inicialmente el CTV se utilizó para la multiplicación masiva de plantas élites o micropropagación, sin embargo ha adquirido una mayor proyección en:

- * La clonación *in vitro* de plantas selectas.
- * La generación de plantas libres de enfermedades.
- * La producción *in vitro* de compuestos naturales de alto valor (enzimas, metabolitos, aminoácidos, etc.)
- * La conservación de germoplasma vegetal mediante criopreservación.
- * La transferencia directa de genes a las plantas con la ayuda de la ingeniería genética (Peréz, 1998; Archana *et al.*, 2001; Marja, 2002; Ramachandra y Ravishankar, 2002)

Los principios básicos de los cuales depende el éxito o fracaso del cultivo de tejidos vegetales son:

1. La elección del explante, con base en sus condiciones fisiológicas, bioquímicas, genéticas, así como la posición que guarda en la planta.
2. La elección del medio y las condiciones de cultivo tomando en cuenta sales inorgánicas, compuestos orgánicos, reguladores de crecimiento, fuente de carbono necesarios para el óptimo desarrollo, así como las condiciones físicas requeridas (fotoperiodo, intensidad lumínica, temperatura, humedad)
3. Condiciones asépticas del material vegetal, se debe desinfectar y eliminar patógenos superficiales y sistémicos teniendo en cuenta que si este proceso es muy drástico se puede afectar la viabilidad del material y dificultar el

establecimiento del cultivo; así como esterilizar el medio de cultivo e instrumentos que se utilicen para evitar contaminación (Pierik, 1990; Olivera, 2003)

Entre las ventajas que presenta el CTV se encuentra que se requiere de poco espacio para mantener un gran número de plantas, se trabaja libre de patógenos al utilizar medios asépticos y condiciones controladas; su producción es continua, es decir no se requiere estacionalidad de las plantas tropicales o alpinas (Pérez, 1998) y se pueden mantener por largos periodos. Entre las desventajas se tiene que las células vegetales presentan paredes rígidas lo que obliga a emplear sistemas de agitación apropiados, las instalaciones y equipo deben ser especializados al igual que la mano de obra, el desarrollo de protocolos especializados requiere de largos tiempos de trabajo y fuerte inversión, las plantas producidas pueden presentar variación somaclonal, definida como modificaciones genéticas en las células y cultivos *in vitro* que pueden manifestarse como mutaciones heredables a las progenies de las plantas regeneradas (Pierik,1990).

Se han desarrollado diferentes sistemas para los cultivos de tejidos, órganos, células y protoplastos vegetales; los cuales constituyen una forma de mantener y propagar células vegetales; uno de ellos es el cultivo de callos.

3.3.1 Cultivo de Callos

El callo es una masa amorfa, de células vegetales poco diferenciadas y de rápida proliferación. Puede obtenerse a partir de órganos y tejidos diferenciados, que posteriormente son llevados a desdiferenciación celular. Su crecimiento puede ser heterogéneo. Al existir zonas de actividad formadora de embriones, raíces, brotes, etc., necesitan de una combinación adecuada entre auxinas y citocininas para tener una mayor proliferación (Olivera, 2003).

Las características del callo dependen de los reguladores del crecimiento utilizados, de la especie y órgano del que fue tomado el explante inicial, y de las condiciones físicas de incubación. Para la inducción de callos se requieren medios ricos como el MS o el B5 entre otros, con la concentración adecuada de reguladores de crecimiento.

Los reguladores de crecimiento son de suma importancia, ya que estimulan, inhiben o modifican de algún modo los procesos fisiológicos en las plantas; se utilizan en concentraciones variadas de $0.01-20 \text{ mg.l}^{-1}$ y en términos generales la inducción de callo se ve estimulada por concentraciones equitativas de auxinas y citocininas. Las auxinas están implicadas en muchos procesos que afectan la división celular y diferenciación de las células, inducen el alargamiento celular debido a que aumentan la plasticidad de la pared y la penetración del agua a la célula (George y Sherrington, 1984; Hurtado y Merino, 1994) mientras que las citocininas promueven la división y expansión celular, el desarrollo de los cloroplastos, alargamiento de las hojas y la floración, actúan en el retraso de la senescencia inhiben el crecimiento de raíces (Hurtado y Merino, 1994; Azcon-Bieto, 2000)

El callo tiene una característica que lo hace importante para su utilización en la iniciación de cultivos en suspensión y es su friabilidad (tendencia de las células a separarse unas de otras). Bajo este criterio los callos pueden clasificarse como:

- Friable: Característica en la que las células están asociadas unas a otras de manera relativamente laxa, siendo esponjoso y con gran cantidad de espacios intracelulares. Los callos de *T. globosa* se pueden clasificar dentro de esta categoría.
- Compacto. Si las células se agregan más densamente, siendo masas celulares duras, compacta, íntimamente ligadas y con un espacio intracelular muy limitado (Ayala, 2008).

3.3.2 Cultivo de Células en Suspensión

Se define al cultivo de células en suspensión como el crecimiento constante de células o agregados celulares en medio líquido bajo condiciones de agitación permanente y de asepsia. Estos cultivos se utilizan para establecer poblaciones celulares homogéneas tanto bioquímica como morfológicamente con crecimiento constante y sincronizado, durante un periodo corto, estimulando también un mayor crecimiento de la masa celular (Pierik, 1990; Hurtado y Merino, 1994)

Entre las aplicaciones de las células vegetales en suspensión para la investigación se encuentran:

- Estudios sobre ciclo celular.
- Estudios fisiológicos y bioquímicos.
- Producción de metabolitos secundarios.
- Inducción enzimática y expresión génica
- Aislamiento de mutantes
- Fuente de protoplastos para fusiones o manipulación genética
- Biorremediación.

Entre las ventajas que presenta este tipo de cultivo están: lograr poblaciones más o menos homogéneas de células, pudiendo en algunas ocasiones detener el crecimiento en un momento determinado (sincronizar) utilizando además pocas cantidades de material vegetal. Al tenerse células provenientes de tejidos específicos se eliminan interacciones con otros tejidos o efectos de la fenología que se presenta en plantas completas. Por otra parte, entre las desventajas que muestran se encuentran que los cultivos en suspensión no pueden mantenerse por periodos largos, y usualmente se requiere preparar con tejido fresco cada experimento. El manejo de los cultivos en suspensión se debe hacer con el mayor cuidado y se requiere de una infraestructura más sofisticada (George y Sherrington,

1984). Una característica fundamental en el crecimiento de los cultivos en suspensión es la capacidad de separación de las células, la cual se puede promover con varios factores entre los que se encuentra la sustitución de la sacarosa por glucosa, el adicionar vitaminas como B12, tiamina o B1 al incrementar los niveles de algunas sales minerales como el calcio o hierro e incluso por la incorporación de enzimas degradantes de la pared celular (Pierik, 1990; Hurtado y Merino, 1994; Pérez, 1998)

El establecimiento de un cultivo de células en suspensión puede lograrse directamente a partir de un inóculo, o bien, lo que se hace generalmente, al transferir fragmentos de callos al medio líquido, el cual se mantiene en agitación durante el periodo de cultivo. El mejor inóculo para la iniciación de células en suspensión es un callo friable con un alto índice de división celular (Pérez *et al.*, 1999; Evans y Coleman, 2003). El tamaño del inóculo varía según el tipo de callo y la especie.

3.3.3 Cultivo celular de *Taxus spp.*

El cultivo celular de *Taxus* ofrece el potencial para incrementar la cantidad de paclitaxol comparado con la extracción directa de tejidos o la semisíntesis, evitando el uso de solventes y metales abrasivos. Comparado con otros métodos de obtención de paclitaxol como la síntesis total, el cultivo celular de *Taxus* es ideal para escalarlo a nivel comercial.

Es por esto que desde el descubrimiento del paclitaxol numerosas investigaciones han tratado de optimizar las condiciones para su cultivo *in vitro*, evaluando los diversos factores que puedan afectar los niveles de paclitaxol. Sin embargo, hasta ahora estos estudios se han enfocado en las especies europeas y asiáticas dejando de lado a la especie endémica de México *Taxus globosa*, la cual cuenta con mayores cantidades de paclitaxol (0.01 % en peso seco de follaje) en comparación con otras especies como *T. baccata*, *T. brevifolia*, *T. cuspidata* y *T. media* (Wheeler *et al.*, 1992). En la tabla 1 se muestran algunos de los estudios en cultivo de tejidos realizados en el género *Taxus*.

Tabla 1. Cultivo de tejidos vegetales en *Taxus* spp.

Especies	Resultados	Referencias
<i>T. baccata</i> , <i>T. brevifolia</i> <i>T. cuspidata</i> <i>T. x media</i>	Cultivo de callos: iniciación, optimización del crecimiento, caracterización y producción de taxol	Wickremesinhe y Arteca, 1993
<i>T. cuspidata</i>	Cinéticas de la producción de taxol y nutrientes en células en suspensión	Fett-Neto <i>et al.</i> , 1994 *
<i>T. cuspidata</i>	Se examinó la influencia de la luz blanca en la acumulación de taxol y bacatina III en cultivos callos y células en suspensión	Fett-Neto <i>et al.</i> , 1994*
<i>T. baccata</i>	El cultivo de callos fue inducido de hipocotilo y explantes de hojas en medio WPM	Zhiri <i>et al.</i> , 1995*
<i>T. brevifolia</i>	Los efectos del medio basal; tipo y concentración de azúcar sobre el crecimiento y producción de taxanos fueron investigados. La fructosa fue el mejor azúcar, utilizándose en una alta concentración para incrementar los niveles de taxol	Kim <i>et al.</i> , 1995*
<i>T. brevifolia</i>	Las sales del medio Gamborg (B5) incrementan el crecimiento de los cultivos celulares, la mejor combinación de carbohidratos fue 0.5% de fructosa más 0.5% de sacarosa. Las mayores tasas de crecimiento se obtuvieron al utilizar 4.14 μM (1 mg l ⁻¹) de picloram, 0.46 μM (0.1 mg l ⁻¹) de cinetina y 0.38 μM (0.1 mg l ⁻¹) de ácido abscísico o 0.29 μM (0.1 mg l ⁻¹) de ácido giberélico. Este medio denominado TMS demostró incrementar dos veces más el crecimiento de callos en menos tiempo	Ketchum <i>et al.</i> , 1995.
<i>T. baccata</i>	Ocho diferentes análogos del taxol fueron identificados en cultivos de callos que crecían en medio MS con reguladores de crecimiento	Vanek <i>et al.</i> , 1996*
<i>T. chenensis</i>	Los callos fueron inducidos de tallos y acículas, y analizados por su capacidad para producir taxol	Gan <i>et al.</i> , 1996 ^a *
<i>T. cuspidata</i>	Cultivos en suspensión crecidos en matraces y reactores tipo Wilson bombeados con aire ambos en agitación. La productividad de taxol fue mas alta que las reportadas en otros cultivos en suspensión de <i>Taxus sp.</i>	Pestchanker <i>et al.</i> , 1996 *
<i>T. mairei</i>	Cultivos de callos fueron inducidos usando diferentes explantes incluyendo acículas, tallos, raíces, embriones y endospermas. Se encontró que el contenido de taxol varia según el tipo de explante	Chang <i>et al.</i> , 1996*
<i>T. wallichiana</i>	Condiciones del cultivo fueron estandarizadas para la iniciación de cultivos de callos del tejo del Himalaya usando tallos y acículas de arboles maduros.	Banerjee <i>et al.</i> , 1996
<i>T. cuspidata</i> y <i>T. canadensis</i>	La combinación de los reguladores de crecimiento ANA y Tiazuron incrementaron el crecimiento y la producción de taxol en los cultivos celulares de	Ketchum y Gibson, 1996.

	<i>T.canadensis</i> , mientras que la combinación de AIA y BAP resultaron mejores para los cultivos de <i>T. cuspidata</i> . La disminución de carbohidratos al medio de cultivo incrementa la acumulación de taxol.	
<i>T.yunnanensis</i>	El contenido de taxol fue promovido incrementando la cantidad de azúcar, y solo fue suplementado con sustancias orgánicas como leche de coco, caseína hidrolizada e hidrolizado de lacto albumina.	Guan <i>et al.</i> ,1997*
<i>T. cuspidata</i>	La concentración de oxígeno (10% v/v) promueve poca producción de paclitaxol, mientras que una alta concentración de dióxido de carbono (10% v/v) inhibe esta producción. La mezcla de gases mas efectiva en términos de producción de paclitaxol fue 10% (v/v) de oxígeno, 0.5%(v/v) dióxido de carbono, y 5 ppm de etileno.	Linden, <i>et al.</i> , (2001).
<i>T. cuspidata</i>	La utilización de ácido ascórbico (150 g/l), la glutamina (6.25 mM), y el ácido cítrico (150 g/l)] no afectaron el crecimiento ni la viabilidad celular de los cultivos de protoplastos. El compuesto, Plant Preservative Mixture 0.2% (v/v), presento mayor eficacia en la prevención de contaminación y no tuvo efecto sobre el crecimiento y la viabilidad de los cultivos	Michael C. Naill y Susan C. Roberts, 2005.
<i>Taxus wallichiana</i>	Protocolo de regeneración de <i>Taxus wallichiana</i> vía organogénesis de cultivos de callos derivados de embriones cigóticos. Los embriones cigóticos fueron sembrados en los medios Lloyd y McCown's suplementados con vitaminas SH, 0.5 mg l ⁻¹ de BAP en combinación con 1.0–2.0 mg l ⁻¹ de 2,4-D o ANA.	Mukul <i>et al.</i> ,2005
<i>T. baccata</i>	Se utilizó medio Gamborg's (B5) suplementado con ANA (2 mg/l), 2,4-D (0.2 mg/l),Cinetina(0.2 mg/l), ácido ascórbico (50 mg/l)sacarosa (20 g/l) y agar (8 g/l) para inducir callos de <i>Taxus</i> . La adición de sulfato de vanadio (0.1 mg/l), nitrato de plata (0.3 mg/l) y cloruro de cobalto (0.25 mg/l) incrementaron el crecimiento de los cultivos.	Khosroushahi <i>et al.</i> , 2006

*Citado por Han *et al.*, 1999.

3.4. Transformación Genética de Plantas

El mejoramiento genético vegetal se originó hace aproximadamente 10.000 años, cuando el hombre se hizo agricultor comenzó la domesticación de las plantas y se basó en la

existencia de variabilidad genética para los caracteres que se deseaban mejorar y en la reproducción sexual para la incorporación de los mismos (Bolivar, 2004).

La ingeniería genética permite el acceso y la manipulación directa de la información genética de cualquier ser vivo, e incluso posibilita la creación de genes sintéticos. Por ello, esta tecnología rompe con las barreras impuestas por la incompatibilidad sexual y hace posible introducir en plantas, genes provenientes no sólo de otras especies vegetales evolutivamente distantes, sino incluso de hongos, virus, bacterias y animales; esta modificación se lleva a cabo en un ciclo. Lo anterior se basa en el principio de que el código genético de los organismos vivos es universal. Es por ello que la obtención de plantas transgénicas (portadoras de uno o varios genes ajenos o heterólogos) empleando alguna de las técnicas disponibles para tal efecto, representa hoy en día uno de los medios más versátiles y precisos para producir variedades vegetales mejoradas como son la obtención de plantas con resistencia a virus, insectos, hongos y bacterias, tolerancia a herbicidas y a estrés abiótico y modificación de la calidad nutritiva de los cultivos entre otros. Asimismo, a través del uso de transgenes es posible modificar la expresión de genes presentes en el genoma de la planta (Bolivar, 2004).

En lo que a transformación genética se refiere, es necesario disponer del transgen (secuencias regulatorias y codificantes clonadas en un vector de transformación) y contar con un método de transformación que permita tanto la introducción del material genético que se pretende incorporar, como su integración estable, funcional y heredable en el genoma vegetal (Bolivar, 2004). Para introducir un transgen es necesario que el mismo sea incorporado previamente en un vector (por ejemplo un plásmido). Para ello se digiere el ADN extraído de un organismo, cualquiera que sea su origen, con enzimas de restricción. Una vez introducido el gen de interés en la célula, se induce el desarrollo de plantas mediante distintas técnicas de cultivo de tejidos. Se procede luego al análisis molecular de las plantas regeneradas *in vitro* para identificar aquellas que porten y expresen el o los transgenes en los niveles deseados. Finalmente, a través de experimentos de campo y

laboratorio se estudia el comportamiento de los individuos transgénicos y su descendencia (Díaz *et al.*, 2006).

Un transgen está compuesto por una secuencia codificante (región comprendida entre los codones de iniciación y terminación de la traducción) y por secuencias regulatorias que determinan el tejido, el momento del desarrollo y el nivel de expresión del transgen en la planta.

El promotor es el sitio del ADN al cual se une la enzima ARN-polimerasa para iniciar el proceso de transcripción. Además, es necesario que el transgen disponga de una región no traducida en el extremo 3' del mismo, que incluya la señal de corte y poliadenilación (terminador), necesaria para el correcto procesamiento del transcrito correspondiente. En la Figura 3 se observa un diagrama general de la estructura molecular de un transgen.



Figura 3. Estructura molecular de un transgen (Díaz *et al.*, 2006)

Asimismo, en la elección del promotor a utilizar en la construcción del transgen, hay que considerar la especie vegetal a transformar, ya que su nivel y patrón de expresión pueden variar al ser utilizados en especies distintas a la de origen del mismo. Dentro de los promotores se distinguen varios tipos: los constitutivos, que permiten la expresión del gen en toda la planta en forma continua, los inducibles que responden a factores ambientales y finalmente los específicos de tejido que permitirán la transcripción en determinados órganos y tejidos. En la tabla 2 se muestran diferentes tipos de promotores usados en la transformación genética de plantas. Los promotores pueden ser modificados con el fin de

aumentar la expresión de los genes que regulan: pueden truncarse, adicionárseles un intrón o unírseles secuencias de otros promotores

Tabla 2. Promotores usados en la transformación genética de plantas (Díaz *et al.*, 2006).

Promotores	
Constitutivos	Nos (nopalina sintetasa de <i>Agrobacterium</i>) 35S (virus del mosaico de la coliflor) Ubi (ubiquinina de maíz) Act 1 (actina de arroz)
Específicos de tejido	Ta 29 (tapete de antera de tabaco) Faseolina (cotiledones de frijol) TobRB7 (raíz de tabaco) Patatina (tubérculo de papa) Glutenina (endospermo de trigo)
Inducibles	Subunidad pequeña de rubisco inducible por luz Alcohol deshidrogenasa 1 inducible por anaerobiosis Proteína de shock térmico inducible por calor

3.4.1 Genes Informadores o reporteros

Desde los primeros años de transformación de plantas, el gen marcador *uidA* ha usado ampliamente como indicador del ADN transferido dentro de las células de plantas y tejidos. La enzima β -glucoronidasa. (GUS) es una hidrolasa obtenida a partir de la bacteria intestinal *Escherichia coli* que cataliza la hidrólisis de una gran variedad de β -glucurónidos. Está codificada por un gen denominado *uidA*. Si bien la hidrolización de glucurónidos naturales no produce productos coloridos, existen glucurónidos obtenidos artificialmente que cuando son hidrolizados por la enzima β -glucuronidasa liberan productos coloridos o fluorescentes. Uno de estos sustratos es el ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónico (X-Gluc®). Al ser hidrolizado por la enzima produce un intermediario indoxilo inestable, incoloro, que sufre una dimerización oxidativa para dar el producto final dicloro-dibromo índigo, de color azul e insoluble en agua. Como la prueba requiere destrucción, GUS no es un marcador de selección viable, pero es una alternativa de marcador visual como los sistemas de la antocianina y luciferasa que han sido usados en la transformación de cereales. Los genes marcadores de antocianina dan como resultado la

acumulación de un pigmento visible bajo la luz del microscopio, pero pueden deteriorar las células transformadas y su desarrollo. (Jefferson, 1987; O'Brien y Henry, 2000). En la figura 4 se muestran la reacción del sustrato cromogénico X-Gluc® (incoloro), que da como producto final el compuesto colorido, el cual permite la visualización de las células transformadas.

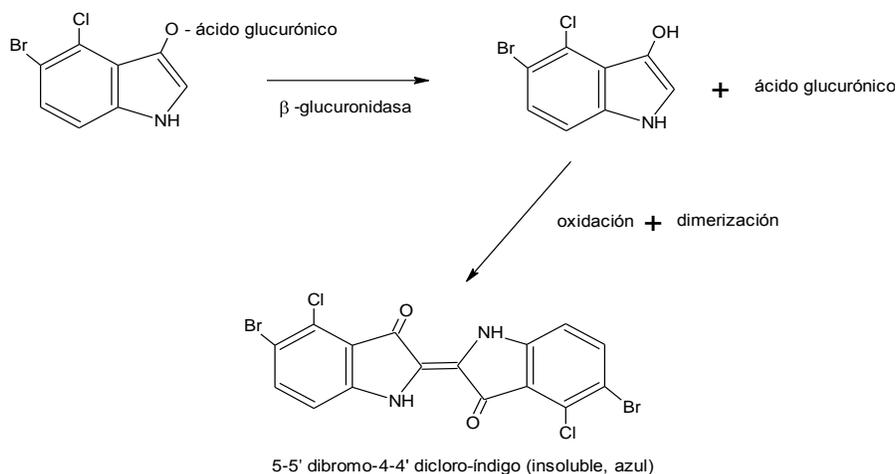


Figura 4. Reacción de hidrólisis del sustrato cromogénico X-Gluc® (incoloro), que da como producto final el compuesto colorido 5-5'-dibromo-4-4' dicloro-índigo (de color azul).

En contraste, el sistema de la proteína verde fluorescente es un marcador visual más reciente que cada vez es más utilizado en la transformación en plantas. Este marcador no destructivo, permite la identificación de células transgénicas por microscopía de fluorescencia. El sistema es independiente del tejido y genotipo, muestra baja toxicidad y es autónomo de células.

La proteína verde fluorescente o GFP (green fluorescent protein) fue aislada de la medusa *Aequoria victoria*. Esta proteína de 238 aminoácidos posee la propiedad de fluorescer. Emite luz con un máximo en el verde (508 nm) cuando es excitada con luz ultravioleta cercana o azul, gracias a un cromóforo que se forma postraduccionalmente a través de la oxidación y formación de una estructura cíclica a partir de los residuos 65 a 67 (Ser-Tyr-Gly). Esta reacción es autocatalítica por lo que, a diferencia de otras proteínas fluorescentes, la GFP no requiere del agregado de grupos prostéticos para fluorescer; sólo

se requieren luz UV o azul y oxígeno para visualizar su fluorescencia verde. Se han desarrollado variantes de GFP que emiten en otros colores, como el amarillo, el azul o el rojo, lo cual permite la detección simultánea de varios genes indicadores. Además de permitir el estudio de promotores, la proteína GFP es utilizada para estudiar localización subcelular de proteínas mediante fusiones génicas. Reportes recientes sobre la GFP indican que su uso en transformación genética de cereales es considerablemente promisorio (Davis y Vierstra, 1998).

3.4.2 Selección con herbicidas.

El crecimiento preferencial de células transformadas sobre las células no transformadas *in vitro* recibe el término de selección, y es un componente clave en los sistemas de ingeniería genética. En el proceso de obtención de plantas transgénicas, los genes marcadores seleccionables, generalmente de origen bacteriano, sirven para poner a punto un protocolo de transformación o como acompañantes de genes de interés que se desean introducir.

La mayoría de las estrategias para la selección de células transformadas están basadas en la inhibición del crecimiento de células no transformadas o de tipo silvestre sin afectar significativamente a las que sí están transformadas; es decir, se hace uso de un sistema de selección positiva, de ahí que la elección de un correcto gen de selección sea crítico para un sistema eficiente de transformación genética (Klein y Fitzpatrick-McElligott, 1993; Vasil,1994)

Actualmente la transformación de muchos cereales y otras plantas se ha hecho usando genes marcadores, que son típicamente genes de resistencia que confieren tolerancia a sustancias tóxicas como antibióticos o herbicidas. Es necesario tener en cuenta que algunas especies pueden poseer una resistencia natural a los agentes selectivos antes mencionados, por lo que es importante evaluar este aspecto cuando se elige el gen de

selección a utilizar, así como el agente selectivo y las concentraciones del mismo. (O'Brien y Henry,2000).

Los genes que confieren resistencia a compuestos herbicidas proveen una alternativa a la selección con antibióticos. Los genes de resistencia a herbicidas generalmente codifican para modificar proteínas insensibilizándolas al herbicida o para una enzima que degrada o desintoxica el herbicida en la planta.

El Glufosinato (también conocido como fosfinotricin), es el ingrediente activo de Liberty® tiene una estructura química similar a la glutamina y actúa como inhibidor competitivo reversible de la glutamina sintetasa. Esta enzima juega un papel fundamental en la asimilación del amonio y en la regulación del metabolismo del nitrógeno en las plantas y es la única enzima en plantas que puede desintoxicar el amonio liberado por la reducción del nitrato, la degradación de aminoácidos y la fotorrespiración inhibe la actividad enzimática de la glutamina sintetasa lo que conduce a una toxicidad por la acumulación de amonio en la planta. Se han identificado dos genes homólogos que, al expresarse en plantas, confieren tolerancia al glufosinato. Ambos genes fueron aislados de *Streptomyces*, el gen *bar* de *S. hygroscopicus*. Ambos genes codifican para la enzima fosfinotricin acetiltransferasa (PAT), que inactiva al glufosinato mediante acetilación. El gen *bar* mostró tolerancia al glufosinato en tabaco, jitomate y papa (O'Brien y Henry, 2000).

Aunque el uso de genes resistentes a herbicidas para selección de plantas transgénicas en cultivo es efectivo y atractivo desde el punto de vista práctico, existen opiniones acerca de la posible transferencia de residuos de resistencia de cultivos transgénicos a cultivos no transgénicos sexualmente compatibles. Esto motiva al desarrollo de tecnología alternativa de selección.

3.4.3 Selección con el antibiótico Higromicina

La Higromicina B fue originalmente desarrollada en los años 50 del siglo XX para su uso veterinario, y actualmente se añade al alimento de pollo como antihelmíntico o agente antiparasitario. La bacteria productora, *Streptomyces hygroscopicus*, fue aislada en 1953 a partir de una muestra de suelo. A principios de los años 80 del siglo XX se identificaron diversos genes de resistencia a este antibiótico.

La higromicina esta constituida por moléculas hidrofílicas formadas por 2 o más azúcares, unidos a un núcleo hexosa, que suele estar en posición central, mediante enlaces glucosídicos. A través de la difusión, atraviesan la membrana celular, posteriormente y a través de un mecanismo activo oxígeno dependiente, penetran la membrana interna citoplasmática y provocan en ésta, alteraciones de su funcionalidad, se unen finalmente a polisomas e inhiben la síntesis de proteínas. Su sitio intracelular de acción es la subunidad ribosómica 30s, que provoca error de lectura del RNAmensajero con producción de una proteína anómala, también induce fuga de sodio, potasio y otros componentes esenciales que producen la muerte celular (Barranco, 1998). En la tabla 3 se muestran algunos de los genes de selección más usados en la transformación genética.

Tabla 3. Sistemas de selección aplicados para la transformación estable de cereales (O'Brien y Henry, 2000).

Modo de selección	Genes marcadores	Origen del gen	Agente de selección/sustrato
Antibiótico	neo, npt II (neomicina fosfotransferasa)	<i>Escherichia coli</i>	Kanamicina genomicina, G418 paromomicina
	hpt, hph,aph-IV (higromicina fosfotransferasa)	<i>Escherichia coli</i>	Higromicina
	Mutante dhfr (dihidrofolata reductasa)	Ratón	Metotrexata
	aad A (resistencia a espectinomocina)	Streptomicina	Streptomicina
Herbicida	bar, pat (fosfinotricina acetiltransferasa)	<i>Streptomyces hygroscopicus, Streptomyces viridochromogenes</i>	Glufosinato bilaphos, herbicida Basta
	epsps/gox (enolphiruvilshikimata fosfato sintetasa/ glifosata oxidoreductasa)	<i>Agrobacterium spp. cepa CP4</i>	Glifosato
	als (acetolactato sintetasa)	<i>Zea mays</i>	Sulfonilureas
	cah (cianamida hidratasa)	<i>Myrothecium verrucaria</i>	Cianamida
Positiva	manA (fosfomanosa isomerasa)		Manosa
	xylA (xilosa isomerasa)	<i>Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes</i>	Xilosa
	lysC, AK (lisina-treonina aspartoquinasa)	<i>Escherichia coli</i>	Lisina-treonina

3.5 Métodos de transformación genética en plantas

La manipulación o transformación genética de plantas se refiere a la alteración racional del genoma de las células vegetales a partir de las que se obtiene una planta completa. La introducción e integración estable de un gen extraño en el genoma de la planta le confiere una nueva característica de interés como es la mejorara de la calidad de frutos, tolerancia a enfermedades, plagas y condiciones ambientales adversas (Herrera *et al.*, 1997).

La transformación genética puede lograrse mediante diversas técnicas que hacen uso de la capacidad de manipular el genoma a través de metodologías de ADN recombinante. En general, las estrategias de transformación genética de plantas se han agrupado en dos: la transformación mediada por vectores vivos y la transferencia directa de genes (Herrera *et al.*, 1997).

En la transferencia directa, el ADN exógeno se introduce a la célula vegetal mediante diferentes métodos, tales como el bombardeo de tejidos o células con micropartículas cubiertas de ADN (biobalística), la permeación de membranas celulares al ADN inducida por corrientes eléctricas (electroporación), tratamientos químicos (polietilenglicol), abrasión con fibras de silicio, microinyección o láser (Herrera *et al.*, 1997).

Estos métodos, especialmente la electroporación y la transformación mediada por PEG han demostrado ser útiles para introducir ADN con éxito en protoplastos (células vegetales sin pared). Desafortunadamente la regeneración de plantas completas a partir de protoplastos es difícil en algunas especies y frecuentemente es dependiente del genotipo. De las técnicas directas, la más utilizada actualmente para cultivos de células y tejidos es el bombardeo con micropartículas (biobalística). Este método permite la penetración de la pared celular y ha demostrado ser eficiente para muchas especies vegetales. Mediante técnicas de cultivo *in vitro* las células transformadas se desarrollan para finalmente dar origen a una planta completa (Herrera *et al.*, 1997).

Para que la transformación genética de plantas cumpla con los objetivos para los cuales ha sido desarrollada, es decir, para que sea efectiva como herramienta en los programas de mejoramiento de cultivos, deben tenerse en cuenta las siguientes consideraciones:

- Se debe desarrollar un sistema de regeneración de plantas completas a partir del explante que va a ser transformado en el laboratorio.

- Debe haber disponibilidad del gen que solucione efectivamente el problema y se debe construir un vector adecuado que contenga todos los genes y secuencias reguladoras requeridas.
- Se debe desarrollar o adaptar un sistema eficiente de transformación y selección de transformantes *in vivo*
- Se requiere la verificación (comprobación) de la integración estable del gen introducido (transgen) mediante técnicas de biología molecular.
- Deben seguirse rigurosa y cuidadosamente las normas y regulaciones de bioseguridad que aseguren que el producto obtenido no es una amenaza para la salud humana o animal ni representan riesgo ambiental alguno.
- Deben considerarse las normas y regulaciones de protección a la propiedad intelectual.
- Debe establecerse un sistema adecuado de enlace con el usuario para la utilización del producto obtenido (Herrera *et al.*, 1997).

3.5.1 El sistema de *Agrobacterium spp.*

Muchas de las plantas transgénicas que se han logrado obtener hasta ahora, provienen del uso de diversos métodos de transformación genética. Entre ellos se tiene un método biológico y natural, basado en el empleo de una bacteria que vive en el suelo llamada *Agrobacterium tumefaciens*. Debido a que inicialmente se pensó que el sistema basado en *Agrobacterium* sólo se podía aplicar a un número limitado de especies vegetales (ahora se sabe que puede no sólo transformar todas las especies vegetales sino también otros organismos como hongos), la supuesta incapacidad de *Agrobacterium* para infectar plantas monocotiledóneas, limitó por mucho tiempo la transformación de cultivos tan importantes como arroz, trigo y maíz (Bolivar, 2004).

Chilton (1977) demostró la presencia de un pequeño fragmento de ADN de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* cuando aislaron tumores axénicos de la agalla de la corona

en tabaco. Con estos experimentos se demostró la capacidad de esta bacteria de transferir ADN entre reinos diferentes. *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*, son bacterias que viven en la mayoría de los suelos y que infectan a un gran número de especies vegetales. Tales bacterias son los agentes causales de las enfermedades denominadas “agalla de la corona” (*A. tumefaciens*) y “raíz pilosa” (*A. rhizogenes*), que se caracterizan, respectivamente, por la formación de un tumor o por el crecimiento anormal de raíces alrededor de zonas heridas.

Agrobacterium tumefaciens y especies relacionadas como *A. rhizogenes* y *A. vitis* son patógenos reconocidos de plantas y tienen la capacidad de integrar establemente parte de su material genético dentro del genoma de su hospedero. Desde el año 1970 hasta nuestros días se ha venido estudiando en detalle el mecanismo por el cual *A. tumefaciens* induce la formación de tumores en plantas y el conocimiento adquirido ha sido fundamental para su uso como herramienta en la ingeniería genética de plantas. Asimismo, esta interacción ha dado pie a formular modelos de señalización celular, transporte célula a célula, importación nuclear de proteínas y ADN y mecanismos de integración genómica (Valderrama *et al.*, 2005).

Tzfira y Citovsky (2006) describen siete eventos fundamentales para la interacción *A. tumefaciens*-planta: (I) reconocimiento y adherencia; (II) identificación de señales de la planta; (III) activación de genes *vir*; (IV) generación del ADN-T; (V) exportación del ADN-T hacia la planta; (VI) importación del ADN-T dentro del núcleo de la planta; (VII) integración del ADN-T dentro del genoma del hospedero.

El mecanismo de infección de *Agrobacterium spp.*, inicia con la penetración de las bacterias a las plantas a través de heridas, se caracteriza porque el microorganismo inserta un segmento de su ADN, denominado ADN-T (ADN de transferencia), en el genoma de las células infectadas, dicho ADN-T— contenido en plásmidos llamados Ti (inductor de tumores) en *A. tumefaciens*, y Ri (inductor de raíces) en *A. rhizogenes*— contiene genes

responsables de la síntesis de reguladores del crecimiento vegetal, causantes del crecimiento anormal típico de las enfermedades causadas por estas bacterias, y genes para la síntesis de productos inusuales nitrocarbonados denominados opinas, que el microorganismo utiliza como alimento para su desarrollo y reproducción. En el mecanismo infectivo descrito, sobresale que los genes de origen bacteriano contenidos en el ADN-T, no sólo son capaces de integrarse en el genoma vegetal, sino que una vez integrados, son procesados eficientemente por la planta para producir proteínas funcionales. (Bolívar,2004).

La maquinaria molecular necesaria para la producción de ADN-T y su transportación dentro de la célula hospedera comprende proteínas que son codificadas por un grupo de genes bacterianos (*chv*) y genes de virulencia del plásmido-Ti. Adicionalmente se han reportado varias proteínas hospederas que participan en el proceso de transformación mediado por *Agrobacterium*, principalmente durante las etapas posteriores del proceso (transporte intracelular de ADN-T, importación e integración nuclear), ya que *Agrobacterium* adopta los procesos celulares existentes (transporte de proteínas y ADN y reparación de ADN) para transformar a su hospedero (Tzfira y Citovsky, 2006).

La inserción de nuevos genes y sus elementos reguladores en el ADN-T ha permitido la transformación genética de plantas susceptibles con genes de importancia agronómica. Esto a su vez ha servido para el estudio de la función y expresión de genes, y para el desarrollo de plantas con nuevas características (Gelvin, 2003). El principio de transferencia de ADN con *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* ha sido útil para la transformación de especies de plantas dicotiledóneas; sin embargo, deben establecerse ciertas condiciones experimentales para que el sistema de transformación funcione bien en distintas especies vegetales. Las monocotiledóneas generalmente no son susceptibles a *A. tumefaciens*; aunque se ha logrado la transferencia de genes a especies de importancia económica como el arroz (Cheng *et al.*, 1998), el plátano (May *et al.*, 1995), el maíz (Ishida

et al., 1996), el trigo (Cheng *et al.*, 1997) y la caña de azúcar (Arencibia *et al.*, 1998) entre otras. (Citado por Valderrama *et al.*, 2005)

3.5.2 Bombardeo de micropartículas

A partir del diseño de aceleradores de partículas en 1987, surgieron numerosas técnicas de investigación entre las que se encuentra la biobalística. Dicha técnica representa un método físico de transformación y consiste en el bombardeo de tejidos con micropartículas cubiertas con ADN o con cualquier otra biomolécula que se pretenda introducir a células vegetales. Se utilizan microproyectiles de oro o tungsteno (químicamente inertes), cuyos tamaños van desde 1 a 4 μm , que al ser disparados a grandes velocidades pueden atravesar pared y membranas de la célula vegetal bombardeada sin causarle daños letales (Klein *et al.*, 1987). Para acelerar los microproyectiles —y que adquieran un *momentum* (masa x velocidad) suficiente para penetrar a las células blanco— son impulsados a grandes velocidades mediante un choque de gas, que puede derivarse de una explosión química, explosión eléctrica de un gota de agua, o por la descarga de un gas inerte. Las células o tejidos que constituyen el blanco de los proyectiles se disponen de tal forma que presenten la máxima superficie expuesta para el bombardeo, en un área de cerca de 5 cm (Herrera *et al.*, 1997).

Puesto que para el bombardeo es posible utilizar cualquier tipo de explante vegetal, desde células y protoplastos, hasta plántulas completas, pasando por tejidos organizados como embriones y meristemas, en ocasiones se puede incluso prescindir de los métodos de regeneración *in vitro* necesarios para recuperar plantas a partir de células o de segmentos de tejidos indiferenciados. Este método terminó con las dificultades para transformar cereales como el maíz y arroz, y también se ha empleado exitosamente en especies vegetales de gran importancia alimenticia a escala mundial como maíz (Gordon-Kamm *et al.*, 1990), centeno (Vasil *et al.*, 1992), cebada (Wan y Lemaux, 1994), trigo (Castillo, *et al.*, 1990) y avena (Sommers *et al.*, 1992) (Citado por O'Brien y Henry, 2000)

Existen varios factores que afectan la transformación por bombardeo de micropartículas:

1) *Naturaleza de las micropartículas.* Se han utilizado micropartículas de tungsteno y de oro. El tungsteno es un material de bajo costo y disponible en un gran variedad de tamaños. Sin embargo algunos autores creen que es tóxico para algunos tipos de células además de sufrir oxidación en la superficie lo cual puede afectar al ADN que se le adhiere causando su degradación. El oro es un material biológicamente inerte, no es tóxico para las células vegetales y no cataliza la degradación del ADN que se le adhiere, sin embargo es un material de alto costo (Klein *et al.*, 1988).

Finalmente se debe considerar la concentración de las micropartículas. Una concentración muy baja no logrará cubrir el área deseada mientras que un alta concentración puede resultar en la aglomeración de partículas que puedan causar un gran daño a las células blanco (Soutgate *et al.*, 1995).

2) *Adherencia de ADN a las micropartículas.* La adherencia eficiente del ADN a las micropartículas es esencial para el buen transporte del mismo. El método de Klein *et al.*, (1988) involucra la adición del plásmido disuelto en un buffer a una suspensión estéril de micropartículas de tungsteno, seguido por la adición de cloruro de calcio 2.5 M y espermidina 0.1M. La suspensión se sonica para evitar la formación de agregados. Altas concentraciones de ADN producen la aglutinación de las micropartículas, lo cual reduce la frecuencia de transformación.

3) *Transporte de las micropartículas al tejido.* Existen varios factores principales que afectan la velocidad y por lo tanto la penetración de las micropartículas en los tejidos. Estos factores incluyen el vacío aplicado, poder de aceleración y distancia entre el soporte de las micropartículas y el tejido. El intervalo de vacío para obtener buenos resultados se sugiere que sea de 10-280 mmHg según estudios realizados (Klein *et al.*, 1988). Así también, la distancia de las micropartículas al tejido blanco afecta la velocidad de las

mismas y su distribución en el tejido. Mientras más grande sea la distancia entre las micropartículas y el tejido blanco, mayor tendrá que ser la fuerza requerida para impulsarlas a fin de conseguir una transformación eficiente.

4) *Incorporación del ADN introducido en el genoma del huésped*: La expresión del gen depende de varios factores que incluyen la incorporación del ADN externo al genoma del huésped. En la transformación por bombardeo de micropartículas, los niveles de expresión transitoria del gen son mucho mayores a los de la expresión permanente. Siempre que se utilice esta técnica de transformación se deberá estar consciente de que puede conducir a la inicial expresión de la proteína de interés pero el gen externo se perderá en la siguiente replicación del ADN genómico durante la división.

Esta técnica tiene manifiestas limitaciones. Algunas especies oponen una resistencia natural a la penetración de las partículas, dada por cutículas endurecidas, paredes celulares lignificadas o superficies vellosas. Sin embargo, la principal limitación del método continúa siendo la baja relación entre el total de células sometidas al bombardeo y el número de células que logran incorporar el ADN exógeno (Díaz *et al.*, 2006).

3.5.3 Transformación genética de *Taxus* spp.

Actualmente los trabajos de transformación genética para este género se han enfocado en las especies europeas y asiáticas incluyendo principalmente la técnica de *Agrobacterium*. La utilización de *Agrobacterium* ha tenido un éxito limitado en el género debido a que los cultivos celulares contienen múltiples tipos de células en diferentes estados de desarrollo. Aún así un estudio reciente ha demostrado la transformación eficiente y estable de *T. chinensis* y *T. cuspidata* con *Agrobacterium* EHA105 (Vongpaseuth y Roberts, 2007b). Existen muy pocos reportes sobre el empleo de biobalística en *Taxus*. Esta técnica ha sido usada para expresar construcciones con genes reporteros en células en suspensión, sin embargo, se ha encontrado que la optimización de estos modelos es altamente

dependiente de la línea celular, por lo que la estandarización en *Taxus globosa* es indispensable para su aprovechamiento. En la tabla 4 se muestran algunos de los principales trabajos de transformación genética reportados para el género *Taxus* spp.

Tabla 4. Transformación genética de *Taxus* spp.

Especies	Resultados	Referencias
<i>T.baccata</i> <i>T.brevifolia</i>	Transformación genética de <i>Taxus</i> , crecimiento del cultivo en medio libre de reguladores de crecimiento. Análisis por Southern blot confirma la transformación.	Han <i>et al.</i> ,1994
<i>T.brevifolia</i>	Expresión transitoria de GUS en embriones cigóticos transformados con pBI121 y tratados con dimetil sulfoxido	Luan <i>et al.</i> ,1996. Citado por Han <i>et al.</i> , 1999
<i>T.cuspidata</i>	Células en suspensión fueron transformadas con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con el vector pCambia 1302. La eficiencia de la transfección se detectó con un medidor fluorométrico. La eficiencia de la transfección fue incrementada con DMSO al 30% y sonificación durante 30 sec. La selección y mantenimiento de las células se continuó por 3 meses. La inserción del gen <i>mgfp</i> fue detectada por PCR y la expresión de GFP se confirmó por western blot.	Kim <i>et al.</i> ,2000
<i>T. chinensis</i> <i>T.cuspidata</i>	Se transformaron líneas celulares de <i>T. cuspidata</i> con <i>Agrobacterium rhizogenes</i> cepa 15834 que contenía el vector pCambia 1301 y con <i>A. tumefaciens</i> línea EHA105 conteniendo el vector binario pCambia 1305.2. Una línea de <i>T. chinensis</i> se transformó con <i>A. rhizogenes</i> cepa 25818 que contenía el vector binario pCambia 1301. Un análisis de Southern de ambas líneas confirma la integración del DNA-T con los genes <i>gusA</i> . Las dos líneas transgénicas de <i>T. cuspidata</i> se mantuvieron por más de 20 meses y las de <i>T. chinensis</i> por más de 9 meses. La introducción de genes no mostró efecto en el crecimiento y la producción de taxol	Ketchum <i>et al.</i> , 2007
<i>T. cuspidata</i> <i>T.canadensis</i>	Se establecieron las condiciones óptimas para transformar líneas celulares de <i>T. cuspidata</i> y <i>T. canadensis</i> mediante biobalística, utilizando una cámara de alta presión; resultado una eficiente expresión transitoria del gen de la luciferasa bajo el control del promotor constitutivo CaMV35S, un mayor número de disparos y el tamaño de las balas incrementaron esta expresión. Con esta técnica de transformación se muestra la expresión transitoria de los genes reporteros DsRed y β -glucuronidasa bajo el control de los promotores de ubiquitina de maíz y CaMV 35S respectivamente.	Vongpaseuth <i>et al.</i> , 2007(b)

IV. JUSTIFICACIÓN

El producto natural paclitaxol, presente en varias especies del género *Taxus*, ha surgido como un fármaco importante en el tratamiento de diversos tipos de cáncer (ovario, pulmón y mamario). El aprovechamiento de este potente antineoplásico está limitado a nivel mundial por los bajos rendimientos y los altos costos de extracción y producción. En México está presente la especie *Taxus globosa*, la cual presenta una mayor cantidad de paclitaxol que el resto de las especies. A pesar de que existen diversos métodos para la obtención de este metabolito ninguno de ellos es económicamente rentable. El cultivo de tejidos y las herramientas de ingeniería genética parecen ser una prometedora alternativa para incrementar el rendimiento de este importante fármaco. Sin embargo, se ha encontrado que la optimización de los parámetros de transformación es altamente dependiente de la especie y la línea celular, por lo que resulta indispensable el establecimiento de cultivos celulares y protocolos de transformación genética que permitan el óptimo aprovechamiento y explotación de este recurso mexicano.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

-  Transformar genéticamente cultivos celulares de *Taxus globosa* utilizando dos métodos.

5.2 Objetivos específicos

-  Seleccionar el medio de cultivo que permita un óptimo crecimiento de células de *Taxus globosa* en medio sólido y en medio líquido.
-  Determinar la L-50 de Glufosinato de amonio e higromicina de los cultivos *in vitro* de *Taxus globosa*.
-  Transformar por biobalística con el plásmido pCambia 3301 y 1302; células de *Taxus globosa* en medio líquido.
-  Transformar por infección con *Agrobacterium tumefaciens* células en suspensión de *Taxus globosa*.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Ruta Crítica

Los experimentos se llevaron a cabo en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química bajo la asesoría de la M en C. María Teresa de Jesús Olivera Flores.

Para el cumplimiento de los objetivos se siguió la siguiente ruta crítica

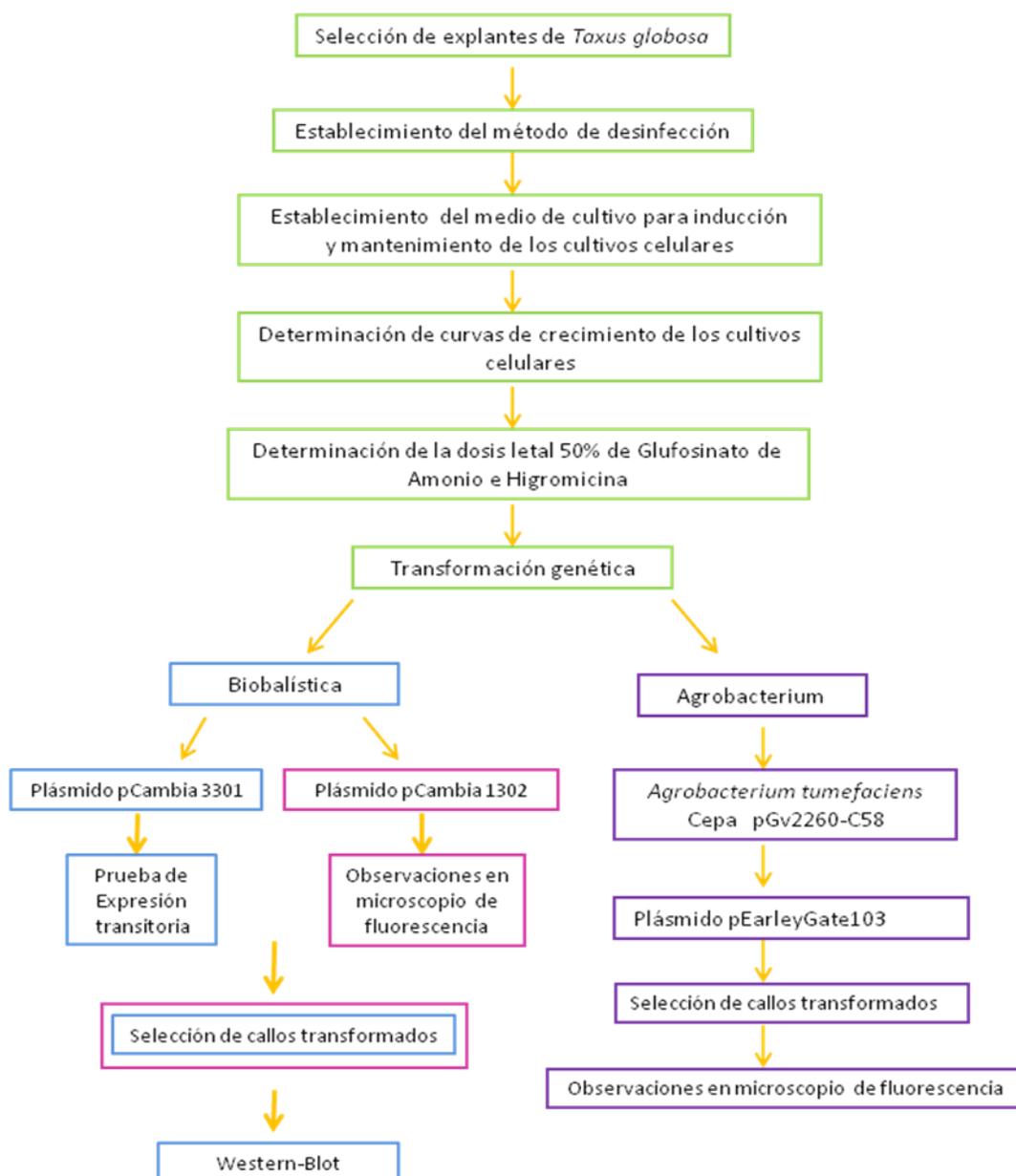


Figura 5. Ruta crítica para obtener células transformadas genéticamente de *Taxus globosa*

6.2 Material Biológico.

Se utilizaron acículas y tallos provenientes de estacas propagadas en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP) así como también ramas que provenían del Parque Ecológico el Chico, Hidalgo.

Las estacas utilizadas durante el presente trabajo fueron seleccionadas con base en el vigor y apariencia física sana, usando solamente aquellas que no presentaran algún daño físico (mordeduras de insecto, marchitamiento, etc.) con el fin de garantizar el establecimiento aséptico del cultivo.

6.2.1 Método de desinfección

Se probaron diferentes métodos de desinfección para los explantes en los cuales se varió la concentración y tiempo de exposición de los agroquímicos. En la tabla 5 se muestran los cinco diferentes tratamientos utilizados para lograr la desinfección de los explantes de *Taxus globosa*

Tabla 5. Métodos de desinfección para los explantes de *T.globosa*

Tratamiento	1	2	3	4	5
Origen del material	El Chico, Hidalgo	INIFAP	INIFAP	INIFAP	El Chico, Hidalgo
Solución jabonosa	5 min	15 min			
Vanish™	1 g·l ⁻¹ , 15 min			4 g·l ⁻¹ , 30 min	
Hipoclorito de sodio / Tritón X-100 / microdyn®	15% / 3 ml·l ⁻¹ / 5 ml·l ⁻¹ 15 min			30% / 3 ml·l ⁻¹ / 5 ml·l ⁻¹ 30 min	
Agri-mycin 500®	2 g·l ⁻¹ , 15 min	4 g·l ⁻¹ , 15 min	4 g·l ⁻¹ , 30 min		
Cáptan®	2 g·l ⁻¹ , 15 min	4 g·l ⁻¹ , 15 min	----	4 g·l ⁻¹ , 45 min	
Benomilo®	----		4 g·l ⁻¹ , 30 min		
Enjuague	3 a 5 veces				
Antibiótico	Cefotaxime, 300 mg·l ⁻¹				

*El modo de acción de cada uno de los agentes químicos y agroquímicos utilizados se especifica en el anexo

Por último, para todos los casos, los explantes fueron cortados en segmentos de aproximadamente 1 cm, eliminando el margen en las acículas y haciendo pequeñas heridas en la superficie con el bisturí para inmediatamente ser sembrados en medio Tax-2 manteniéndose en oscuridad a una temperatura de 25 ± 2 °C.

6.3 Preparación de medios de cultivo

Los medios de cultivo se prepararon a partir de soluciones concentradas 100 X (Anexo). Las sales minerales utilizadas fueron de los medios: Tax-2 y SH (Tabla 6). A todos los medios se les adicionó 3 % de sacarosa, reguladores de crecimiento, vitaminas y aminoácidos, el pH se ajustó a 5.7 en el caso del medio Tax-2 y en el del medio SH a 5.6, con NaOH 1 N o HCl 1 N según fuera necesario. El medio Tax-2 se solidificó con 0.3 % de Gellan-GUM. Los medios se esterilizaron en autoclave vertical a una temperatura de 121°C y a una presión de 1.3 Kg/cm²(17 p.s.i) durante 18 minutos.

En algunos casos los medios de cultivo se adicionaron con antibióticos o alguno de los agentes de selección (glufosinato de amonio o higromicina), previamente filtrados en filtros estériles de nitrocelulosa de 0.22 µm. Los cuales se agregaron a los medios nutritivos después de haber sido esterilizados y enfriados a una temperatura aproximada de 30°C dentro de una campana de flujo laminar, manteniéndolo en agitación para posteriormente repartirlo en frascos o cajas.

6.3.1 Selección de medios de cultivo

Se probaron diferentes medios de cultivo, el primero y al que le denomino Tax-1 fue proporcionado por el Dr. Héctor Barrios del Instituto de Química (tabla 6) para callo y el medio SH para células en suspensión, los cuales son diferentes.

Por otro lado, la Dra. Susana Azpiroz del INIFAP también proporcionó un medio de cultivo, el cuál es el mismo para callo y células en suspensión, pero muy diferente al Tax-1. Se compararon los medios y se decidió que se probarían solamente el medio Tax-1 y SH tanto en callos como en células en suspensión y a estos mismos se le hicieron nuevas modificaciones para tratar de mejorarlos. Para ello se adicionaron otros compuestos, como las vitaminas Kao y Nitsch; los reguladores de crecimiento picloram y cinetina así como el antioxidante polivinilpirrolidona. A a este medio modificado se le llamó Tax-2.

Tabla 6. Medios de cultivo utilizados en la inducción y proliferación de callos de *Taxus globosa*

MEDIOS DE CULTIVO	INSTITUTO DE QUÍMICA			INIFAP
	CULTIVO DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN	Ketchum <i>et al.</i> (1996) Modificado	Ketchum <i>et al.</i> (1996)	
	SH	Tax-2	Tax-1	
Sales inorgánicas	SH	B5	B5	MS
Vitaminas	SH	KAO y Nitsch	KAO	MS
Reguladores de crecimiento	ANA 1.0 mg·l ⁻¹ 2,4-D 0.5 mg·l ⁻¹ BAP 0.05 mg·l ⁻¹	Picloram 1.0 mg·l ⁻¹ Kinetina 1.8 mg·l ⁻¹	ANA 0.3755 mg·l ⁻¹ BAP 0.15 mg·l ⁻¹	2,4-D 1.0 mg·l ⁻¹
Antioxidantes	PVP 10 g·l ⁻¹	PVP 1 g·l ⁻¹	Ác. ascórbico 46.5 mg·l ⁻¹ Ác. cítrico 55.8 mg·l ⁻¹ PVP 360 mg·l ⁻¹	PVP 1 g·l ⁻¹
Otros compuestos	----	Ác. aspártico 127.5 mg·l ⁻¹ Arginina 175 mg·l ⁻¹ Glicina 72 mg·l ⁻¹ Prolina 112.5 mg·l ⁻¹	Glutamina 39.6 mg·l ⁻¹	----
Sacarosa	15 g·l ⁻¹	30 g·l ⁻¹	30 g·l ⁻¹	30 g·l ⁻¹
pH	5.6	5.7	5.5	5.8
Gellan	2.5 g·l ⁻¹	2.5 g·l ⁻¹	2.5 g·l ⁻¹	2.5 g·l ⁻¹
Cultivo recomendado	Células	Callo	Callo/células	Callo/células

6.4 Determinación de las curvas de crecimiento de los callos y células en suspensión de *Taxus globosa*.

Se colocó un gramo de callo en frascos que contenían 15 ml de medio Tax-2 sólido, realizaron tres repeticiones. Los frascos se incubaron en oscuridad a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Cada tercer día se pesaron los callos y se registraron los datos para posteriormente ser graficados.

Para el caso de las células en suspensión se colocó un gramo de callo en matraces Erlenmeyer de 50 ml con 15 ml de medio SH, se realizaron cinco repeticiones, los matraces se incubaron en oscuridad a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Para obtener el valor de peso fresco se pesaron tubos eppendorf de 1.5 ml, después se tomó una muestra de 1 ml de la suspensión cada tercer día, el cual se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min, el sobrenadante se decantó y se pesó la pastilla, posteriormente por diferencia entre el peso de la pastilla y el peso del tubo se obtuvo la ganancia en peso fresco.

6.5 Determinación de la concentración del Glufosinato de Amonio e Higromicina

En la campana de flujo laminar, se transfirió un gramo de callo a frascos conteniendo 15 ml de medio Tax-2 sólido y glufosinato de amonio (0, 20, 35 y 50 mg.l^{-1}) (Sigma-Aldrich). El glufosinato de amonio se incorporó al medio sólido estéril una vez que éste alcanzó una temperatura de aproximadamente 35°C y luego se repartió en frascos. Los frascos se incubaron en oscuridad a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Se realizaron cinco repeticiones para cada una de las concentraciones y se obtuvo el peso final de los callos después de tres semanas, posteriormente por diferencia entre el peso inicial y final se obtuvo la ganancia en peso fresco

En el caso de las células en suspensión, se colocó un gramo de callo en matraces Erlenmeyer de 50 ml con 15 ml de medio SH conteniendo glufosinato de amonio (0, 5, 10,

15 y 20 y 25 mg.l⁻¹) o higromicina (0, 2.5, 4.0 y 5.5 mg.l⁻¹). Los frascos se incubaron en oscuridad a una temperatura de 25 ± 2°C. Se realizaron cinco repeticiones para cada concentración. Para obtener el valor de peso fresco se pesaron tubos eppendorf de 1.5 ml, después se tomó 1 ml de la suspensión, la cual se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min, el sobrenadante se decantó y se pesó la pastilla, posteriormente por diferencia entre el peso de la pastilla y el peso del tubo se obtuvo la ganancia en peso fresco.

6.6 Transformación genética por biobalística

Para la transformación se utilizó el plásmido pCambia 3301 que contiene al gen *uidA* con el promotor constitutivo CAMV 35S del virus del mosaico de la coliflor con el gen de selección *bar* que codifica para la enzima fosfotricina acetiltransferasa de resistencia al glufosinato de amonio®(Anexo)

Se utilizaron cajas Petri desechables (60 x 15 mm) a las cuales se les adicionaron 15 ml de medio Tax-2 aumentando la concentración de Gellan a 3 g.l⁻¹

Un día antes de llevarse acabo la transformación genética, se sembró en el centro de cada una de las cajas aproximadamente 1 cm³ de callo que fue inducido tres meses antes.

La preparación de las partículas de tungsteno para el bombardeo se realizó según Guerreiro-Andrade (1998) (Anexo)

6.7 Preparación de balas con ADN para la transformación genética por Biobalística.

En un tubo eppendorf se depositaron 50 µl de partículas (M5 y M10) las cuales se mantuvieron en agitación constante. Posteriormente vertieron en la pared del tubo 5 µl de ADN (1µg/µl); constituido por el plásmido 3301 o 1302 según fuera el caso.

Se colocaron 50 µl de cloruro de calcio (CaCl₂) 2.5 M en la pared del tubo al lado del ADN sin permitir que se mezclaran. Inmediatamente después se colocaron 20 µl de espermidina (0.1 M) y se mezcló con las soluciones anteriores, después la mezcla se agitó en un vortex por 5 segundos. Por último se centrifugó por 5 segundos y se desecharon 100µl del sobrenadante. Los 25 µl restantes se resuspendieron, y se tomaron 5 µl para cada disparo.

6.8. Bombardeo de callos y explantes de *Taxus globosa* con pistola de baja presión.

El primer ensayo de transformación por biobalística se realizó tomando como referencia el protocolo de co-bombardeo para callos embriogénicos de maíz establecido por Jiménez (2006). En este ensayo se variaron algunas condiciones como se describe en las tablas 7 y 8. El bombardeo se llevo a cabo con una presión de helio de 120 psi y un vacío de 20-22 mm de Hg.

Una vez efectuado llevó a cabo el bombardeo, las cajas se incubaron en la oscuridad a 25 ± 2°C, a los dos días se tomaron dos cajas de cada tratamiento incluyendo los controles y se realizó la prueba de expresión transitoria. El resto de los explantes bombardeados se colocaron en matraces Erlenmeyer de 50 ml con 15 ml de medio SH líquido que contenían 10 mg l⁻¹ de Glufosinato de amonio como agente de selección. Los matraces de mantuvieron en agitación a 100 rpm. En la tabla 7 y 8 se muestran, respectivamente, los diferentes tratamientos y controles utilizados en el primer ensayo de bombardeo.

Tabla 7. Tratamientos usados en el primer bombardeo de callos de *Taxus globosa*

TRATAMIENTOS	DISTANCIA DEL DISPARO (cm)	TAMAÑO DE BALA (µm)	TIPO DE EXPLANTE	NÚMERO DE REPETICIONES
1	13.0	0.7	Callo de acículas	10
2	13.0	0.7	Callo de tallo	10
3	13.0	0.4	Callo de acículas	10
4	13.0	0.4	Callo de tallo	10
5	7.5	0.7	Acículas	10
6	7.5	0.7	Tallos	10

Tabla 8. Controles negativos utilizados en el primer bombardeo a callos de *Taxus globosa*

CONTROLES	DISTANCIA DEL DISPARO (cm)	TAMAÑO DE BALA (μm)	TIPO DE EXPLANTE	NÚMERO DE REPETICIONES
1	13.0	0.4	Callo de acículas	5
2	7.5	0.7	Acículas	5
3	13.0	0.4	Callo de tallo	5
4	7.5	0.7	Tallos	5

En el segundo ensayo se utilizaron sólo balas de 0.7 μm a una distancia de 13 cm. Las condiciones de presión y vacío fueron las mismas que en el primer ensayo.

De igual forma que en el primer ensayo, después del bombardeo las cajas se incubaron en la oscuridad a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, a los dos días se tomaron dos cajas de cada tratamiento incluyendo los controles y se realizó la prueba de expresión transitoria. El resto de los explantes de acícula y tallos bombardeados se colocaron en medio sólido con 35 mg l^{-1} de glufosinato de amonio. Los callos bombardeados se colocaron en matraces Erlenmeyer de 50 ml con 15 ml de medio SH líquido que contenían 10 mg l^{-1} del agente de selección. Los matraces se mantuvieron en agitación a 100 rpm. En la tabla 9 y 10 se muestran, respectivamente, los diferentes tratamientos y controles respectivamente utilizados en el segundo ensayo de bombardeo.

Tabla 9. Tratamientos usados en el segundo bombardeo de callos de *Taxus globosa*

TRATAMIENTOS	DISTANCIA DEL DISPARO (cm)	TAMAÑO DE BALA (μm)	TIPO DE EXPLANTE	NÚMERO DE REPETICIONES
1	13.0	0.7	Callo de acículas	10
2	13.0	0.7	Callo de tallo	10
3	13.0	0.7	Acículas	10
4	13.0	0.7	Células en suspensión	10

Tabla 10. Controles negativos utilizados en el segundo bombardeo a callos de *Taxus globosa*

CONTROLES	DISTANCIA DEL DISPARO (cm)	TAMAÑO DE BALA (μm)	TIPO DE EXPLANTE	NÚMERO DE REPETICIONES
1	13.0	0.7	Callo de acículas	5
2	13.0	0.7	Acículas	5
3	13.0	0.7	Callo de tallo	5
4	13.0	0.7	Células en suspensión	5

En el tercer ensayo se utilizó el plásmido pCambia 1302 conteniendo el gen de selección en plantas *hph* que confiere resistencia al antibiótico higromicina y el gen reportero *gfp* que codifica para la proteína verde fluorescente y el promotor constitutivo CAMV 35S del Virus del Mosaico del Tabaco (Anexo)

Para este ensayo se bombardearon células en suspensión que fueron subcultivadas 8 días antes. Los cultivos se decantaron y las células se colocaron sobre círculos de papel filtro de 3 cm de diámetro en cajas petri desechables (60 x 15 mm) a las cuales se les adicionaron 15 ml de medio Tax-2 aumentando la concentración de Gellan-GUM a 3 g l⁻¹. Para la transformación se utilizaron sólo balas de 0.4 µm y ambas distancias, se bombardearon 20 cajas para cada tratamiento y 10 repeticiones para los controles negativos que sólo contenían balas, también se utilizaron cultivos que no habían sido transformados. Las condiciones de presión y vacío fueron iguales a las de los ensayos anteriores.

Después del bombardeo las cajas se incubaron en oscuridad a 25 ±2°C, a los 5 días se tomaron dos cajas de cada tratamiento incluyendo los controles y se observaron en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse T62000-U. El resto de las células bombardeadas se colocó en matraces erlenmeyer de 50 ml con 15 ml de medio SH líquido que contenían 2.5 mg l⁻¹ del agente de selección higromicina, los matraces se mantuvieron en agitación a 100 rpm en oscuridad. En las tablas 11 y 12 se muestran los diferentes tratamientos y controles respectivamente utilizados en el tercer ensayo de bombardeo.

Tabla 11. Tratamientos usados en el tercer bombardeo de callos de *Taxus globosa*

TRATAMIENTOS	DISTANCIA DEL DISPARO (cm)	TAMAÑO DE BALA (µm)	TIPO DE EXPLANTE	NÚMERO DE REPETICIONES
1	7.5	0.4	Células en suspensión	20
2	13.0	0.4	Células en suspensión	20

Tabla 12. Controles negativos utilizados en el tercer bombardeo a callos de *Taxus globosa*

CONTROLES	DISTANCIA DEL DISPARO (cm)	TAMAÑO DE BALA (µm)	TIPO DE EXPLANTE	NÚMERO DE REPETICIONES
1	7.5	0.4	Células en suspensión	5
2	13.0	0.4	Células en suspensión	5

6.9. Prueba de expresión transitoria de *gus*

A las 48 horas post-bombardamiento se realizó la prueba de expresión transitoria en los callos de *Taxus* para observar de manera temprana la presencia del gen reportero *UidA*, en las células vegetales utilizando el protocolo reportado por Jefferson, 1987, modificando el pH del amortiguador de fosfatos a 8.5 para disminuir la expresión endógena de β -glucuronidasa en los callos de *Taxus*. Posteriormente fueron incubados a 37°C durante 24 horas para observar el producto de la reacción 5-5'dibromo-4,4'dicloro-índigo (azul insoluble). Los resultados fueron recopilados al día siguiente y documentados para su posterior análisis.

6.10. Western Blot.

Los callos transformados y controles fueron molidos en nitrógeno líquido hasta quedar perfectamente pulverizados. Posteriormente se obtuvieron las proteínas solubles totales (PST), las cuales fueron cuantificadas con un filtro de 595 nm con un índice de regresión del $r=0.99$ en el programa Microplate 5.3 Bio Rad®. Las diversas muestras de PST se corrieron en un gel de poliacrilamida al 10% a una concentración de 30 μ g por muestra. Uno de los gels fue teñido con Coomassie 250 durante 30 minutos, y desteñido en agua desionizada estéril durante 24 horas hasta que se lograron observar bandas definidas.

El otro gel fue transferido durante 1.5 h a una membrana de PDVF. La membrana fue teñida con rojo de Ponceau para comprobar el éxito de transferencia, posteriormente fue tratada con las soluciones A y B de Chemicon Restore® para remover los residuos del colorante; terminado el proceso la membrana fue bloqueada en PBS conteniendo leche descremada al 5% durante 1 hora, pasado el tiempo se realizaron 3 lavados con PBS durante 10 minutos y se incubó con el primer anticuerpo anti β -glucuronidasa 1:1,000 (Invitrogen®) toda la noche a 4°C, al día siguiente se repitieron los lavados con PBS y se incubó con el segundo anticuerpo anti-IgG de conejo 1: 10,000 (Sigma®) durante 1 hora,

tras lo cual se repitieron nuevamente los enjuagues con PBS y las placas fueron reveladas con ECL (Amersham Biosciences™) y documentadas para su posterior análisis

6.11. Transformación con *Agrobacterium tumefaciens*

Se utilizó el plásmido pEarleyGate103, que contiene el gen de selección en plantas *bar* que confiere resistencia al herbicida glufosinato de amonio y el gen reportero *gfp* que codifica para la proteína verde fluorescente y el promotor constitutivo CAMV 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (Anexo)

Una colonia de *Agrobacterium tumefaciens* cepa pGv2260-C58 seleccionada en placas de medio YM que contenía 50 mg l⁻¹ de kanamicina fue transferida y crecida durante dos días a 28°C y 250 rpm en 2 ml de medio YM líquido con kanamicina 50mg l⁻¹. Posteriormente se tomó 1 ml de este cultivo y se inocularon 50 ml de medio YM suplementado con 50 mg l⁻¹ de kanamicina. El cultivo se incubó durante toda la noche a 28°C y 250 rpm (OD₆₀₀≈ 0.5) y se centrifugó a 11000 rpm durante 15 minutos, el sobrenadante se desechó y la pastilla se resuspendió en 40 ml de medio SH líquido que contenía acetosiringona (0.4 mg l⁻¹). Las células en suspensión de *Taxus spp* y las de *A. tumefaciens* se mantuvieron en co-cultivo durante 20 minutos. Posteriormente, el medio se decantó y las células se colocaron en medio SH líquido con acetosiringona (0.4 mg.l⁻¹). Después de 2 días los cultivos en suspensión se subcultivaron a medio con los antibióticos timentina 240 mg.l⁻¹, vancomicina 50 mg.l⁻¹ y cefotaxime 250 mg.l⁻¹ donde se mantuvieron los cultivos durante 1 mes, posteriormente se transfirieron a medio de selección con 10 mg l⁻¹ de glufosinato de amonio. Después de 2 meses en selección los cultivos se observaron en el microscopio estereoscópico Nikon Eclipse T62000-U para visualizar la expresión de la proteína verde fluorescente

VII. RESULTADOS

7.1 Desinfección de explantes.

En la tabla 5 de materiales y métodos se muestran todos los tratamientos utilizados en la desinfección de explantes. En un primer ensayo se utilizaron acúculas y tallos de ramas traídas directamente de la reserva ecológica con este tratamiento no se logró la asepsia del tejido, por lo que se decidió utilizar estacas propagadas en el INIFAP para la obtención de los explantes, además de incrementar la concentración de los agroquímicos y de Vanish®. Con este método se logró eliminar el 60% de la contaminación. A pesar de que la asepsia lograda en el tejido era alta, la contaminación remanente se debía principalmente a hongos. Por lo cual se decidió probar un nuevo fungicida de tipo sistémico (Benomil) y aumentar el tiempo de exposición a 30 min. De esta manera se logró disminuir el 70% de contaminación. Por último se probó otro método de desinfección en el cual se aumentaron los tiempos de exposición y la concentración de cada uno de los agentes de desinfección. Además, en este tratamiento se utilizaron dos fungicidas; uno superficial (Captán) y el otro sistémico. Con este tratamiento se eliminó de 95 a 100% de la contaminación.

Sin embargo, cuando se empleó este método de desinfección en ramas que provenían del Parque Ecológico el Chico Hidalgo, la contaminación fue del 100% y estaba constituida principalmente por hongos. Lo anterior indicó que el tejido proveniente del parque ecológico presentaba hongos probablemente endofíticos que no fueron eliminados por los tratamientos en el laboratorio, mientras que los riegos previos y prolongados con fungicida a las estacas que se propagaron en el INIFAP tuvieron menor cantidad de hongos, lo que ayudó a que el tratamiento seleccionado presentara un bajo índice de contaminación.

7.2 Selección de Medios de Cultivo

Los medios utilizados para la inducción y propagación de los cultivos se muestran en la tabla 6 (materiales y métodos). La selección del medio de cultivo se realizó con base en el nivel de oxidación que mostraban los cultivos. El medio Tax-1 mostró un nivel de oxidación alto al igual que el medio proporcionado por el INIFAP. Mientras tanto, la oxidación de los cultivos disminuyó en el medio Tax-2 —que contiene una mayor cantidad de antioxidantes (vitaminas Kao y Nitchs)— al igual que en el medio SH para células en suspensión. Estos resultados se muestran en la Figura 4, en la que se comparan los cultivos en suspensión utilizando los diferentes medios.

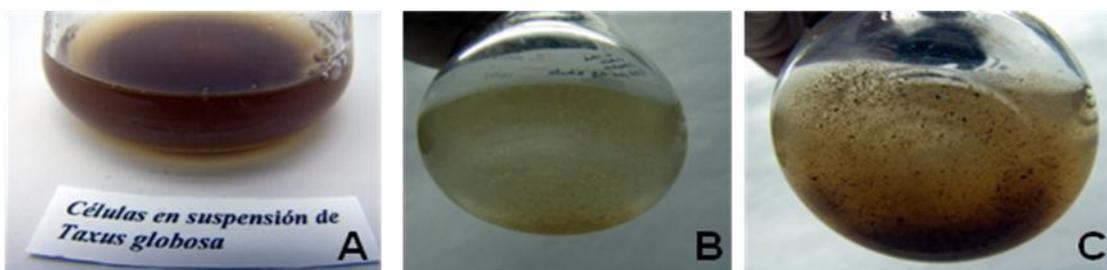


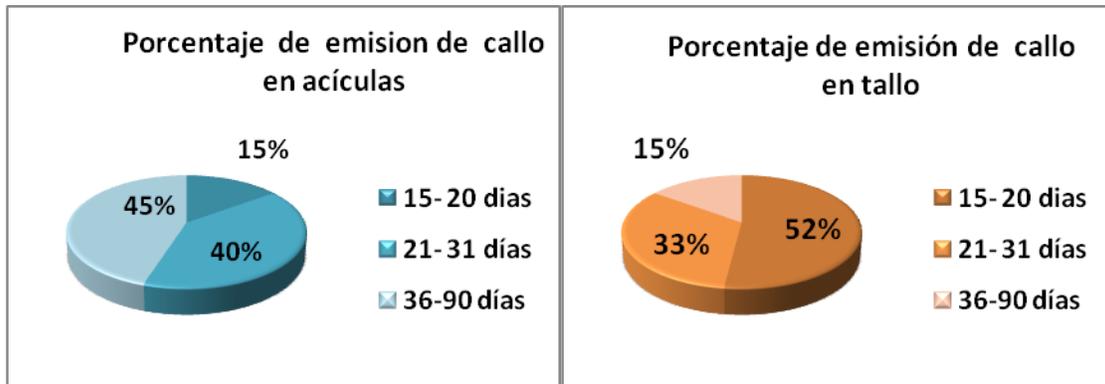
Figura 4. Células de *Taxus globosa* en diferentes medios de cultivo.

A) Medio INIFAP. **B)** Medio SH. **C)** Tax-1

7.3 Inducción, proliferación y mantenimiento de los cultivos de *Taxus globosa*

Después de la desinfección de los explantes; tallos y acículas de *T. globosa* se obtuvieron los porcentajes de formación de callo para ambos explantes (Gráfica 1). Se encontró que a los 20 días de iniciado el cultivo, el 52 % de los explantes de tallos, ya habían generado callo mientras que para los explantes de acículas solo el 15% lo habían hecho. En el intervalo de 21 a 35 días, el 40% de los explantes de acículas formó callo, mientras que en un 33 % de los explantes de tallo generó callo. Por último de 36 a 90 días se presentó el porcentaje más alto de emisión de callo en explantes de acículas y en los tallos el más bajo de 15%. Sin embargo, ambos llegaron a formar callo en un 100% en un lapso de 90 días y la única diferencia entre ellos fue el tiempo que tardaban en responder a la inducción. En

cuanto a las características de los callos tampoco se encontraron diferencias; ambos callos son friables y de color beige.



Gráfica 1. Porcentaje de emisión de callo en explantes de tallo y acículas de *T. globosa*

Los callos generados a los 15 días de siembra fueron subcultivados cada 20 días en medio Tax-2. Sin embargo, la oxidación de los callos era alta cuando se mantenían en frascos de 100 ml y si se transfería una cantidad pequeña de callo, el crecimiento era muy lento por lo tanto todos los cultivos celulares se mantuvieron en recipientes de 50 ml y tubos de ensayo, colocando los callos muy juntos y poniendo una mayor cantidad de medio en los recipientes, de tal forma que el espacio entre el tejido y la tapa del recipiente fuera mínima. De esta manera se obtuvieron cultivos muy prolíferos y con poca oxidación.

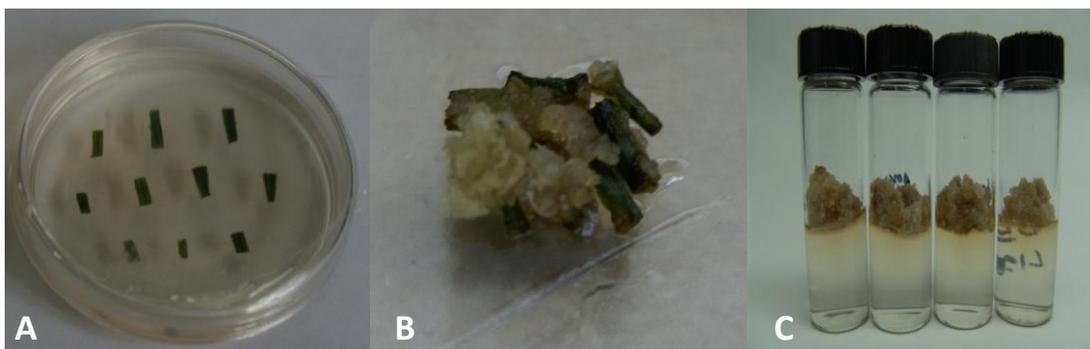
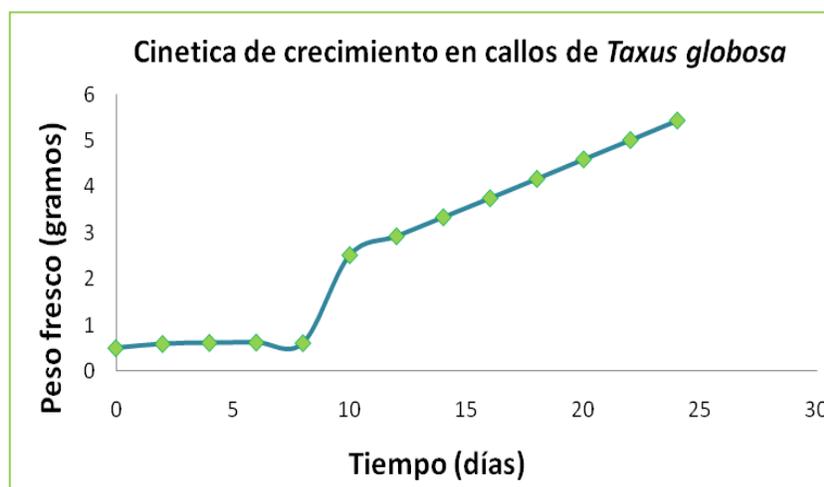


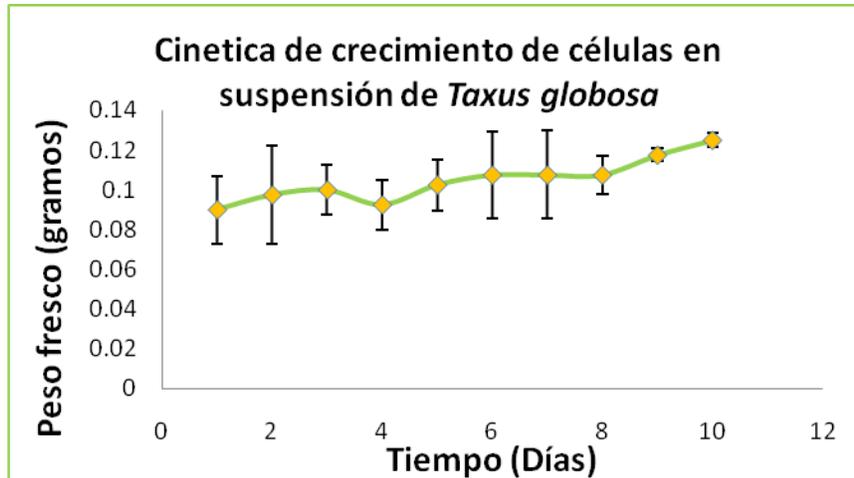
Figura 5. A) Explantes de acículas. B) Callo generado en tallos. C) Mantenimiento de callos de *T. globosa* en viales de 15 ml.

7.4 Determinación de las curvas de crecimiento de los cultivos celulares de *Taxus globosa*.

La curva de crecimiento se hizo utilizando callos que provenían de acículas, tomando como criterio que este es el tejido donde se ha encontrado una mayor cantidad de paclitaxol. Se compararon las cinéticas de crecimiento de callos y células en suspensión de *T. globosa*. La gráfica 2 corresponde al crecimiento de callos. Se observó un crecimiento tipo sigmoïdal. La etapa exponencial o logarítmica se observó en el sexto y séptimo día hasta el décimo día, posteriormente los callos entraron a la etapa de desaceleración en el día 10 y 12 y nuevamente siguió una etapa logarítmica. En esta etapa logarítmica es donde se realizó la transformación genética, esto es, entre el día siete y diez. Para fines de mantenimiento se decidió realizar subcultivos cada 20-25 días. En la gráfica 3 se muestra el crecimiento de células en suspensión, en donde se observó que la etapa de reposo tienen lugar en los primeros ocho días, posteriormente, el cultivo entró en una fase exponencial en la que se alcanzó aproximadamente el doble de peso a los 15 días. En el caso de las células en suspensión la transformación genética se realizó en los días 8 a 12 que corresponden a la etapa exponencial y que se realizaran subcultivos cada 12 a 15 días para el mantenimiento de la línea celular.



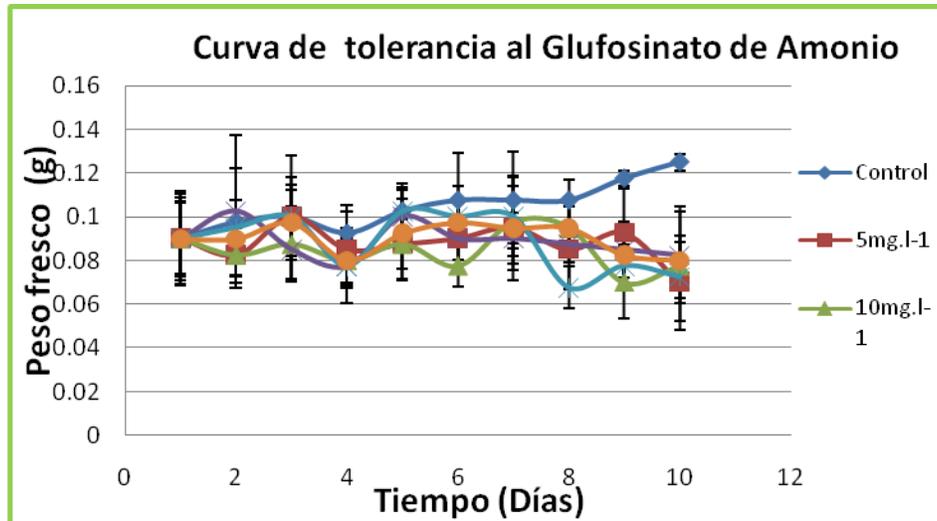
Gráfica 2. Cinética de crecimiento de callos de *T. globosa*



Gráfica 3. Cinética de crecimiento de células en suspensión de *T. globosa*

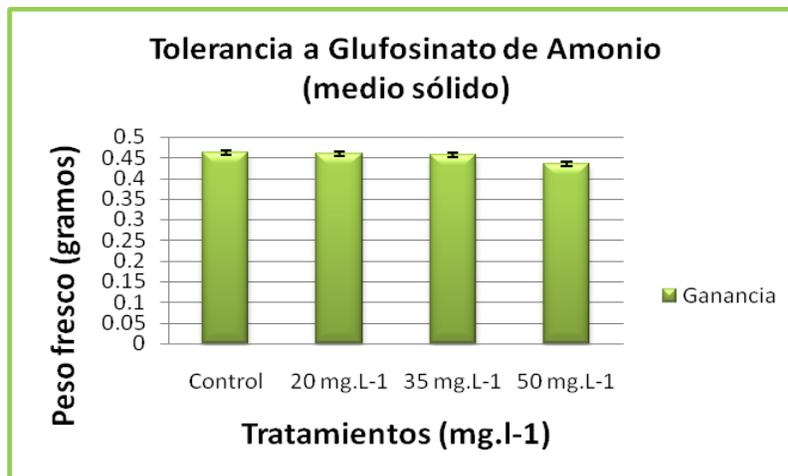
7.5 Determinación de la dosis letal 50% de Glufosinato de Amonio en los cultivos celulares de *Taxus globosa*.

En la gráfica 4 se observa que la etapa exponencial en el tratamiento control (0 mg.l^{-1} de glufosinato de amonio) se presentó a partir del día cuarto al quinto, posteriormente entró a la etapa de desaceleración en el día 6 al 8 y nuevamente siguió una etapa logarítmica. El punto máximo de crecimiento de peso fresco para el control se observó en el día 6. En los tratamientos de 5 , 15 , 20 y 25 mg.l^{-1} se observó un incremento los primeros días (día 1 a 3) sin embargo, en el día 4 todos los tratamientos incluyendo al control sufrieron una caída en el peso. En el día 5 el tratamiento de 15 y 20 mg.l^{-1} tuvo su punto máximo de ganancia en peso fresco (0.1g), mientras que este punto se encontro en el día 7 para el tratamiento de 10 mg.l^{-1} . Es hasta el día 10 cuando el peso fresco cae hasta 0.07 g , mientras que el control en este mismo día llegó a 0.13 g de peso fresco.



Gráfica 4. Curva de tolerancia al glufosinato de amonio en peso fresco de células en suspensión

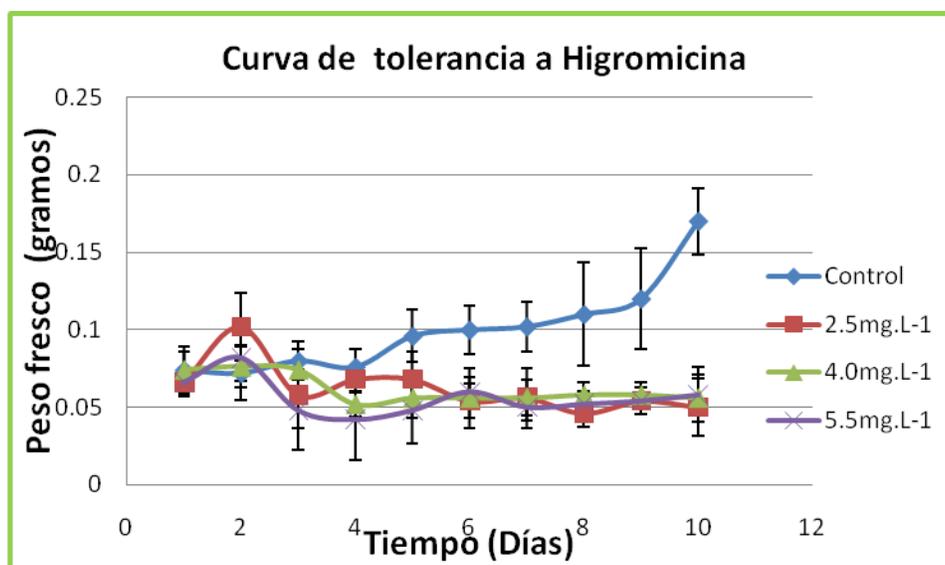
En la gráfica 5 se muestra la ganancia en peso fresco de callos de *T. globosa* crecidas en tres diferentes concentraciones de glufosinato de amonio en medio sólido. Se observó un crecimiento de 0.462 g en el control (0 mg.l⁻¹ de glufosinato de amonio) después de 20 días, el cual es muy similar al tratamiento de 20 mg.l⁻¹ (0.46 g) y sólo 0.010 g abajo del control se encontró el tratamiento de 35 mg.l⁻¹. Por último el tratamiento restante sólo disminuyó 30mg en comparación al control, por lo que no se observó una caída abrupta en la ganancia de peso fresco.



Gráfica 5. Ganancia en peso fresco de callos de *T. globosa* cultivados en tres diferentes concentraciones de glufosinato de amonio en medio sólido.

7.6 Determinación de la dosis letal 50% de Higromicina.

En la gráfica 6 se observó que la etapa exponencial en el tratamiento control (0 mg.l⁻¹ de higromicina) se presentó entre el día cuarto al quinto, posteriormente entró a la etapa de desaceleración en el día 6 al 8 y nuevamente siguió una etapa logarítmica. El punto máximo de crecimiento de peso fresco para el control se observó en el día 10. En los tratamientos de 2.5, 4.0 y 5.5 mg.l⁻¹ se observó un incremento los primeros días (día 1 a 2), sin embargo, en el día 3 el tratamiento 5.5 y 2.5 mg.l⁻¹ tienen una caída en el peso manteniéndose así, a partir del día 6 el peso se mantiene con pequeñas fluctuaciones arriba de 0.05 g. En lo que respecta al tratamiento de 4.0 mg.L⁻¹ la caída en el peso se presentó en el día 4 y se mantuvo constante en 0.05 g. hasta el día 10 cuando el control en este mismo día llegó a 0.16 g de peso fresco.



Gráfica 6. Curva de tolerancia a higromicina en peso fresco de células en suspensión

7.7 Transformación genética por Biobalística.

Debido a que la mayoría de los reportes de transformación genética para *Taxus spp.* se han hecho por el método de *Agrobacterium spp.*, se decidió emplear la biobalística para lograr el objetivo general. El primer ensayo de transformación por biobalística se realizó tomando como referencia el protocolo de co-bombardamiento para callos embriogénicos de maíz establecido por Jiménez (2006),

pero utilizando, en el caso de los explantes de tallo y acículas, una distancia más corta (7.5 cm) y una bala más grande (0.7 μm). Debido a que los tallos de *T. globosa* resultaron demasiado gruesos para el sistema, se decidió no seguir probando la transformación genética con estos explantes. En un segundo ensayo, y con la finalidad de optimizar la transformación, solo se probaron las balas de 0.7 μm , y una distancia de 13 cm. Estas condiciones fueron utilizadas tanto con los explantes de acículas como con células en suspensión y callos.

Debido a los resultados de las pruebas de expresión transitoria para el plásmido pCambia 3301 se decidió utilizar el plásmido pCambia 1302, el cual contiene al gen *gfp* como gen reportero, por lo que la identificación de las células transformadas sería visualizando la expresión de la proteína verde fluorescente. Para este ensayo se bombardearon callos y células en suspensión, utilizando balas de 0.4 μm y distancias de 7.5 y 13 cm.

7.8 Prueba de expresión transitoria de gus.

La expresión transitoria se llevó a cabo de acuerdo al protocolo de Jefferson *et al.* (1987). Con la finalidad de confirmar la transformación de los callos, 24 h después del bombardeo se escogieron al azar dos de los callos bombardeados con el plásmido pCambia3301 y uno de los controles negativos. Estos callos se incubaron por 48 horas en presencia del sustrato X-gluc[®]. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, el control negativo no presentó el color azul índigo, resultado de la acción enzimática de β -glucoronidasa sobre el sustrato del X-gluc[®] (5-bromo-4-cloro-3-indol). En la figura 6 se muestran los resultados y se observa que en ninguno de los tratamientos con el plásmido pCambia 3301 se presentó la coloración azul.

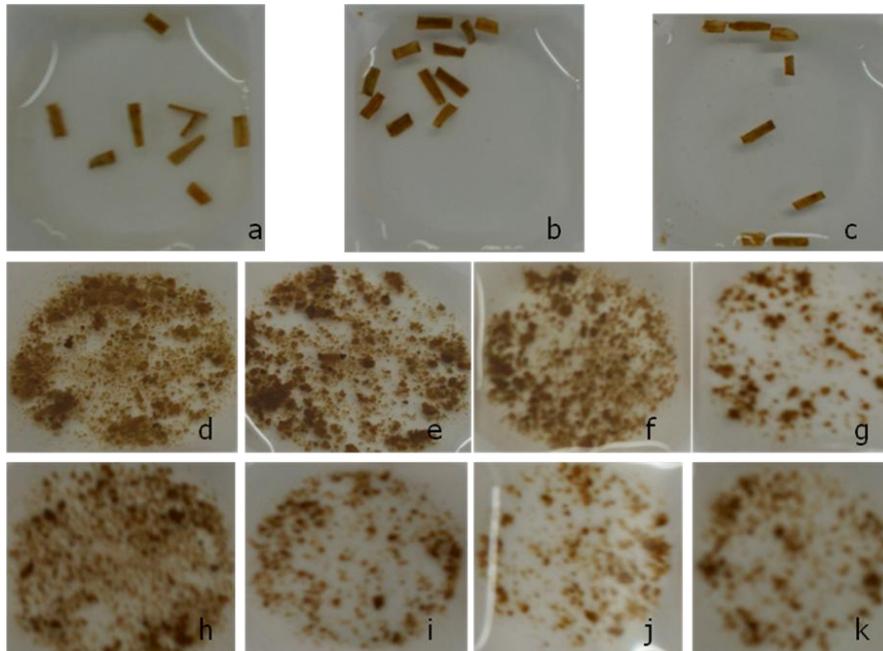


Figura 6. Resultados de la pruebas de expresión transitoria en acículas, callos de tallo y callos de acícula **a)** Acículas bombardeadas con el plásmido pCambia 3301, con balas de $0.7\mu\text{m}$ y distancia de 13 cm, **b),f),j)** Controles negativos (sólo balas), **c),g),k)** Controles negativos (sin bombardeo), **d)** Callo de acículas bombardeado con el plásmido pCambia 3301 con balas de $0.7\mu\text{m}$ y distancia de 13 cm, **e)** Callo de acículas bombardeado con el plásmido pCambia 3301 con balas de $0.4\mu\text{m}$ y distancia de 7.5 cm, **h)** Callo de tallo bombardeado con el plásmido pCambia 3301 con balas de $0.7\mu\text{m}$ y distancia de 13 cm, **i)** Callo de tallo bombardeado con el plásmido pCambia 3301 con balas de $0.4\mu\text{m}$ y distancia de 7.5 cm.

Debido a los resultados anteriores se decidió probar dos pH diferentes pH; 7.0 y 8.5 para el amortiguador de Fosfatos de Sodio en el segundo ensayo de bombardeo. Los resultados se muestran en la figura 7 y 8. Al igual que en el ensayo anterior no se observó ninguna diferencia entre los controles negativos y las células transformadas excepto en las acículas (control) a pH 7.0 donde se logró ver una ligera tonalidad azul que pertenece a la expresión endógena. Sin embargo en los demás explantes no se logró ver esta coloración ni en los controles ni en los explantes bombardeados cuando se encuentran a pH 8.5

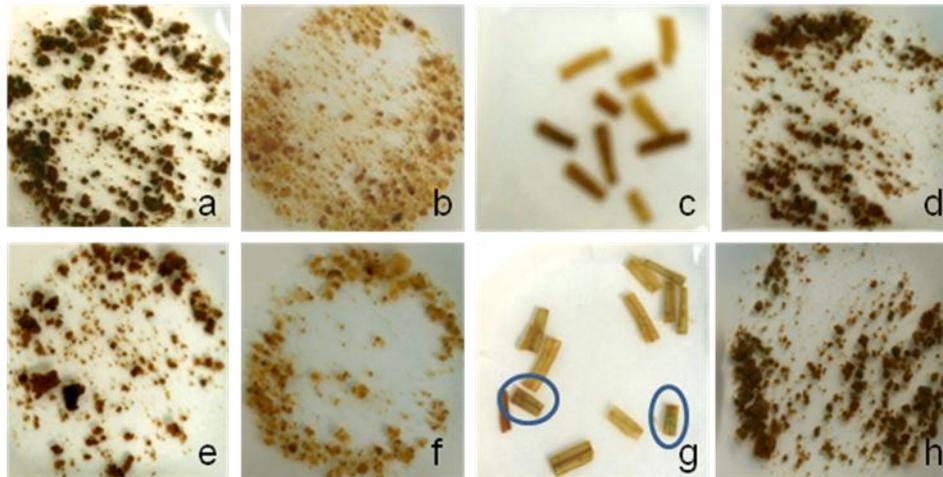


Figura 7. Expresión transitoria con buffer pH 7.0 de explantes bombardeados con balas de 0.7 μm y 13cm de distancia. **a)-d)** Explantes bombardeados, **a), e)** Callos de acículas. **b), f)** Células en suspensión. **c), g)** Acículas. **d), h)** Callo de tallo. **e)-h)** Controles negativos. Los círculos muestran coloración azul tenue.

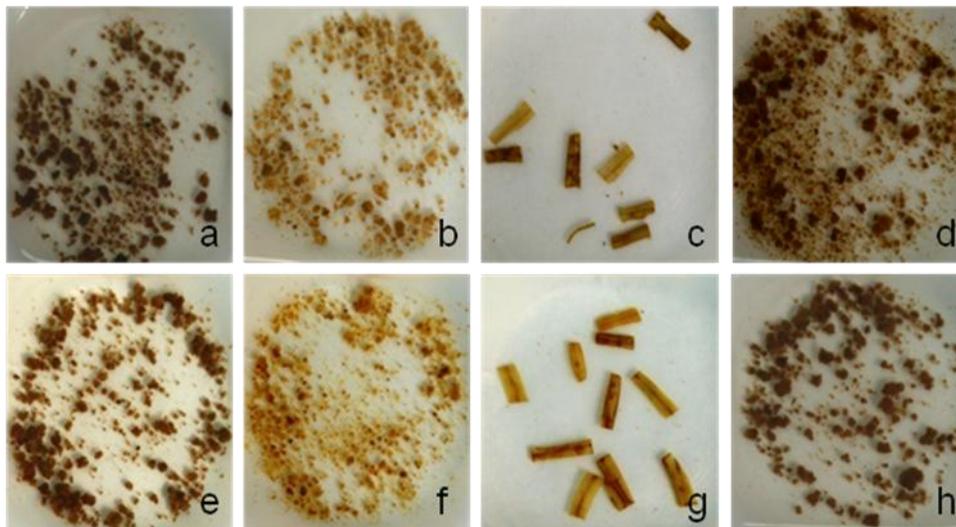


Figura 8. Expresión transitoria con buffer pH 8.5 de explantes bombardeados con balas de 0.7 μm y 13cm de distancia. **a)-d)** Controles negativos. **a), e)** Callos de acículas. **b), f)** Células en suspensión **c), g)** Acículas. **d), h)** Callo de tallo. **e)-h)** Explantes bombardeados.

7.9 Identificación de la proteína β -glucoronidasa en callos de *T. globosa*

De acuerdo a los resultados obtenidos en la prueba histoquímica de la β -glucoronidasa y al no observar la expresión de la proteína en los callos bombardeados, pero que contrario a lo esperado seguían creciendo en medio de selección con 10 mg l^{-1} de glufosinato de amonio, se realizó una extracción de proteína soluble total, para que por medio de un análisis Western blot se confirmara la expresión de la proteína β - glucoronidasa en los callos transformados con el vector pCambia 3301. En la figura 10 se puede observar el patrón proteínico de los callos *Taxus globosa* en un gel de poliacrilamida al 10%, así como el patrón proteínico del extracto crudo de *E. coli* utilizado como control positivo. En un estudio previo realizado por Kusnadi *et al*, (1997) logró expresar la β -glucoronidasa en maíz detectando una banda de aproximadamente 68 kD en tejidos transformados genéticamente. Por tal motivo se utilizó a este tejido como control positivo.

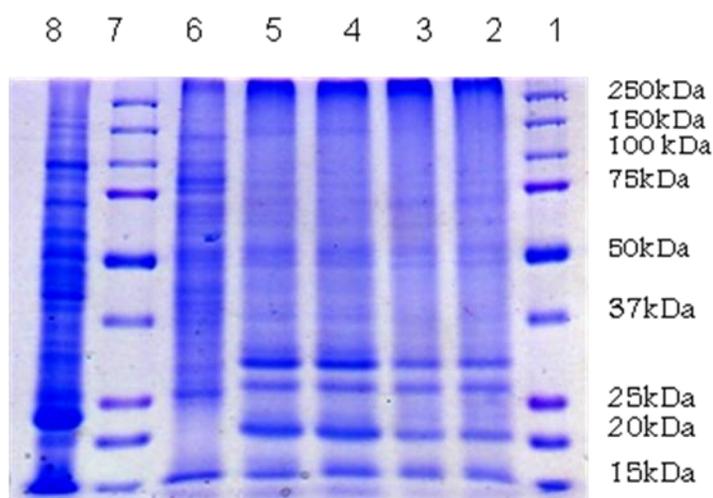


Figura 10. Extractos de PST de callos de *T. globosa* para la identificación de la proteína β -glucoronidasa. **1.** Marcador de peso molecular Dual Color (Bio Rad®). **2.** Callos de tallos de *T. globosa* sin transformar (control negativo). **3.** Callos de acicula de *T. globosa* sin bombardear (control negativo). **4.** Callos de tallo bombardeados con pCambia 3301. **5.** Callos de acicula bombardeados con el plásmido pCambia 3301. **6.** Control positivo. Callos embriogénicos de maíz transformados con el vector pCambia 3301. **7.** Marcador de peso molecular Dual Color (Bio Rad®). **8.** Extracto crudo de *E. coli*. (control positivo).

En la figura 11 se muestra el western blot en los callos de *T. globosa*, en el carril 6 se muestran tres bandas de las cuales una presentó un peso molecular de 68 kD, correspondiente al de la proteína β -glucoronidasa (Kusnadi et al, 1997). En el carril 8 se muestran dos bandas una de ellas de aproximadamente 73 kD que es similar a la reportada por Jefferson *et al*, 1986 .En los carriles 2 a 5 correspondientes a los callos de *T. globosa* no se observa ninguna banda, ni en lo controles negativos ni en aquellos callos bombardeados con balas 0.7 μ m y 13 cm sometidos a 3 meses con el agente de selección glufosinato de amonio

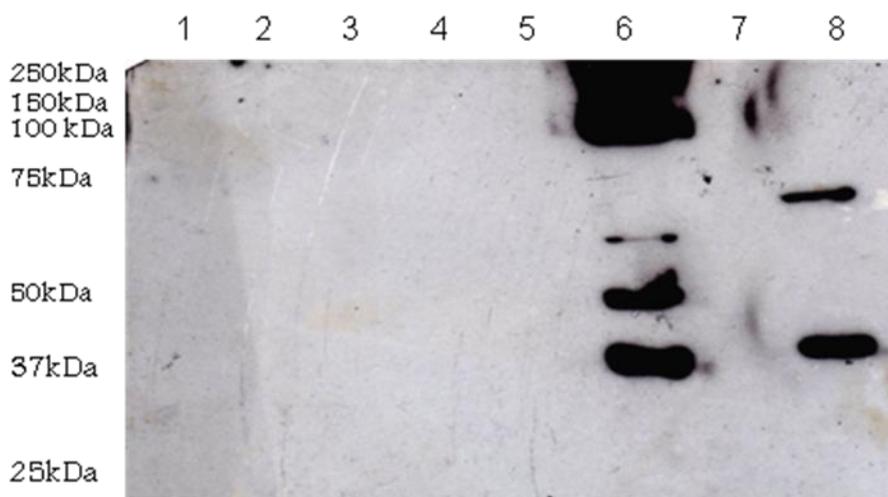


Figura 11. Western blot de callos de *T. globosa* para la identificación de la proteína β -glucoronidasa. **1.** Marcador de peso molecular Dual Color (Bio Rad®) **2.** Callos de tallos de *T. globosa* sin transformar (control negativo). **3.** Callos de acicula de *T. globosa* sin transformar(control negativo). **4.** Callos de tallo transformados con pCambia 3301. **5.** Callos de acicula transformados con pCambia 3301. **6.** Callos embriogénicos de maíz transformados con el vector pCambia 3301 (control positivo). **7.** Marcador de peso molecular Dual Color (Bio Rad®). **8.** Extracto crudo de *E. coli* (control positivo).

7.10. Observación de la proteína verde fluorescente.

Debido a que los resultados de los anteriores bombardeos se decidió utilizar el plásmido pCambia 1302. Para el bombardeo se utilizaron sólo células en suspensión. Se probaron ambas distancias (13 y 7.5 cm) y balas de 0.4 μ m. Después de 15 días post-bombardeo y en selección los explantes se observaron en un microscopio estereoscópico de fluorescencia

Nikon Eclipse T62000-U. Los resultados se muestran en la figura 12. Como se puede observar en el control negativo (A) las células presentan autofluorescencia sobretodo en las paredes, sin embargo la intensidad luminosa es mayor y más brillante en aquellas células que se bombardearon bajo las dos diferentes condiciones (C y D) y muy parecidas al control positivo (B)

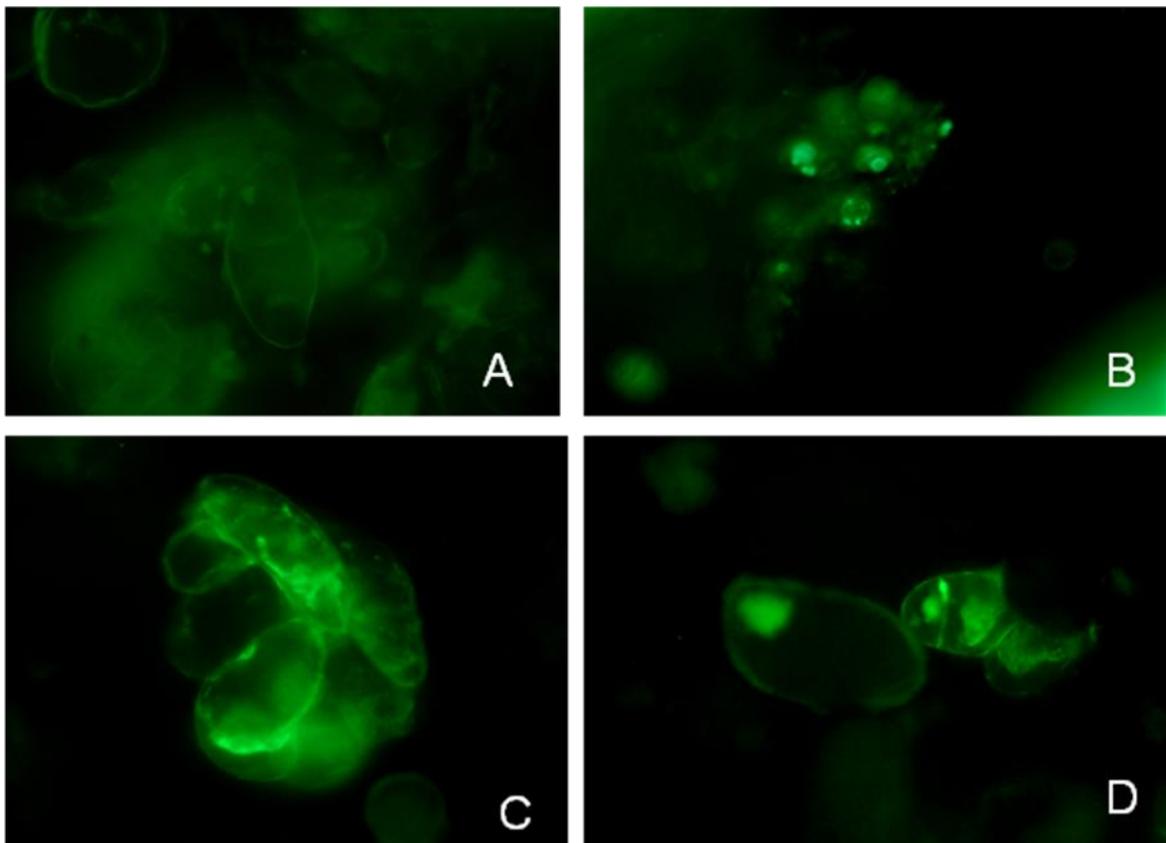


Figura 12. Células en suspensión de *Taxus globosa* transformadas por biobalística con el plásmido pCambia 1302. **A.** Control negativo (células en suspensión sin transformar) **B.** Control positivo (Callos de *Arabidopsis thaliana* DXS transformada). **C.** Células en suspensión transformadas (balas de 0.4 μm y distancia de 13cm) **D.** Células en suspensión transformadas (balas de 0.4 μm y distancia de 7.5cm)

5.11. Transformación genética por medio de *Agrobacterium tumefaciens*.

Después de la transformación con *Agrobacterium tumefaciens*, las células se mantuvieron durante dos meses en medio de selección con 10 mg l⁻¹ de glufosinato de amonio, pasado

este tiempo las células se observaron en el microscopio estereoscópico de fluorescencia Nikon Eclipse T62000-U. Los resultados se muestran en la figura 13 en donde se observa la fluorescencia en las paredes de las células (Figura13 A). Sin embargo este color es menos brillante e intenso que en las células transformadas (figura 12 C y D)

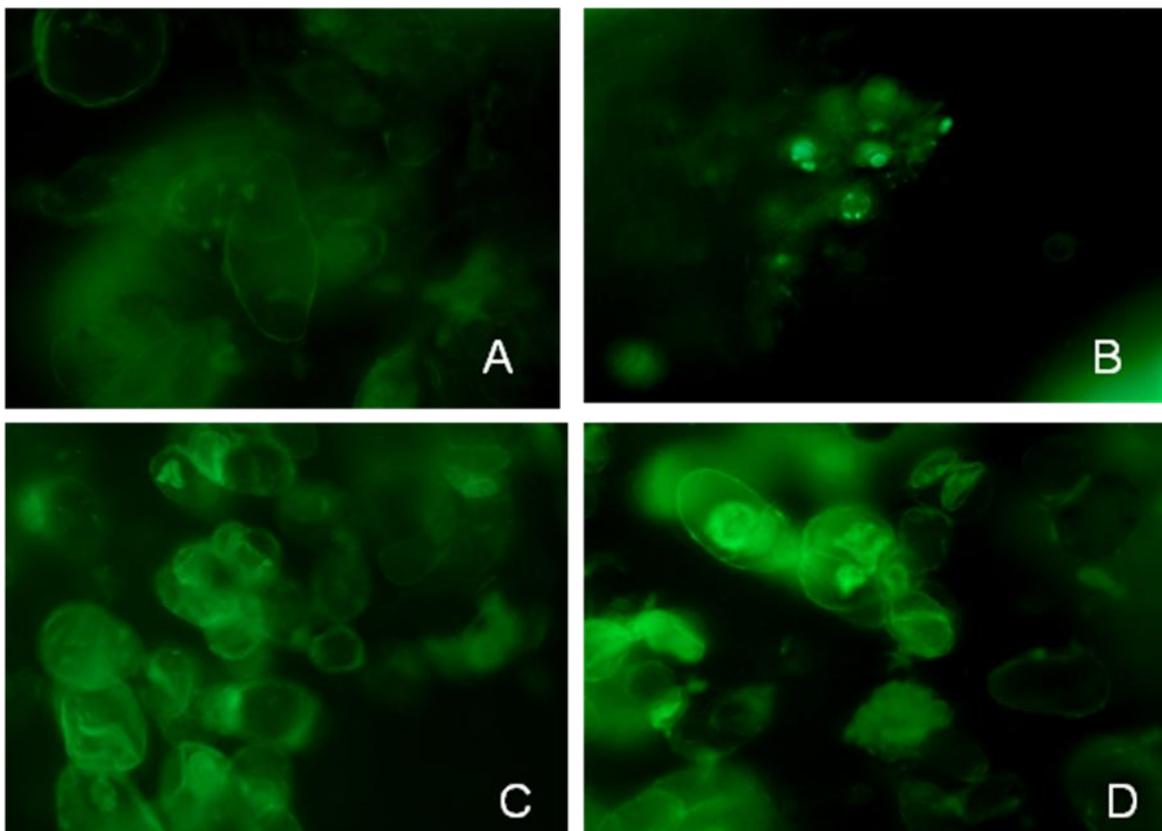


Figura 13. Células en suspensión de *Taxus globosa* transformadas con *Agrobacterium tumefaciens* con el plásmido pEarleyGate103. **A.** Control negativo (células sin transformar) **B.** Control positivo (Callos de *Arabidopsis thaliana* transformada). **C.** Células en suspensión de tallo transformadas. **D.** Células en suspensión de acículas transformadas.

VIII. DISCUSIÓN

8.1 Desinfección de explantes

Los explantes utilizados para establecer un cultivo de células vegetales provienen, generalmente, de plantas crecidas en ambientes no controlados. Por lo que presentan contaminación tanto de tipo abiótico (polvo, residuos de tierra, etc.) como de tipo biótico (hongos y bacterias). El primer tipo es de fácil eliminación, pues basta con lavar el tejido en agua corriente (George y Sherrington, 1984; Pierik, 1990), pero el segundo, requiere de diversos tratamientos, ya que en este caso la contaminación puede ser superficial o sistémica. Para lograr la asepsia total del explante se recomienda el uso de bactericidas y fungicidas (George y Sherrington, 1984; Pierik, 1990; Uribe, 1998). Contar con explantes totalmente libres de contaminantes de tipo biótico es de suma importancia, porque en el establecimiento, crecimiento y mantenimiento de los cultivos de células vegetales se utilizan medios ricos en diversos nutrientes y dada la diferencia de velocidad de crecimiento de las células vegetales y de los microorganismos, en caso de contaminación, éstos dominarían el cultivo ya que presentan mayor crecimiento que las células vegetales (Alvarado, 1998). En el caso de *Taxus globosa*, primero se realizó una desinfección química superficial con cloro, Tritón X-100, Vanish™ y Microdyn®. Pero la cantidad, tipo y distribución de los contaminantes fue muy abundante. Razón por la cual, éstos compuestos sólo fueron efectivos a concentraciones y tiempos mayores que los comúnmente utilizados cuando los explantes utilizados se toman de estacas crecidas en invernadero. Aún cuando el tratamiento químico aplicado fue de considerable intensidad, no se logró erradicar la contaminación sistémica, por lo que se utilizaron dos fungicidas y un bactericida; así como la adición de antibiótico al medio de cultivo. Lo anterior permitió la desinfección del explante en un 95- 100 %, pero sólo cuando los explantes procedieron de material propagado en invernadero.

8.2 Selección de Medios de Cultivo

Es importante recalcar que existen muchos factores que influyen en la formación de callo como son los micro y macro elementos del medio de cultivo, las vitaminas, los reguladores de crecimiento, las condiciones de cultivo y los explantes involucrados. Todos los elementos interactúan para modular la expresión genética, es por ello que la respuesta morfogénica no recae en un solo factor, sino que es el resultado de interacciones, aún

cuando uno de ellos tenga mayor efecto. Por lo anterior en este trabajo se diseñaron experimentos para seleccionar la relación y tipo de componentes del medio de cultivo. Como primera aproximación se utilizó el medio TM10 reportado por Ketchum y Gibson (1996) denominado como Tax-1 en este trabajo. A este medio se le hicieron algunas otras modificaciones como la eliminación de la 6-benciladenina (BA) y la adición del polivinilpirrolidona (PVP) 1 g l^{-1} el cual había sido utilizado como antioxidante en otros cultivos dentro del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales y a este medio se le llamó Tax-2, con este medio de cultivo se logró inducir y proliferar los cultivos celulares sólidos de *T.globosa*.

La optimización de la composición del medio de cultivo para las células en suspensión de *Taxus* ha sido estudiada y revisada. Entre los diferentes medios de cultivo usados, el incremento en el contenido de nitrógeno, el alto contenido de glucosa (2-3%) y la adición de reguladores de crecimiento como auxinas y citocininas en proporción de 100:1 es generalmente benéfico para el crecimiento y la producción de paclitaxol, sin embargo en este trabajo la proporción utilizada fue 1:1. En adición, la acumulación de paclitaxol se incrementa significativamente cuando las células en suspensión de *Taxus* son incubadas en oscuridad (Vongpaseuth y Roberts, 2007a). En este trabajo se utilizó el medio de cultivo denominado SH para las células en suspensión, que fue proporcionado por el Instituto de Química, el cual además de aumentar la proliferación celular también redujo oxidación como se muestra en la figura 4.

8.3 Inducción, proliferación y mantenimiento de los cultivos de *Taxus globosa*

Como ya se mencionó, los dos explantes —hoja y tallo— fueron capaces de producir callo, aunque el tiempo de respuesta fue diferente. La inducción en los tallos fue más temprana que en las acículas. Debido quizá a la presencia de mayor número de células con actividad meristemáticas en el tallo que en las acículas. El tallo presentó entrenudos y nudos. Los entrenudos contienen cuatro tipos de meristemas (marginales, intercalares, de engrosamiento primario y de alargamiento) con una actividad muy duradera, ya que están

involucrados en el engrosamiento y el alargamiento. Los nudos presentan los meristemas llamados apicales-axiales en constante actividad, que puede ser ilimitada ya que son los encargados del crecimiento continuo y el desarrollo de la planta. En contraste las acículas contienen un sólo meristemo (foliar) el cual es importante en la formación de órganos y al llegar a su completa diferenciación termina su actividad (Ramos, 2006).

En cuanto a la proliferación y mantenimiento de callo, estos parámetros fueron afectados directamente por la cantidad de oxidación que el cultivo presentaba pues si la oxidación era muy alta evitaba que los callos proliferaran. Esta oxidación se observó como coloración café, debido a la liberación de sustancias fenólicas en la superficie de los explantes, que pueden intoxicarlos y provocar su muerte. Para evitar la acumulación de fenoles en el medio de cultivo, se optó por adicionar antioxidantes al medio para que la oxidación fuera mínima. Los antioxidantes son agentes reductores con bajo potencial redox, neutralizan la acción oxidante de una molécula inestable (radical libre) sin perder su propia estabilidad electroquímica. Dentro de los antioxidantes comúnmente utilizados están: el ácido ascórbico, el ácido cítrico y la cisteína, además de compuestos con alta afinidad por sustancias fenólicas como el pirogalol y el carbón activado (Perez, 1998). En este caso se utilizó el PVP, las vitaminas Nitsch y Kao, previamente utilizados en el grupo de trabajo. Sin embargo, a pesar de la adición de los agentes reductores, la oxidación persistía por lo cual, los cultivos se colocaron en recipientes pequeños (50ml), o menos, esto provocó que hubiera muy poca cantidad de oxígeno dentro del frasco, con lo cual la oxidación disminuyó incrementándose el crecimiento, además de esto la cantidad de callo que se colocaba en los frascos era de aproximadamente 1.5 a 2.0 g, lo cual también favoreció el crecimiento. Las células en suspensión produjeron menor cantidad de fenoles ya que cuando las células se encuentran en medio líquido, los fenoles son liberados al medio mezclándose con él y evitando que estos se acumulen en un solo lugar y que afecten al tejido como ocurre en el medio sólido.

8.4 Determinación de las curvas de crecimiento de los callos y células en suspensión de *Taxus globosa*.

Hasta ahora no hay reportes de cinéticas de crecimiento como las que en este trabajo se presentan, por lo que es difícil comparar el crecimiento de los cultivos de *Taxus globosa* con otras especies pertenecientes al mismo género. La utilización de cinéticas de crecimiento es fundamental para la transformación genética ya que permiten determinar el momento en que ésta se debe de llevar a cabo y es específica de cada cultivo. La etapa exponencial es la recomendada para la transformación genética debido a que en este momento la mayoría de las células se encuentran en constante división, los núcleos son más prominentes y las paredes más laxas por lo que la entrada e integración del ADN foráneo al genoma de la planta es más probable. Además de esto, las curvas de crecimiento permiten determinar los periodos de subcultivo que deben tener los cultivos celulares para su mantenimiento y proliferación así como las etapas de desaceleración y estacionaria en las que usualmente se sintetizan los metabolitos secundarios (Olivera, 2003)

La cinética de crecimiento del cultivo de callo de *T. globosa* (gráfica 2) se asemeja a una curva sigmoideal, que presenta una etapa *lag* o de reposo, reportada por George y Sherrington (1984), en la que el inóculo no presenta ninguna señal de división celular, donde únicamente se está adaptando a las nuevas condiciones de nutrición, que en este caso duró aproximadamente 8 días. Posteriormente se observó una línea recta con una tendencia ascendente, a partir del día 8 al 10 que pertenece a la fase exponencial o lineal, donde la tasa de crecimiento muestra una aceleración constante debido a un proceso mitótico aumentando la actividad respiratoria, mediada a través del consumo de O₂ y con altos niveles de RNA, como lo menciona Lindsey y Jones (1989). En esta etapa se llevó a cabo la transformación genética de los callos de *Taxus globosa*. Después existe una corta etapa de desaceleración (día 10 a 12), sin que se observe de manera clara, la fase estacionaria. A partir de este punto, los callos entran a un nuevo ciclo de división celular, alcanzando 10 veces su peso inicial a los 25 días. Para los cultivos en suspensión se

observa igualmente la etapa de reposo se observó durante los primeros ocho días. Posteriormente el cultivo entra en una fase exponencial alcanzando aproximadamente el doble de peso a los 15 días. Sin embargo, este crecimiento parece lento al compararlo con el de otros microorganismo como *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* cuyas tasas de crecimiento son más altas (Homare, 2006)

8.5 Determinación de la dosis letal 50 % de glufosinato de amonio e higromicina

La mayoría de las estrategias para la selección de células transformadas está basada en la inhibición del crecimiento de células no transformadas o de tipo silvestre sin afectar significativamente a las que si están transformadas; es decir, se hace uso de un sistema de selección positiva, de ahí que la elección de un correcto gen de selección sea crítico para un sistema eficiente de transformación genética (Klein *et al.*,1993;Vasil,1994). Dos criterios que determinan un buen gen de selección son: a) selección limpia y b) no tener efectos adversos en la regeneración y fertilidad de las plantas (Vain *et al.*,1995). Además, para un sistema de transformación eficiente se requiere que el gen de selección esté regulado por un promotor fuerte. (Russell *et al.*,1992)

La determinación de la dosis letal 50 para los agentes de selección representa un punto crítico en el proceso de transformación de plantas, en este trabajo se utilizaron dos agentes de selección —glufosinato de amonio e higromicina— dependiendo de la construcción de plásmido que se utilizara para la transformación genética (ANEXO).

El glufosinato de amonio (también conocido como fofinotricin), el componente activo de los productos comerciales Liberty® tiene una estructura química similar a la glutamina y actúa como inhibidor competitivo reversible de la glutamina sintetasa. Esta enzima juega un papel fundamental en la asimilación del amonio y en la regulación del metabolismo del nitrógeno en las plantas y es la única enzima vegetal que puede desintoxicar el amonio liberado por la reducción del nitrato, la degradación de aminoácidos y la fotorespiración. Por tal motivo, al inhibir la glutamina sintetasa con estos compuestos, la célula vegetal se

intoxica por la acumulación de amonio en la planta y por lo tanto hay muerte celular (O'Brien y Henry 2000).

La sensibilidad del crecimiento al glufosinato de amonio se realizó en medio sólido y líquido. Este compuesto fue ineficiente como agente de selección para células cultivadas en medio sólido (gráfica 5), ya que la concentración a la que se obtuvo una pequeña inhibición en el crecimiento (30 mg). Esta ineficiencia se puede deber a que los callos en medio sólido no se encuentran en una monocapa por lo que las células que estaban más alejadas del medio de cultivo, tardarían mucho más tiempo en responder al tratamiento y lograrían dividirse por más tiempo, lo que produjo una selección poco astringente. En cuanto al medio líquido, este permite que las células se encuentren en contacto directo con el agente de selección por lo cual las concentraciones de glufosinato de amonio al que se observó inhibición del crecimiento celular fueron más bajas (0, 5, 10, 15, 20 y 25 mg l⁻¹), encontrando que a pesar de que en todas estas existieron fluctuaciones en la ganancia de peso fresco, la respuesta al agente de selección se observó hasta los 10 días de exposición en todas las concentraciones. Actualmente ninguno de los trabajos reportados referentes a la transformación genética de *Taxus* ha utilizado el glufosinato de amonio como agente de selección.

El antibiótico Higromicina tiene su sitio intracelular de acción en la subunidad ribosómica 30s, que provoca error de lectura del RNA mensajero con producción de una proteína anómala, la cual aunado a la fuga de sodio, potasio y otros componentes esenciales producen la muerte celular.

Con respecto a la higromicina, las pruebas con este agente de selección solo se hicieron en medio líquido ya que permite una selección más astringente. Se probaron concentraciones (0, 2.5, 4.0 y 5.5 mg l⁻¹). El efecto de la higromicina en los cultivos de *T.globosa* se puede apreciar a partir del sexto día con una concentración de 2.5 mg.l⁻¹ (gráfica 6). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Ketchum *et al*, (2007) quienes transformaron células en suspensión de *T. cuspidata*, y reportaron que la

concentración ideal para seleccionar a las células transformadas era de 2.5 mg l⁻¹ del antibiótico.

8.6. Transformación genética de *Taxus globosa*.

La introducción y la expresión de transgenes es esencial para la ingeniería metabólica de los cultivos celulares de *Taxus spp.* Los sistemas de transformación genética en plantas incluyen la utilización de *Agrobacterium spp.*, polietilenglicol, electroporación y biobalística, entre otros. En la transformación por biobalística el tamaño y naturaleza química de la bala son dos de los parámetros a considerar para que la transformación por biobalística sea exitosa. En este trabajo, la utilización de balas de tungsteno de 0.4 µm resultó favorable para la transformación de células en suspensión de *T. globosa* con el plásmido pCambia 1302 (figura 12). Aun cuando existen algunos reportes que sugieren que el tungsteno es tóxico para varios tipos de células, que pueden promover la oxidación y que tiene efecto en la adherencia del ADN, causando mayor degradación en comparación con las balas de oro (Charest *et al.*, 1993). Algunos autores sugieren que el diámetro del proyectil de 0.8-1.2 µm es óptimo para la transformación de células vegetales, mientras que Klein *et al.*, (1989) reportaron que el uso de partículas de oro de 1.2 µm de diámetro resulta en altos niveles de expresión de genes para los cultivos en suspensión de maíz. Estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo han mostrado que la transformación genética con balas de tungsteno de 0.4 µm es eficiente para la expresión de proteínas recombinantes en maíz y sorgo (Jimenez, 2006 y Godinez, 2007)

Para llevar a cabo la transformación por biobalística se utilizaron dos plásmidos: pCambia 3301 y pCambia 1302, ambos contienen el promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor (CAMV35S) del cual se ha reportado que es funcional, para la transformación de *T. cuspidata* y *T. canadensis*, aunque en estos casos sólo se mostró expresión transitoria del gen reportero *uidA* (Vongpaseuth, 2007b).

El plásmido pCambia 3301 contiene como gen reportero *uidA* (β -glucuronidasa), el cual permite la identificación de las células transformadas mediante la prueba de expresión transitoria, debido a la presencia de coloración en los callos transformados. Los callos de *T. globosa* bombardeados fueron capaces de crecer en medio de selección, indicando que habían sido transformados, sin embargo, no fue posible detectar la presencia del gen reportero, ni por coloración, ni por detección inmunológica de la proteína β -glucuronidasa. El resultado anterior podría deberse a que el ensayo utilizado para detectar la presencia de GUS no estuviese optimizado o a que el ADN se fragmentara durante el proceso de transformación y sólo el fragmento conteniendo el gen *bar* que confiere resistencia al agente de selección se insertara en el genoma de las células en cultivo. Para discriminar entre estas posibilidades, el ensayo para detectar GUS fue validado, utilizando células vegetales de maíz transformadas con el plásmido empleado para transformar *T. globosa*. Los resultados demostraron que en las condiciones del ensayo utilizado para *T. globosa* se podía detectar el gen. Lo que permitió descartar la primera posibilidad. Por esta razón, concluyo que en el sistema de *T. globosa* el ADN se fragmentó y solo se realizó la inserción del gen *bar* en una región del genoma que permitió su expresión. Existen reportes en la literatura mostrando que una de las limitaciones de transformar células en cultivo por biobalística reside en que se inserta un alto número de copias del transgen en un mismo *loci* o bien se detecta la inserción de solo una copia del transgen pero con configuraciones complejas, como tándem, repeticiones invertidas, truncadas y secuencias reordenadas y entremezcladas con el ADN genómico (Kholi *et al.*, 2003).

El plásmido pCambia 1302 contiene como gen reportero a la proteína verde fluorescente. La GFP puede ser detectada de manera no destructiva, no requiere un sustrato, permite el monitoreo de la expresión de genes y la localización de proteínas a nivel celular y subcelular en plantas. El uso de GFP como marcador de proteínas ha sido descrito en maíz, tabaco, *Arabidopsis* y Pinos (Citado por Wei *et al.*, 2006). Comparada con el gen reportero (*uidA*) que requiere un sustrato exógeno para la visualización histoquímica, la expresión de GFP puede ser monitoreada directamente en los tejidos vivos. (Wei *et al.*, 2006). Esta

propiedad es importante en la optimización de protocolos de transformación para varias especies de plantas. En este estudio, la proteína verde fluorescente fue usada como un reportero visual para seleccionar las células transformadas de *T. globosa*. La utilización del gen *gfp*, como reportero para transformar células en suspensión, permitió la observación de las células transformadas de manera transitoria 5 días después de transformadas.

El uso de la proteína verde fluorescente como reportero ha estado limitado en la transformación de las especies del género *Taxus*. En el 2000, Kim y colaboradores transformaron células en suspensión de *T. cuspidata* con *Agrobacterium tumefaciens* utilizando el vector binario pCambia 1302, la selección y mantenimiento de las células transformadas se prolongo durante 3 meses y la expresión de la proteína verde fluorescente se confirmó por un análisis de western- blot.

El uso de sistemas biológicos para la transformación de las especies de *Taxus* ha sido aprovechado desde muchos años atrás. Smith (1942) reportó la formación de agallas en los tallos de *T. brevifolia*, *T. cuspidata* y *T. media* inoculadas con *Phytomonas tumefaciens*. Sin embargo, ninguno de estos reportes presentó evidencia de la transferencia de genes al genoma de la planta. El sistema de *Agrobacterium spp* ha sido usado con limitado éxito en el género *Taxus*. Algunos estudios han reportado la transformación de tejidos de plantas silvestres o en cultivo *in vitro*. Han *et al.* (1994) demostraron por primera vez la transformación genética de dos especies de *Taxus*; *T. brevifolia* y *T. baccata*, y la expresión de genes bacterianos transferidos dentro del genoma de la planta por *Agrobacterium tumefaciens*. En 1999 estos mismos autores confirmaron la transformación de tallos de *T. brevifolia* y *T. baccata* utilizando este sistema, y corroboraron la producción de paclitaxol en los callos inducidos de los tallos. La transformación de *Taxus spp.* usando este sistema para la caracterización de genes o la ingeniería metabólica podría presentar ciertos problemas, debido a que los cultivos *in vitro* contienen múltiples tipos de células en diferentes estados de desarrollo. Sin embargo, un estudio reciente ha demostrado una transformación eficiente y estable de *T. chinensis* y *T. cuspidata* a través del co-cultivo con

la cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* (Ketchum *et al.*, 2007; Vongpaseuth *et al.*, 2007b).

En general las células en suspensión de *Taxus spp* son muy sensibles a la invasión de *Agrobacterium spp*. En este sistema de transformación, la densidad y el tiempo de co-cultivo ha resultado ser crítico para la viabilidad de las células vegetales. En este trabajo se utilizo una densidad óptica de 0.5 y un tiempo de co-cultivo de 20 minutos, estos dos parámetros resultaron favorables para la transformación de las células en suspensión de *T. globosa*. Además, la mezcla de los antibióticos timentina 240 mg l⁻¹, vancomicina 50 mg l⁻¹ y cefotaxime 250 mg l⁻¹ permitió la eliminación de la bacteria. La combinación de antibióticos como cefotaxime y vancomicina ha sido usados exitosamente para eliminar *Agrobacterium spp*. El cefotaxime es una cefalosporina que presenta una actividad bactericida de amplio espectro y baja toxicidad a las células eucariontes, este antibiótico ha sido muy usado en el cultivo de tejidos vegetales y un gran número de especies han sido regeneradas en presencia de este antibiótico. En coníferas los resultados son controversiales ya que el cefotaxime parece perjudicar la salud y subsecuentemente el desarrollo de raíces de los cotiledones de *Pinus radiata*, mientras que en *Picea glauca*, *Picea abies*, *Pinus nigra* o *Larix kaempferi* × *L. decidua* este antibiótico no muestra tener un efecto negativo. El antibiótico vancomicina presenta un espectro de actividad limitada contra bacterias Gram positivas, en combinación con el cefatoxime permite controlar el crecimiento de *Agrobacterium spp*. en especies como *Pinus nigra* y *Citrus aurantifolia*, esto confirma que la combinación de diversos antibióticos es la mejor alternativa para eliminar la bacteria. En general el uso de la mezcla cefotaxime, vancomicina, y timentina ha demostrado no ser tóxico para los cotiledones de pinos y favorecen significativamente la obtención de un alto número de cotiledones y formando yemas en la superficie de los cotiledones que están en contacto con el medio (Humara y Ordas,1999).

Otro factor que resultó favorable para la transformación genética de *T. globosa* fue el uso de la acetosiringona (4 mg l⁻¹). Estos resultados concuerdan con otros en donde se indica que la utilización de compuestos fenólicos durante el proceso de transformación genética

con *Agrobacterium* spp. mejoró sustancialmente el porcentaje de infección por la bacteria (Loaiza y Valverde, 2006.). Los compuestos fenólicos, tanto los liberados por las células de la planta cuando ocurre una herida como los de origen sintético; acetosiringona, sirven como inductores o co-inductores de los genes bacterianos *Vir*. Estos compuestos fenólicos son percibidos por la proteína sensora VirA, posteriormente ocurre la trans-fosforilación de la proteína VirG, lo que conlleva a la activación de los transcritores de los genes Vir, permitiendo el transporte e integración del ADN-T (Gelvin 2000 y Stachel *et al.*, 1986; 1985)(Citado por Loaiza y Valverde, 2006.).

Con el transcurso de las investigaciones se ha logrado optimizar los protocolos de transformación para muchas especies vegetales; igualmente, en la actualidad, ambas vías de transformación, biobalística y *Agrobacterium*, presentan ventajas y desventajas que las hacen más o menos convenientes para los distintos fines. En cuanto a la integración del transgen al ADN cromosómico existen diferencias entre ambos métodos. *A. tumefaciens* posee un mecanismo natural muy eficiente para transferir, al núcleo celular, el T-ADN que contiene el transgen y producir una integración aleatoria en regiones cromosómicas con actividad transcripcional. Generalmente los patrones de inserción de transgenes son más sencillos en comparación a los producidos por el método biobalístico. Así, el número de copias que se incorpora es bajo y cuando hay más de una copia, suelen distribuirse en *loci* independientes, lo que facilita la posterior eliminación de las copias no deseadas por segregación. Por otra parte, el mecanismo involucrado hace que se transfiera un segmento de ADN definido: el T-ADN, acompañado de proteínas que lo protegen de la acción de nucleasas. Por el contrario, en el método biobalístico el ADN transferido no está asociado a proteínas, por lo que al ser parcialmente degradado, sólo parte del mismo llega al núcleo donde se produce, con baja eficiencia, la integración al azar en el ADN cromosómico. En este método es común que se produzcan inserciones de varias copias del transgen en un mismo sitio del genoma con distinto grado de reordenamiento de la secuencia del transgen. Por otra parte, cuando se utiliza el método biobalístico, el segmento de ADN plasmídico que se integra al ADN cromosómico no está definido, como

en el caso de T-ADN, sino que es de longitud variable. Finalmente, cabe mencionar que en el caso de *A. tumefaciens*, debido a que se trata de una interacción biológica entre una planta y una bacteria, la dependencia del genotipo es mucho más acentuada, ya que influyen también en la eficiencia de transformación, tanto el genotipo de la planta como el de la bacteria (Díaz *et al.*, 2006). Es conveniente destacar que en ambos métodos la integración del transgen en el genoma se produce al azar. Como consecuencia de ello, diferentes plantas transgénicas provenientes de un mismo experimento, presentan inserciones en distintos sitios del genoma receptor. La aplicación de cualquiera de estos métodos de transformación al mejoramiento vegetal depende, en gran medida, de la disponibilidad de genotipos con muy buena respuesta al cultivo *in vitro*

IX.CONCLUSIONES

- ❏ La desinfección del tejido de *T. globosa* requirió de tratamientos con agroquímicos de tipo sistémico y superficial (Captan, Benomylo y Agrimicyn-50) en concentraciones de 4g l^{-1} para cada uno, tiempos de exposición largos así como el uso de antibióticos adicionados en el medio de cultivo
- ❏ La utilización de medio Tax-2 y los recipientes de volumen pequeño favorecen el crecimiento de los callos de *T. globosa* y disminuyen la oxidación.
- ❏ El medio SH resultó favorable para el crecimiento de las células en suspensión de *T. globosa*
- ❏ La inducción de callo en tallos es más temprana comparada con la de las acículas.
- ❏ El uso del antibiótico higromicina en concentración de 2.5 mg.l^{-1} es mejor agente de selección en comparación con el glufosinato de amonio.
- ❏ La transformación genética transitoria de células en suspensión de *Taxus globosa* por medio de biobalística utilizando el plasmido pCambia 1302 fue posible utilizando balas M5 y distancia de 13 y 7.5 cm.
- ❏ La proteína verde fluorescente demostró ser un buen gen reportero para la identificación de las células transformadas de *T. globosa*.
- ❏ Se lograron transformar células en suspensión de *Taxus globosa* mediante *Agrobacterium tumefaciens*.
- ❏ Se lograron obtener células en suspensión de *Taxus globosa* transformadas transitoriamente mediante biobalística.
- ❏ La mezcla de los antibióticos: cefotaxime, timentina y vancomicina permite la eliminación de *Agrobacterium tumefaciens*

X. ANEXO

PREPARACIÓN DE LAS DE LAS PARTÍCULAS DE TUNGSTENO PARA EL BOMBARDEO DE ACUERDO A GUERRERO-ANDRADE (1998)

1. Se pesaron 60 mg de partículas de tungsteno de 0.4 μ m de diámetro (M5) colocándose en un tubo de centrifuga de 15 ml. De la misma forma se prepararon las partículas de 0.7 μ m de diámetro (M10)
2. A ambos tubos se les añadieron 2ml de ácido nítrico (HNO₃) 0.1 M y se sonicó en hielo durante 20 minutos cada uno.
3. Posteriormente se eliminó el ácido nítrico agregándose 1ml de agua desionizada estéril; la muestra se transfirió a un tubo de 2 ml de capacidad y se sonicó brevemente en ambas soluciones.
4. Las micropartículas se centrifugaron de 10-30 segundos a una velocidad de 10,000 rpm para cada solución.
5. El agua se eliminó, se agregó 1ml de etanol absoluto (100%) y se sonicó brevemente.
6. Las micropartículas se centrifugaron de 10 a 30 segundos a una velocidad de 10,000 rpm.
7. Se eliminó el etanol, se agregó 1 ml de agua desionizada estéril y se sonicó brevemente.
8. Se colocaron 200 μ l de la suspensión en tubos eppendorf.
9. Posteriormente se adicionaron 750 μ l de agua desionizada estéril a cada tubo.
10. Los tubos se almacenaron a -20 °C.

ADSORCIÓN DEL ADN A LAS MICROPARTICULAS (Klein et al., 1988)

1. En tubos eppendorf se colocaron 50 μ l de la suspensión de micropartículas de tungsteno, después se adicionaron los siguientes reactivos uno a uno, agitando bien la suspensión entre cada reactivo.
2. Se adicionaron 5 μ l de ADN (1 μ g μ l⁻¹) como volumen final. Plasmido pCambia 3301. o 1302 según fuera el caso
3. 50 μ l de Cloruro de calcio (CaCl₂) 2.5 M
4. 20 μ l de Espermidina 0.1 M
5. La mezcla se agitó en vortex (velocidad baja) durante 5 min.
6. Posteriormente, se centrifugó en un periodo de 5 a 10 segundos.
7. Se eliminaron 100 μ l del sobrenadante
8. Las micropartículas se resuspendieron en el líquido remanente.
9. Finalmente, se aplicaron 2.5 μ l de las partículas cubiertas con el ADN en el centro del filtro de bombardeo.

PRUEBA DE EXPRESION TRANSITORIA

La prueba de expresión transitoria se realizó de la siguiente manera (Jefferson *et al.*,1987):

1. Los explantes se colocaron en tubos de cristal, a cada uno se le agregó solución de X-Gluc™ hasta que los callos fueron cubiertos totalmente y se incubaron a 37°C ±2°C por un periodo de 48 hrs.
2. La solución se desecho y los callos fueron lavados dos veces con Buffer "Z" pH 7.4
3. Después, se lavaron con etanol al 70% cuatro veces.
4. La clorofila se eliminó con una mezcla de acetona-metanol (1:3) con la cual se lavaron los callos (3-5 veces) haciendo cambios de mezcla.
5. Después los callos se lavaron cuatro veces con Buffer "Z"

COLECTA DE LAS MUESTRAS DE LOS CALLOS.

1. Se etiquetaron tubos eppendorf estériles suficientes para colocar la muestra de los callos.
2. Para cada toma de muestra se limpiaron pinzas y tijeras con alcohol 96% y se seleccionaron callos de color homogéneo y poco oxidado.
3. Se colocaron aproximadamente 100 mg de callo en cada tubo eppendorf con ayuda de las pinzas
4. Las muestras se guardaron a -70 °C en caso de no ocuparse inmediatamente.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

1. En un recipiente con nitrógeno líquido, se colocaron pinzas, espátulas y los tubos eppendorf con las muestras de los callos.
2. Un mortero con pistilo de porcelana estéril, se enfrió previamente con nitrógeno líquido.
3. Una vez que el mortero y el pistilo estuvieron lo suficientemente fríos, se adicionó más nitrógeno líquido e inmediatamente se vertió la muestra de callo. y se procedió a moler
4. A medida que se fue moliendo se agregó más nitrógeno líquido de tal manera que la muestra nunca se descongeló.
5. Cuando se obtuvo un polvo fino y muy homogéneo se procedió a guardarlo en el tubo eppendorf original con ayuda de una espátula previamente enfriada en el nitrógeno.
6. Las muestras se almacenaron a -70°C en caso de no ocuparse inmediatamente.

MODO DE ACCIÓN DE LOS AGENTES QUIMICOS UTILIZADOS EN LA DESINFECCION DE EXPLANTES DE *Taxus globosa*

-  Detergente comercial Vanish®, que contiene como ingrediente activo al peróxido de hidrogeno (H_2O_2), el cual actúa provocando la pérdida de la función de las proteínas bacterianas, además ataca la membrana celular, el ADN y otros componentes teniendo todo ello como consecuencia la muerte celular.
-  El hipoclorito de sodio ($NaClO_2$ al 30% v/v) se utilizó como agente desinfectante ya que actúa sobre proteínas y ácidos nucleicos eliminando hongos, bacterias y esporas
-  Microdyn®(20 ml.L⁻¹), el cual contiene partículas de plata que permanecen suspendidas, que al reaccionar con los grupos SH de las proteínas funcionales y estructurales de las células bacterianas, inhiben la respiración, logrando así matar a las bacterias presentes en la superficie de los explantes
-  Tritón X-100 (agente surfactante), con una concentración de 3 ml.L⁻¹, actúa en la disminución de la tensión superficial, permitiendo la penetración de las otras sustancias desinfectantes, eliminando las ceras de las plantas.
-  Agri-mycin 500 ®, el cual está compuesto por antibióticos como sulfato de estreptomina, clorhidrato de oxitetraciclina y sulfato tribásico de cobre monohidratado, resulta muy importante para la eliminación de bacterias.
-  Fungicida Captan® es superficial, preventivo de amplio espectro con actividad preventiva y curativa y absorción vía radicular y foliar. Interfiere en el mecanismo de respiración de los hongos por lo que inhibe la germinación de las esporas y dificulta el crecimiento y desarrollo micelar.
-  Fungicida Benomilo ® es sistémico y cuyo ingrediente activo es el benomil de amplio espectro, no tóxico para plantas, que actúa sobre una gran variedad de hongos, como: *Ascomycetos*, *Deuteromycetos* y *Basidiomicetos*. Es un inhibidor eficaz en la división celular de los hongos; actúa interfiriendo en la síntesis del ADN, la mitosis y el mecanismo de transmisión de mensajes genéticos del ADN a ARN, pero también actúa sobre tubos germinativos de esporas, distorsionándolos e inhibiendo el crecimiento, genera una fina capa protectora que impide la germinación de nuevas esporas

Tabla 1.SALES DEL MEDIO DE CULTIVO CONOCIDO COMO SH (Schenk & Hildebrandt 1972)
SOLUCIONES DE MACRO Y MICROELEMENTOS, CONCENTRADAS 100X

NOMBRE DEL COMPUESTO	FORMULA	1 l (g)	P.M (g)	CANTIDADES PARA UN LITRO EN	
				MASA (mg)	MOLES (Mm)
SOLUCIÓN A: NITRATOS					
Nitrato de Potasio	KNO ₃	250	101.108	2500	24.72
Fosfato de Amonio	NH ₄ H ₂ PO ₄	30	115.0	300	2.609
SOLUCIÓN B: SULFATOS					
Sulfato de Magnesio	MgSO ₄ .7H ₂ O	40	246.498	400	1.623
Sulfato de Manganeso	MnSO ₄ .H ₂ O	1	169.01	10	0.059
Sulfato de Zinc	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.1	287.54	1.0	3.48x10 ⁻³
Sulfato de cobre	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.02	249.68	0.2	8.01x10 ⁻⁴
SOLUCIÓN C: HALÓGENOS					
Cloruro de Calcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	20	147.02	200	1.3603
Yoduro de Potasio	KI	0.01	166.01	1.0	6.024x10 ⁻³
Cloruro de Cobalto	CoCl ₂ .2H ₂ O	0.01	237.93	0.1	4.203x10 ⁻⁴
SOLUCIÓN D: AC.BÓRICO,MOLIBDATO					
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	0.50	61.83	5.0	0.081
Molibdato de Sodio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.01	241.95	0.1	4.133x10 ⁻³
SOLUCIÓN E: QUELANTES					
Sulfato ferroso	FeSO ₄ .7H ₂ O	2	278.028	15	0.054
Na ₂ EDTA	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₁₀ Na ₂ .2H ₂ O	1.5	372.30	20	0.054

Tabla 2.SALES DEL MEDIO DE CULTIVO CONOCIDO COMO B5 (Gamborg et al, 1968)
SOLUCIONES DE MACRO Y MICROELEMENTOS, CONCENTRADAS 100X

NOMBRE DEL COMPUESTO	FÓRMULA	P.M (g)	CANTIDADES PARA UN LITRO EN	
			MASA (mg)	MOLES (Mm)
SOLUCIÓN I: NITRATOS				
Nitrato de Potasio	KNO ₃	101.108	2500	24.726
Sulfato de Amonio	(HN ₄) ₂ SO ₄	132.146	134	1.014
SOLUCION II: SULFATOS				
Sulfato de Magnesio	MgSO ₄ .7H ₂ O	246.498	250	1.014
Sulfato de Manganeso	MnSO ₄ .H ₂ O	169.01	10	0.059
Sulfato de Zinc	ZnSO ₄ .7H ₂ O	287.54	2.0	6.955x10 ⁻³
Sulfato de cobre	CuSO ₄ .5H ₂ O	249.68	25µg	1.001x10 ⁻⁴
SOLUCION III: HALÓGENOS				
Cloruro de Calcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	147.02	150	0.020
Yoduro de Potasio	KI	166.01	0.75	4.518x10 ⁻³
Cloruro de cobalto	CoCl ₂ .6H ₂ O	237.93	25 µg	1.050x10 ⁻⁴
SOLUCION IV: FOSFATO, AC.BÓRICO, MOLIBDENO				
Fosfato de Sodio	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	138.02	150	1.087
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	61.68	3.0	0.048
Molibdato de Sodio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	241.95	250 µg	1.033x10 ⁻³
SOLUCION V: QUELANTES				
Sulfato ferroso	FeSO ₄ .	278.21	28.1	Sequestrene 330Fe (FeDTPA)
Na ₂ EDTA	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ .2H ₂ O	372.30	37.4	0.0753

TABLA 4.SOLUCIONES CONCENTRADAS (100X) DEL COCTEL DE VITAMINAS CONOCIDO COMO:

NOMBRE DEL COMPUESTO	FÓRMULA	P.M (g)	CANTIDADES PARA UN LITRO		100ml
			MASA (mg)	MOLES (Mm)	
Vitaminas SH					
Myo-Inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.20	1000	5.55	10
Tiamina-HCl	C ₁₂ H ₁₇ N ₄ O ₅ Cl·HCl	337.30	5.0	0.015	0.05
Ac. Nicotico	C ₆ H ₆ NO ₂	123.10	5.0	0.041	0.05
Piridoxina-HCl	C ₈ H ₁₁ NO ₃ ·HCl	205.60	0.5	2.34 μM	0.005
Vitaminas Nitsch					
Myo-Inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.20	1000	5.55	10
Tiamina-HCl	C ₁₂ H ₁₇ N ₄ O ₅ Cl·HCl	337.30	5.0	0.015	0.05
Ac. Nicotico	C ₆ H ₆ NO ₂	123.10	5.0	0.041	0.05
Piridoxina-HCl	C ₈ H ₁₁ NO ₃ ·HCl	205.60	0.5	2.34 μM	0.005
Biotina	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	244	0.05	-----	0.0005
Ac. Folico	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆	417	0.5	-----	0.005
Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂	75	2.0	-----	0.02
Vitaminas Kao[®]					
Acido P-Aminobezoico	C ₇ H ₇ NO ₂	20.01		2.0	
Acido L-Ascórbico	C ₆ H ₈ O ₆	176		200	
Biotina-D	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	244		1.0	
Pantotenato de Calcio	C ₁₈ H ₃₂ CaN ₂ O ₁₀	476.53		100	
Cloruro de colina	(CH ₃) ₃ NCH ₂ CH ₂ OHCl	139.63		100	
Vitamina B12	C ₆₃ H ₈₈ CoN ₁₄ O ₁₄ P	1355.42		2.0	
Acido folico	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆	417		40	
Myo-Inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.20		10,000	
Nicotinamina	C ₆ H ₆ NO ₂	123.10		100	
Piridoxina•HCl	C ₈ H ₁₁ NO ₃ ·HCl	205.60		100	
Riboflavina	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ NaO ₉ P·2H ₂ O	514		2.0	

Tiamina•HCl	C ₁₂ H ₁₇ N ₄ O ₅ Cl•HCl	337.30	100
Vitamina A	C ₂₀ H ₃₀ O	286	1.0

TABLA 5. SOLUCIONES PARA AJUSTAR pH

NOMBRE DEL COMPUESTO	FÓRMULA	P.M (g)	CANTIDADES PARA UN LITRO		100ml
			MASA (mg)	MOLES (Mm)	
Soluciones para ajustar el pH del medio					
Hidróxido de Sodio	NaOH	40	1 N=40 g.l ⁻¹	1 M=40 g.l ⁻¹	4.0 g
Ácido clorhídrico	HCl	35.46	1N=83.5 g.l ⁻¹	1M=36.46 g.l ⁻¹	8.35 ml

TABLA 6.SOLUCIONES CONCENTRADAS (100X) PARA PREPARAR FITOHORMONAS COMO:

NOMBRE DEL COMPUESTO	ABREVIATURA	FÓRMULA	P.M (g)	100ml
COMPUESTOS ORGANICOS				
Auxinas				
Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético	2,4-D	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃	221	10
Ácido α-Naftalenacético	ANA	C ₁₂ H ₁₀ O ₂	186.2	10
Acido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico	Picloram			
Cinetinas				
6-Bencilaminopurina	BAP	C ₁₂ H ₁₁ N ₅	225.3	10
Cinetina (6-furfurilaminopurina)	Kin	C ₁₀ H ₉ N ₅ O	215.2	10

TABLA 7. SACAROSA COMERCIAL

NOMBRE DEL COMPUESTO	FÓRMULA	P.M (g)	CANTIDADES PARA UN LITRO (g)
Sacarosa comercial	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.31	15

TABLA 8.SOLUCIONES PARA LA PREPARACIÓN DEL SUSTRATO DE X-GLUCC™

REACTIVO	CONCENTRACIÓN(mM)	STOCK 10X	CANTIDADES PARA 25 ml DE SUSTRATO(ml)
Amortiguador de fosfatos de sodio (pH 7.0 y 8.5)	100	1M	2.5
EDTA	10	100mM	2.5
Ferrocianuro de Potasio	0.5	5mM	2.5
Ferricianuro de Potasio	0.5	5mM	2.5
Tritón X-100	0.5	5mM	2.5
X-Gluc*	1mg	5mM	25mg

*Se tiene que disolver en DMSO previamente

La mezcla se afora a 25 ml con agua desionizada estéril y su almacenamiento es a -20°C

SOLUCIONES PARA LLEVAR A CABO LA EXPRESIÓN TRANSITORIA

a) Buffer "Z"*

REACTIVO	CONCENTRACIÓN	CANTIDAD EN (g) PARA 500 ml
Fosfato de Sodio (monobásico)	40	2.76
Fosfato de Sodio (dibásico)	60	2.46

Cloruro de Potasio	10	0.37
Sulfato de magnesio (heptahidratado)	1	0.12

*El pH se ajusta a 7.0 u 8.0

b) Etanol al 70%

CANTIDAD DE ETANOL ABSOLUTO (ml)	CANTIDAD DE AGUA DES/EST (ml)
350	150

c) Mezcla de Acetona-Metanol (1:3)

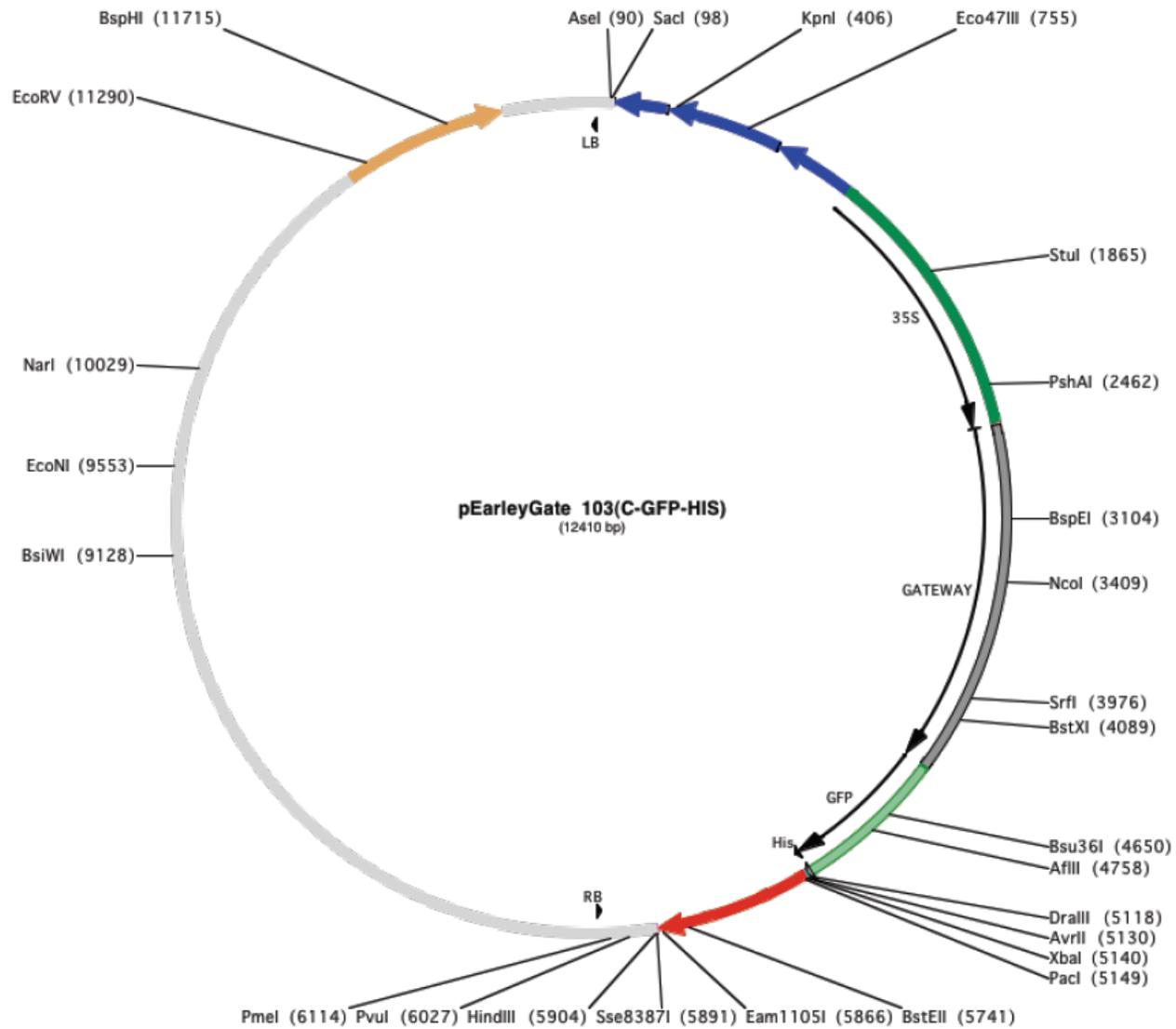
CANTIDAD DE ACETONA (ml)	CANTIDAD DE METANOL (ml)
166	498

d) Glicerol al 50%*

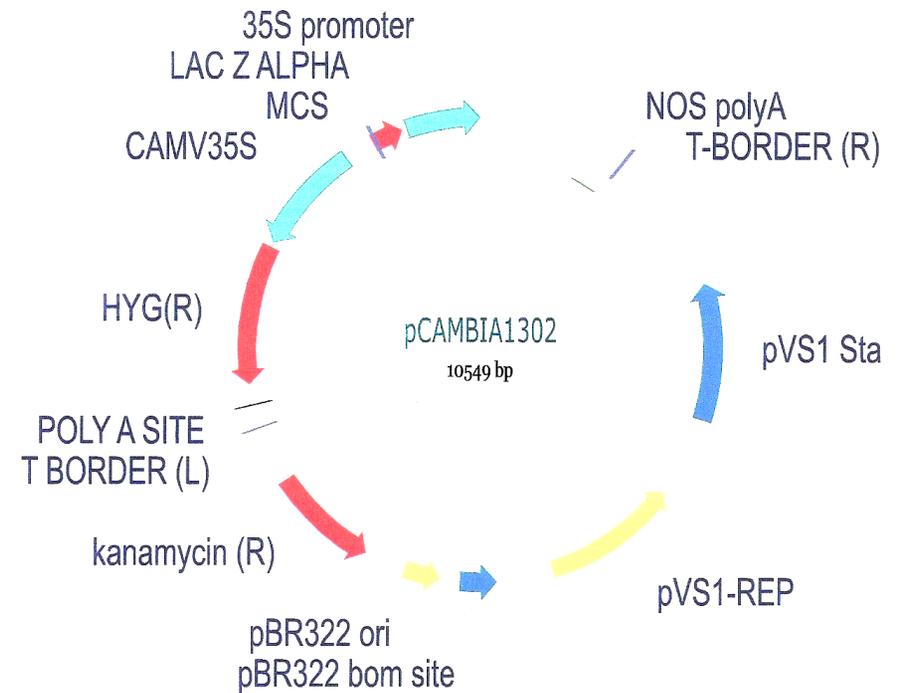
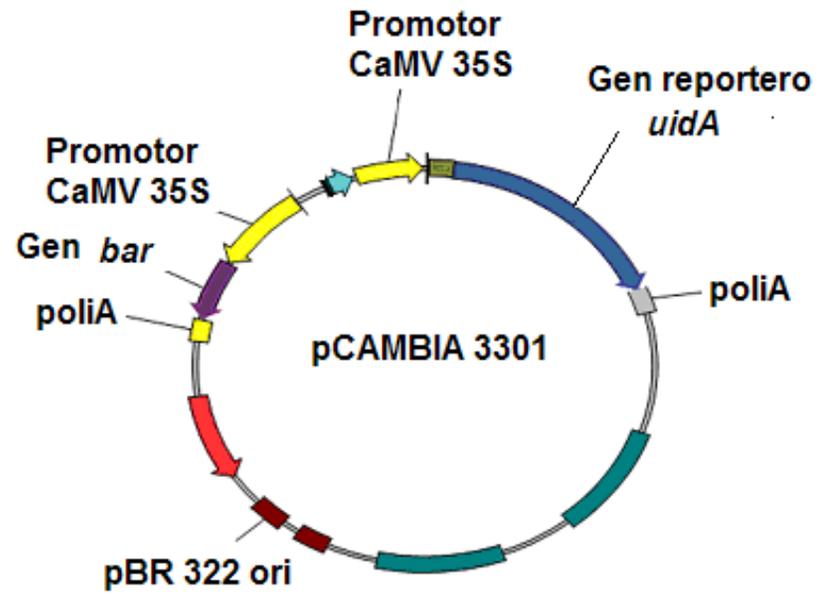
CANTIDAD DE GLICEROL ABSOLUTO (ml)	CANTIDAD DE AGUA DES/EST (ml)
250	250

*Esterilizar en autoclave durante 18 min a 1.3Kg/cm^{-2}

Plásmido utilizado para la transformación genética de *Taxus globosa* mediante *Agrobacterium tumefaciens*.



Plásmidos utilizados para la transformación genética de cultivos celulares de *Taxus Globosa* mediante Biobalística



XI.BIBLIOGRAFÍA

Alvarado, Y.1998.Contaminacion microbiana en el cultivo in vitro de plantas, en: Pérez J. Ed Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las plantas Cuba 104 pp.

Appendino G.1993. Taxol (paclitaxel) Historical and Ecological Aspects, en *Fitoterapia*,64:5-25.

Archana Giri, Vikas Dhingra, CC. Giri. 2001. Biotransformation using plant cell, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects. *Biotechnol Adv*,19:175-199

Ayala, V.I.2008. Células vegetales en biotransformaciones: Tamizado de la reacción de Oxidación de eugenoles/ácidos hidroxicinamicos y dimerización oxidativa del eugenol con cultivos de nueve plantas. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química. UNAM.

Azcon-Bieto J, Talón M.2000.Fundamentos de fisiología vegetal. Ed. Mc Graw Hill. España, 305-323 pp.

Banerjee, S., Upadhyay N., Kukreja A.K., Ahuja P.S., Kumar S., Saha G.C., Sharma R.P., Chattopadhyay S.K. 1996. Taxanes from in vitro cultures of the Himalayan yew *Taxus willichiana*. *Planta Med* 62:329-331.

Barranco, H. Eva. 1998. Aminoglucosidos. *ACTA MEDICA* (1):48-53pp

Bolivar, Z., Francisco. 2004. Fundamentos y Casos exitosos de la Biotecnología Moderna. Colegio Nacional. México D.F.

Chang SH, Ho CK, Tsay JY. 1996. Callus initiation, growth, and taxol production of *Taxus mairei*. *Taiwan J For Sci* 11:445-453.

Chang SH, Ho CK, Tsay JY. 2001. Micropropagation of *Taxus mairei* from mature trees. *Plant Cell Rep* 20:496-502.

Charest, P.J., Calro, N., Lachance, D., Datla, D.S.S., DuchSne, L.C. and Tsang, E.W.T.(1993), *Plant Cell Rep.*, 12, 189-193. Microprojectile-ADN delivery in conifer species, factors affecting assessment of transient gene expression using the β -glucuronidase reporter gene.

Chilton M. D. (1977). Stable incorporation of plasmid ADN into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell*. Vol. 11, No. 2; p. 263-271.

Contreras- Medina R., Luna I., 2001.Presencia de *Taxus globosa* Schlecht. (Taxaceae) en el estado de Chiapas, México, *Polibotánica*, Núm. 12 pp. 51-55

Davis, S.J. and Vierstra, R.D. (1998). Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in higher plants. *Plant Molecular Biology*, 36:521-528.

De Liñan, C. 1997. *Farmacología Vegetal*. Ediciones Agrotecnia, S.F. España. 1196 pp

Díaz, M. L.; Zapacosta, D. C.; Franzone, P. M.; Ríos, R. D. 2006. Transformación genética en Biotecnología y mejoramiento vegetal. Cap III. España. Pp 109- 123

Evans D, Coleman O. 2003. Plant Cell Culture. Bios Scientific Publishers 2a edición. 201-250pp.

Flores A. 2004. Establecimiento de cultivos de células en suspensión de *Cassia sp.* para su uso como biocatalizador. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.

Flores HE & Sgrignoli PJ. 1991. In vitro culture and precocious germination of *Taxus* embryos. In vitro Cell. Dev. Biol. 27P:148-151.

Furmanowa M, Glowniak K y Syklovska- Baranek K. 1997. Effect of picloram and methyl jamonate on growth and taxane accumulation in callus culture of *Taxus x media var Hatfieldii*. Plant. Cell Tissue Organ Culture 49:75-79

Gamborg OL, Miller RA y Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp Cell Res. 50:148-151

Gelvin, S. 2003 Agrobacterium-mediated plant transformation: the Biology behind the "GENE-Jockeying" TOOL. Microbiology and Molecular Biology Reviews. Vol. 67; p. 16-37.

George, E y Sherrington P. 1984. Plant propagation by tissue culture. Ed. Exegetics limited. Inglaterra. 709 pp.

Godínez, G. 2007. Regeneración *in vitro* de sorgo y establecimiento de las condiciones de bombardeo para su transformación genética. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias. UNAM. 80pp.

Guerrero-Andrade, O. 1998. Transformación de células de maíz (*Zea mays*, raza tuxpeña) por medio del bombardeo de partículas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.

Han K-H., Gordon M.P. y Floss H.G. 1999. Genetic transformation of *Taxus* (Yew) to improve Production of taxol. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol 44. 206pp

Han K-H., Fleming P., Walker K., Loper M., Chilton S., Mocek U., Gordon M.P y Floss H.G. 1994. Genetic transformation of mature *Taxus*: an approach to genetically control the in vitro production of the anticancer drug taxol. Plant Sciencie. 95,187-196pp.

Herrera E.L., Jofre A. y Garfias. (1997) Transformación genética de plantas. CINVESTAV Irapuato.

Howitz S.B., J. Fant, P.B. Schiff. 1979. *Nature*. 277, 1219-1222.

Humara J y Órdas J. 1999. The toxicity of antibiotics and herbicides on in vitro adventitious shoot formation on *Pinus pinea* L. cotyledons. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 35:339-343.

Hurtado M. Daniel y Merino M.E. 1994. Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial Trillas. México, 150-178pp.

Islebe, G. A., A. M. Cleef y A. Velázquez. 1994. Especies leñosas de la Sierra de los Cuchumatanes y de la Cadena Volcánica, Guatemala. Acta Bot. Mex. 29: 83-92.

Jefferson R.A, Burgess S. M., y Hirsht D.1986. β -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. Proc. Natl. Acad. Sci. Biochemistry. Vol. 83, pp. 8447-8451.

Jefferson R.A. (1987). Plant Molecular Biology Reporter, 5:387-405.

Jennewein S., Croteau R., 2001, Taxol: biosynthesis, molecular genetics and biotechnological applications. Appl Microbiol. Biotechnol, 57:13-19

Jiménez, V. María de Jesús. 2006. Transformación genética de callos embriogénicos de Maíz (*Zea mays*) con el gen de la glicoproteína G del virus de la rabia. Tesis de Licenciatura (Biología), Facultad de Ciencias. UNAM. 99 pp.

Ketchum R. E.B, Gibbson D.M 1996. Paclitaxel production in suspension cell cultures of Taxus. PlantCell Tissue Organ Culture 46:9-16

Ketchum R. E.B, Gibbson D.M y Greenspan Gallo. 1995. Media optimization for maximum biomass production in cell cultures of pacific yew. Plant.Cell Tissue Organ Culture 42:185-193

Ketchum, R. E.B.; Gibson, Donna M.; Croteau, Rodney B. y Shuler, Michael L. The kinetics of taxoid accumulation in cell suspension cultures of Taxus following elicitation with methyl jasmonate. Biotechnology and Bioengineering, January 1999, vol. 62, no. 1, p. 97-105

Ketchum,R. E.B, Wherland L.R.,Croteau B. 2007. Stable transformation and long term maintenance of transgenic Taxus cell suspension cultures. Plant Cell Rep. 26:1025-1033.

Kholi A, Twyman MR, Abranches R,Wegel E,Stoger E,Christou P. 2003. Transgene integration,organization and interaction plants. Plant Molecular Biology. 52:247-258.

Khosroushahi A. Y., Valizadeh M., Ghasempour A., Khosrowshahli M., Naghdibadi H., Dadpour M.R., Omid Y.2006. Improved production by combination of inducing factors Taxol in suspension cell culture of *Taxus baccata*. Cell Biology International 30, 262-269pp.

Kim, Ghang H., Kyung I y In S. 2000. Expression of Modified green fluorescent protein in suspension culture of *Taxus cuspidate*. J.Microbiology y Biotechnology 10(1)91-94pp.

Klein T,M y Fitzpatrick-McElligott S.. 1993.Particle Bombardment: a Universal Approach for Gene Transgene to Cells and Tissues.Curr Opin Biocnol.4:583-590.

Klein, T.; Wolf, E; Wu, R.; Sanford, J. 1987.«High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells». Nature 327: 70-73.

Klein, T.M., Komstein, L., Sanford, J.C. and Fromm, M.E. (1989), Plant Physiol., 91, 440-444. Genetic transformation of maize cells by particle bombardment.

Klein, T.M.,T.Gradziel, M.E. Fromm & J.C Stanford (1988) Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cells by high-velocity microprojectiles, Biotechnology, 6:559-563.

Kusnadi RA., Nikolov LZ., Howard AJ, 1997. Production of recombinant proteins in transgenic plants: practical considerations. Biotechnology and Bioengineering, 56: 5. 473-483.

Kyriacos C.N. *et al.*,1994.Chemistry and Biology of Taxol.Angew. Chem.Int.Ed.Engl.33,15-44

- Linden, J. C., Haigh, J. R., Mirjalili, N., y Phisaphalong, M. 2001. Gas concentration effects on secondary metabolite production by plant cell cultures. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 72, 28-62
- Lindsey, K. y M. Jones. 1989. *Biología vegetal agrícola*. Ed. Acriba. España. 273 pp
- Loaiza J y Valverde R. 2006. Transformación genética de *Echinacea purpurea* y *E. Angustifolia* mediante *Agrobacterium rhizogenes*. *Agronomía Costarricense* 30(1): 27-34. pp
- Marja K, Oksman K. 2002. *Plant biotechnology and transgenic plants*. Ed. Marcel Dekker Inc. NY. 1-21.
- Melvin J. Shemluck, Eduardo Estrada, Robert Nicholson y Susan W. Brobst. 2003. A preliminary study of the chemistry and natural history of the Mexican yew, *Taxus globosa* Schtdl. *Bol. Soc. Bot. México*. 72:119-127.
- Michael C. Naill y Susan C. Roberts. 2005. Culture of isolated single cells from *Taxus* suspensions for the propagation of superior cell populations. *Biotechnology Letters*. 27: 1725–1730
- Mukul Manjari Datta, Anrini Majumder y Sumita Jha. 2006. Organogenesis and plant regeneration in *Taxus wallichiana* (Zucc.). *Plant Cell Rep* 25: 11–18
- Murashige T y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tissues cultures. *Physiol. Plant* 15:473-497.
- Nicholson, R. y Munn D. X. 2003. Observations on the propagation of *Taxus globosa* Schtdl. *Bol. Soc. Bot., Mexico*. 72:129-130
- O'Brien L. y Henry R.J. 2000. *Transgenic Cereals*. American Association of cereal Chemists. Minesota, USA. 348pp
- Olivera, M.T. 2003. *Resúmenes de Diplomado: El cultivo de tejidos, una técnica de la biotecnología vegetal*. UNAM
- Pérez, M.B., Ramírez M.R, Núñez P.H. 1999. *Introducción al cultivo de tejidos vegetales*. Universidad Nacional Autónoma de Aguascalientes, México.
- Pérez, P. 1998. *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Instituto de Biotecnología de plantas. Cuba, 1-56
- Pierik, R.L.M. 1990. *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, pp. 37-47
- Ramachandra, R., Ravishankar G. 2002. *Plant Cell cultures. Chemical factories of secondary metabolites*. *Biotechnol Adv.* 20:101-153.
- Ramos, R. M.T. 2006. *Regeneración de melón (Cucumis melo L.) bajo condiciones in vitro como modelo biológico*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias. UNAM. 106pp.
- Rowinsky K, Lorraine A., Cazenave, Ross C., Donehower, 1990. Taxol: A novel Investigational antimicrotubule agente. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 82 (15) Agosto, pp 1247-1252

- Rusell, Julie.,Mihir K. Roy and Jonh C.Sanford .1992. Physical Trauma and tungsten toxicity reduce the efficiency of biobalística transformation. *Plant Physiol* 98:1050-1056.
- Silba, J. 1984. An international census of the Coniferae, I. *Phytol. Mem.* 7: 1-79.
- Smith, C.O. 1942. Crown gall on species of Taxaceae, Taxodiaceae, and Pinaceae, as determined by artificial inoculation.*Phytopathology* 32:1005-1009
- Soto, H., Sanjurjo M., Gonzales G. Ma.T., Cruz D.,Giral G., 2000,El tejo mexicano (*Taxus globosa* Sch) Potencial de su aprovechamiento en taxol,Ciencia Ergo Sum, vol 7(3) 277-279
- Southgate, E.M., M.R Davey, J.B Power & R. Marchant (1995). Factors Affecting the Genetic Engineering of Plant by Microprojectile Bombardment *Biotec. Advanc.* 13:631-651.
- Standley, P. C. y J. A. Steyermark. 1958.Taxaceae. En: *Flora of Guatemala. Field. Bot.* 24(1): 60-63.
- Stierle , A., Strobel G., Stierle, D., 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae* , an endophytic fungus of Pacific Yew, *Science* 260, 214-216
- Stierle, A.,Strobel, G.,Stierle D.,1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreana*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science* 260,214-216.
- Strobel , G. A.; Stierle, A y Hess, W.M., 1993, Taxol formation in Yew *Taxus*, en *Plant Sci* 92:1-12
- Tabata, H. 2006. Production of paclitaxel and the related taxanes by cell suspension cultures taxus species. *Current Drug Targets.* Vol. 7. N° 4. Pp. 453-461
- Tzfira, T. y Citovsky, V. 2006. Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 17:147–154.
- Uribe, L. 1998. Influencia de distintos antioxidantes sobre brotación y crecimiento *in vitro* de ceiba (*Ceiba pentandra*).Tesis de Licenciatura, Facultad de Química. UNAM.69 pp.
- Vain, P., J. De Buyser, V. Buitrang, R. Haicour and Henry.1995. Foreign Gene Delivery into Monocotyledonous Species. *Biotechnology Advances* 13:653-671.
- Valderrama, F., Arango I. y Afanador K., 2005. Transformación de plantas mediada por agrobacterium:“ingeniería genética natural aplicada” *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín.*Vol.58, No.1.pag.2569-2585.
- Vasil, Indra K. 1994. Molecular Improvement of cereals.*Plant Mol Biol* 25:925-937
- Vongpaseuth K. y Roberts S. 2007(a).Advancements in the understabding of paclitaxel metabolism in Tissue Culture.*Current Pharmaceutical Biotechnology* 8:219-236.
- Vongpaseuth K., Nims E,Amand M,Walker L.y Roberts S.2007(b).Develoment of particle Bombardment-Mediated Transient Transformation System for *Taxus* spp. Cells in culture. American Chemical Society and American Institute of Chemical Engineers.
- Walter K.y Croteau R., 2001. Taxol biosynthetic genes. *Phytochemistry* 58. 1-7p.

Wani MC, Taylor HL, Wall M.E. Coggon P, McPhail AT (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

Wei T., Ronald J. y Douglas A. 2006. Genetic transformation and gene silencing mediated by multiple copies of a transgene in eastern white pine. Journal of Experimental Botany, Vol. 58, No. 3, pp. 545-554,

Wheeler N., Jech K., Masters S., Brobst S., Alvarado A. y Hoover A. 1992. Effects of genetic and environmental factors on taxol content in *Taxus brevifolia* and related species. Journal of Natural Products 55:432-440.

Wickremesinhe ER y Arteca RN. 1993. Taxus callus cultures: initiation, growth optimization, characterization, & taxol production. Plant Cell, Tissue, & Organ Culture 35:181-193.

Zamudio, S. 1992. Familia Taxaceae. Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Instituto de Ecología. Pátzcuaro, Michoacán, México. Fascículo 9. 7 p.

Zavala-Chávez, F. 2001. Análisis demográfico preliminar de *Taxus globosa* Schlecht en el parque nacional El Chico, Hidalgo, México. II: Población de adultos y algunas características del hábitat. *Ciencia Ego Sum*. Vol 8. Num. 2. UAEM, Toluca, México, pp. 169-174.

Zavala-Chávez, F. 2002. Análisis demográfico preliminar de *Taxus globosa* Schlecht en el parque nacional El Chico, Hidalgo, México. II: Población de juveniles y algunos datos de semillas). *Ciencia Ego Sum*. Vol 9. Num. 2. UAEM, Toluca, México, pp. 177-183.

PAGINAS DE INTERNET.

www.colinagro.com

www.imss.gob.mx

www.pcambia.com

www.uc.org