



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Obtención de cultivos celulares prolíferos de *Taxus globosa*
y su transformación genética**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

DIEGO PADILLA ALCÁZAR



DIRECTORA DE TESIS:

M. EN C. TERESA DE JESÚS OLIVERA FLORES

(2013)



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

-
1. Datos del alumno
Padilla
Alcázar
Diego
57 77 40 92
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
098003369
 2. Datos del tutor
M. en C.
Teresa de Jesús
Olivera
Flores
 3. Datos del sinodal 1
Dr.
Víctor Manuel
Chávez
Ávila
 4. Datos del sinodal 2
Dra.
Patricia
Guevara
Fefer
 5. Datos del sinodal 3
Dra.
Josefina
Herrera
Santoyo
 6. Datos del sinodal 4
M. en C.
Octavio
González
Caballero
 7. Datos del trabajo escrito
Obtención de cultivos celulares prolíferos de *Taxus globosa* y su transformación genética
78 p
2013

ÍNDICE TEMÁTICO

CONTENIDO	PAG.
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. ANTECEDENTES	4
3.1 TAXUS GLOBOSA	4
3.1.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA Y DESCRIPCIÓN BOTÁNICA	5
3.1.2 IMPORTANCIA ECOLÓGICA	6
3.1.3 USOS	8
3.1.3.1 PACLITAXEL	8
3.1.3.2 PACLITAXEL EN <i>T. GLOBOSA</i>	11
3.1.3.3 DEMANDA DEL FÁRMACO	11
3.2 EL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES COMO UNA HERRAMIENTA BIOTECNOLÓGICA	13
3.2.1 FACTORES QUE CONTRIBUYEN AL INCREMENTO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR	15
A) REGULADORES DE CRECIMIENTO	15
B) COMPUESTOS ORGÁNICOS	17
C) FACTORES DE CRECIMIENTO PARECIDOS A INSULINA (IGF's)	18
3.2.2 EL CULTIVO DE CALLOS Y CÉLULAS EN SUSPENSIÓN COMO MODELOS BIOLÓGICOS	19
3.2.3 EVALUACIÓN DEL INCREMENTO EN LA MASA CELULAR	20
3.3 CULTIVOS <i>IN VITRO</i> DE TAXUS	21
3.3.1 PROBLEMAS PRESENTES EN CTV DE ESPECIES DEL GÉNERO TAXUS	22
3.4 INGENIERÍA GENÉTICA EN PLANTAS	23
3.4.1 MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA	23
3.4.2 MÉTODOS REPORTADOS DE TRANSFORMACIÓN PARA TAXUS	25
4. JUSTIFICACIÓN	28
5. OBJETIVOS	29
6. MATERIALES Y MÉTODOS	30
6.1 DESINFECCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO Y LA SIEMBRA	31
6.2 INDUCCIÓN DE CALLO Y MANTENIMIENTO	32
6.3 LÍNEA EXPERIMENTAL I: AUMENTO EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR	33
6.3.1 MEDIO T ₀ MODIFICADO CON SALES WPM	33
6.3.2 TRATAMIENTO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE INSULINA	34
6.3.3 FITORREGULADORES	35
6.3.4 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE CALLOS	36

CONTENIDO	PAG.
6.4 LÍNEA EXPERIMENTAL II: CÉLULAS EN SUSPENSIÓN	37
6.4.1 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN	38
6.5 LÍNEA EXPERIMENTAL III: TRANSFORMACIÓN GENÉTICA	38
6.5.1 CURVA DE TOLERANCIA A BASTA	39
6.5.2 CONDICIONES DE BOMBARDEO	39
6.5.3 SELECCIÓN DE CALLOS TRANSFORMADOS	40
6.5.4 EXPRESIÓN PERMANENTE DEL GEN <i>GFP</i>	40
6.5.5 PRUEBAS MOLECULARES DE DETECCIÓN DE ADN EXTERNO	41
7. RESULTADOS	42
7.1 DESINFECCIÓN E INDUCCIÓN DE CALLO	42
7.2 LÍNEA EXPERIMENTAL I: AUMENTO EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR	44
7.2.1 MEDIO T ₀ MODIFICADO CON SALES WPM	44
7.2.2 TRATAMIENTO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE INSULINA	44
7.2.3 FITORREGULADORES	47
7.3 LÍNEA EXPERIMENTAL II: CÉLULAS EN SUSPENSIÓN	50
7.4 LÍNEA EXPERIMENTAL III: TRANSFORMACIÓN GENÉTICA	51
7.4.1 TOLERANCIA A BASTA	52
7.4.2 SELECCIÓN DE CALLOS TRANSFORMADOS	52
7.4.3 EXPRESIÓN DEL GEN <i>GFP</i>	53
7.4.4 PRUEBAS MOLECULARES	54
8. DISCUSIÓN	56
9. CONCLUSIÓN	63
10. PERSPECTIVAS	64
11. ANEXOS	65
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

ÍNDICE DE TABLAS

NÚMERO TABLA	NOMBRE	PAG.
1	CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE <i>Taxus globosa</i>	5
2	CONCENTRACIONES DE TAXOL EN DIFERENTES ESPECIES DEL GÉNERO <i>TAXUS</i>	10
3	APLICACIÓN DEL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES	13
4	EFFECTO DE ALGUNAS VITAMINAS SOBRE LAS CÉLULAS VEGETALES	17
5	REPORTES DEL USO DEL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES CON ESPECIES DEL GÉNERO <i>TAXUS</i>	21
6	MÉTODOS REPORTADOS PARA LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE ALGUNAS ESPECIES DEL GÉNERO <i>TAXUS</i>	26
7	COMPONENTES DEL MEDIO DE CULTIVO <i>To</i>	32
8	COMPONENTES DEL MEDIO DE CULTIVO <i>To</i> MODIFICADO	34
9	DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO PROBADOS EN LA PROLIFERACIÓN DE CALLOS DE <i>T. globosa</i>	36
10	COMPONENTES DEL MEDIO <i>TGS-2</i>	37
11	CONDICIONES DE BOMBARDEO DE CALLOS DE <i>T. globosa</i>	39
12	CONDICIONES DE PCR	41
13	GANANCIA MÁXIMA DE PESO (P. SECO) DE SUSPENSIONES CELULARES CON LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS DE INSULINA.	45
14	VALORES COMPARATIVOS DEL INCREMENTO CELULAR DEL CONTROL Y EL TRATAMIENTO <i>IN₂</i> , TOMADA DESPUÉS DE UN AÑO DE CULTIVO	47
15	VALORES COMPARATIVOS DEL INCREMENTO CELULAR CON LOS TRATAMIENTOS DE LA COMBINACIÓN DE FITOREGULADORES	48
16	RELACIÓN DE PESO FRESCO Y PESO SECO DE SUSPENSIONES CELULARES EN MEDIO <i>TGS-2</i> .	50

ÍNDICE DE FIGURAS

NÚMERO FIGURA	NOMBRE	PAG.
1	<i>Taxus globosa</i>	6
2	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA POTENCIAL DE <i>Taxus globosa</i>	7
3	MECANISMO DE ACCIÓN DEL TAXOL SOBRE EL SISTEMA MICROTUBULAR DE LA CÉLULA	9
4	PROCESOS MORFOGENÉTICOS Y EL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES	14
5	CURVA TÍPICA DE CRECIMIENTO DE UN CULTIVO CELULAR.	20
6	MAPA DEL PLÁSMIDO T1	24
7	RUTA CRÍTICA DE LA METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	30
8	PROTOCOLO DE DESINFECCIÓN DE ACÍCULAS Y TALLOS DE <i>Taxus globosa</i>	31
9	MAPA DEL PLÁSMIDO PBGWFS7.0/CAMV35S	38
10	PORCENTAJE DE RESPUESTA DE FORMACIÓN DE CALLO POR CADA TIPO DE EXPLANTE	42
11	TALLOS DE <i>T. globosa</i> QUE RESPONDIERON AL TRATAMIENTO	43
12	PROLIFERACIÓN DE CALLOS DE <i>T. globosa</i> EN OSCURIDAD	43
13	CURVAS DE CRECIMIENTO EN PESO FRESCO Y PESO SECO, DE SUSPENSIONES CELULARES CON LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS DE INSULINA	44
14	RESPUESTA DE LOS DIFERENTES EXPLANTES A LOS TRATAMIENTOS CON INSULINA	46
15	CALLOS DE <i>T. globosa</i> CULTIVADOS CON LOS TRATAMIENTOS DE INSULINA	46
16	CURVAS DE CRECIMIENTO EN PESO FRESCO Y PESO SECO, DE SUSPENSIONES CELULARES CON LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS DE INSULINA, TOMADA DESPUÉS DE UN AÑO DE CULTIVO.	47
17	CURVA DE CRECIMIENTO EN PESO FRESCO DE CALLOS EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS DE FITORREGULADORES	48
18	PRIMERA MEDICIÓN DE LA GANANCIA DE PESO EN CALLOS SOMETIDOS A LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS CON FITORREGULADORES	49
19	SEGUNDA MEDICIÓN DE LA GANANCIA DE PESO EN CALLOS SOMETIDOS A LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS CON FITORREGULADORES	49
20	CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE CULTIVOS EN SUSPENSIÓN EN MEDIO TGS-2	50
21	SUSPENSIONES CELULARES DE <i>T. globosa</i>	51
22	CURVA DE TOLERANCIA A GLUFOSINATO DE AMONIO	52
23	CALLOS DE <i>T. globosa</i> AL TERMINAR LAS PRUEBAS DE TOLERANCIA AL GLUFOSINATO DE AMONIO.	52
24	CALLOS DE <i>T. globosa</i> COMO CONTROL NEGATIVO Y TRATAMIENTO DESPUÉS DE LA SESIÓN DE BOMBARDEO.	52
25	CALLOS BOMBARDEADOS DE <i>T. globosa</i> DESPUÉS DE 60 DIAS DEL BOMBARDEO EN ETAPA DE PROLIFERACIÓN.	53
26	CONTROL NEGATIVO VISTO BAJO EL MICROSCOPIO CONFOCAL, EL CUAL NO PRESENTÓ FLUORESCENCIA	54
27	FLUORESCENCIA DE LA PROTEÍNA GFP OBSERVADA BAJO EL MICROSCOPIO CONFOCAL	54
28	ELECTROFORESIS PARA DETECTAR GENES INSERTADOS EN EL GENOMA DE CALLOS TRANSFORMADOS DE <i>T. globosa</i> .	55

ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIA	Ácido indol-3-acético
AIB	Ácido indol-3-butírico
ANA	Ácido 1-naftalenacético
B5	Medio de cultivo de Gamborg <i>et al.</i> , 1968.
BAP (BA)	6-bencilaminopurina (6-benciladenina)
BASTA	Nombre comercial del glufosinato de amonio
CTV	Cultivo de Tejidos Vegetales
EDTA	Ácido etilendiamina tetra-acético
gADN	Ácido desoxirribonucleico genómico
GFP	Gen de la proteína verde fluorescente
GFP	Proteína verde fluorescente
Kinetina	6-furfurilaminopurina
MS	Medio de cultivo de Murashige y Skoog, 1962.
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Picloram	Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico
Promotor 35s	promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor
PVP	Polivinilpirrolidona
WPM	Medio de cultivo de especies de plantas maderables, 1981

1. RESUMEN

El uso de los individuos de las diferentes especies del género *Taxus* como fuente principal para la producción de taxol® ejerce una presión sobre la conservación de dichas especies, debido a sus bajos valores en densidades poblacionales, tasas de crecimiento y en la producción del metabolito.

El cultivo de tejidos vegetales es una herramienta que puede mejorar la producción de taxol mediante el aumento de las bajas tasas de proliferación celular a través de modificaciones de compuestos orgánicos del medio de cultivo. Es por ello que el presente trabajo se enfocó en el aumento de la proliferación de las células de *T. globosa* modificando compuestos del medio de cultivo, así mismo se desarrolló un protocolo para la transformación genética.

Durante el desarrollo del trabajo se probó el efecto de la combinación de algunos fitorreguladores en la proliferación celular, diferentes concentraciones de insulina (0, 150, 300 y 450 U/L) como un factor de crecimiento y el comportamiento de las células en cultivos en suspensión. Se logró una exitosa desinfección del material vegetal, así como el establecimiento de cultivos de callos *in vitro* de *T. globosa*; mediante el uso de las cinéticas de crecimiento se comprobó el incremento en hasta un 240% con respecto al valor del inóculo inicial.

En lo que respecta a la metodología de transformación genética, ésta se llevó a cabo mediante la técnica biobalística, se logró corroborar la transformación genética mediante las pruebas de expresión permanente del gen *GFP* y a través de la prueba molecular de PCR, donde se determinó la presencia de los transgenes en las células bombardeadas.

2. INTRODUCCIÓN

El aprovechamiento que el hombre hace de los recursos naturales depende de la utilidad que encuentre en un elemento particular de la naturaleza. En el caso específico de las plantas, es posible aprovechar total o parcialmente algunos individuos dependiendo de la especie a la que pertenece. En ese sentido, algunas especies son reconocidas por sus usos como maderables, comestibles, ornamentales, de importancia farmacéutica e incluso de importancia cultural, entre otros.

Aun cuando las especies del género *Taxus* han sido aprovechadas de diferentes formas, actualmente la importancia del mismo radica en la producción de paclitaxel (autodefensa a fitopatógenos), el cual es reconocido por su efectiva actividad antineoplásica. A pesar de que la mayoría de las especies del género son productoras del metabolito en diferentes proporciones, las investigaciones se restringen a un cierto número de especies. En lo que respecta a *Taxus globosa* (el tejo mexicano) pocas son las publicaciones que se han dado a conocer en cuanto a su biología, ecología, metabolismo y, particularmente, producción de paclitaxel.

El paclitaxel, como los demás metabolitos secundarios, se genera en muy bajas concentraciones, lo que aumenta el costo de producción; y si además tomamos en cuenta la baja densidad de los individuos de *Taxus* en sus hábitats naturales, realmente representa un problema alcanzar las cantidades industriales que requiere satisfacer las demandas actuales.

La situación planteada con anterioridad, también representa el aumento al riesgo de afectación a las poblaciones de las especies, mismas que en su mayoría están consideradas bajo alguna categoría de riesgo en la lista Roja de la UICN y particularmente *Taxus globosa* que se encuentra bajo la categoría de protección especial (Pr) en la NOM-059-SEMARNAT-2010.

En relación a lo anterior, el cultivo de tejidos vegetales representa una herramienta importante para el incremento de la producción del metabolito, mediante el aumento de la proliferación celular y/o la transformación genética; el primero considera una mayor cantidad de producto conforme aumente el número de células

que lo produzcan, mientras que el segundo plantea la idea de obtener células que constantemente produzcan el metabolito, mediante una modificación genética.

Cualquiera que sea el caso, permitirá trabajar con organismos de invernadero o tejido *in vitro*, sin necesidad de considerar el uso de los individuos silvestres, lo que contribuiría a su conservación.

En este sentido, la tesis que se presenta a continuación aporta información para lograr las metas descritas en el párrafo precedente mediante la evaluación de diferentes compuestos orgánicos para la obtención de cultivos *in vitro* prolíferos de *Taxus globosa* y su transformación genética.

3. ANTECEDENTES

El género *Taxus* comprende en su conjunto un grupo de plantas leñosas, dioicas, perennifolias con hojas dispuestas en espiral y de peciolo corto. Presentan un óvulo solitario sobre una escama terminal el cual, tras la fecundación, se cubre con un arilo carnoso en forma de baya de color rojo cuya tonalidad varía dependiendo de la especie.

Este género presenta ciertas inconsistencias taxonómicas y, dependiendo del autor, pueden existir desde 7 a 24 especies dentro del género (Bailey, 1949; Spjut, 2007) distribuidas en las regiones templadas del hemisferio norte. Sin embargo, la UICN (2012) reconoce 10 especies de las cuales cuatro están presentes en el continente Americano, siendo *Taxus globosa* la única especie del género presente en nuestro país.

Todas las especies del género coinciden en sus requerimientos ambientales, dado que generalmente se les encuentra en hondonada de montañas, cañadas, barrancas o cualquier ladera con gran cantidad de humedad durante el año. Son árboles que crecen de manera aislada, razón por la cual no dominan en el tipo de vegetación que se encuentran y, por lo tanto, forman parte de la vegetación secundaria en distintas asociaciones arbóreas (Contreras-Medina *et. al.*, 2010).

3.1 *Taxus globosa*

Taxus globosa, denominado genéricamente “tejo mexicano”, es una planta que por sus características taxonómicas se encuentra dentro del grupo de las gimnospermas (tabla 1) y sus requerimientos ambientales son similares a los de los demás miembros del género. Es una planta tolerante a la sombra que forma parte de diferentes tipos de asociaciones vegetales sin llegar a ser una especie dominante (Zavala-Chávez, 2001a). Particularmente, individuos de esta especie han sido registrados en bosque mesófilo de montaña; aunque forma parte también de asociaciones vegetales como: bosque de oyamel, bosque de oyamel-encino, bosque de pino, bosque de pino-aguacatillo y bosque de pino-encino (Zavala-Chávez *et. al.*, 2001b). Sus registros comprenden un rango altitudinal desde 1,000 m en Querétaro, hasta cerca de los 3,000 m en Oaxaca.

TABLA 1
CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Taxus globosa*

Reino	División	Clase	Orden	Familia	Género	Especie
Plantae	Coniferophyta	Taxopsida	Taxales	Taxaceae	<i>Taxus</i>	<i>Taxus globosa</i>

Tomado de Luna, 2003.

En algunos trabajos se describe que el tejo mexicano es un árbol que tolera perfectamente la sombra e incluso los adultos registrados en lugares relativamente abiertos, mostraron follaje con manchas amarillas, contrario a los registrados en sitios de dosel cerrado. Se encuentran en el fondo de cañadas relativamente profundas y en suelos ligeramente ácidos, los individuos masculinos son levemente más numerosos que los femeninos (Zavala-Chávez, 2001b).

3.1.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA Y DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

El “tejo mexicano” es considerado por algunos autores como un arbusto, mientras que por otros un árbol de talla pequeña cuyo crecimiento es lento como generalmente sucede con las gimnospermas, es perennifolio y de ramas colgantes que forman una copa extensa. De los tejos es el más pequeño, con un rango de altura que va de los 6 a los 10 m y un tronco de 30 a 40 cm de diámetro a la altura del pecho. La corteza es escamosa y se desprende en fragmentos cuadrados o rectangulares; las hojas son de lineares a linear-lanceoladas de 2 a 3.7 cm de longitud y de 2 a 3 mm de ancho; presentan un ápice agudo, base angosta y peciolo corto, las cuales, se encuentran distribuidas en espiral y en ocasiones se disponen en forma dística por la torsión del peciolo (figura 1). Con la presencia de una única vena engrosada presentan una coloración verde-oscuro en el haz y más claras en el envés (Contreras y Luna, 2001).



FIGURA 1. *Taxus globosa*. A) INDIVIDUO; B) RAMA DE TEJO MEXICANO; C) ESTRÓBILO FEMENINO; D) ESTRÓBILO MASCULINO. TOMADO DE TOBAR, 2010

Al igual que los demás miembros del género, son árboles dioicos que se reproducen por semilla. Se conoce que comienza el desarrollo de las estructuras reproductoras entre los meses de diciembre a marzo o febrero a mayo, según la distribución geográfica (Zavala-Chávez, 2001a). Las semillas maduras se producen entre los meses de septiembre y noviembre, esto es para el caso de la población en Hidalgo.

El óvulo es único y se presenta de forma axilar el cual, se cubre de una estructura carnosa llamada arilo y de coloración rojiza cuando está madura. En el caso de los árboles masculinos, las estructuras reproductoras se encuentran en forma de racimos de pequeños estróbilos que forman de 5 a 9 sacos polínicos (Zavala-Chávez, 2001b).

3.1.2 IMPORTANCIA ECOLÓGICA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

En general las poblaciones de *T. globosa* son poco densas, se han registrado de 0.9 a 6.6 individuos por hectárea, en el estado de Hidalgo (Zavala-Chávez, 2001a), mientras que en el norte del país, los reportes mencionan poblaciones de entre 35.7 y 39.8 individuos por hectárea (García, 2011), lo que se correlaciona con el grado de conservación del sitio, entre más alto éste sea, mayor será la densidad de árboles por

hectárea. En algunos trabajos se describe que el “tejo mexicano” es un árbol que tolera perfectamente la sombra e incluso los adultos registrados en lugares relativamente abiertos mostraron follaje con manchas amarillas provocado por el exceso de luz, contrario a los registrados en sitios de dosel cerrado. Se encuentran en el fondo de cañadas relativamente profundas y en suelos ligeramente ácidos, los individuos masculinos son levemente más numerosos que los femeninos (Zavala-Chávez, 2001b).

El tejo mexicano tiene una distribución general desde el norte de México hasta Honduras en Centroamérica. Particularmente, la distribución de la especie dentro del territorio nacional comprende principalmente la Sierra Madre Oriental, la porción este del Eje Neovolcánico, la Sierra Norte de Oaxaca y Los Altos de Chiapas (Contreras Medina *et. al.*, 2010; Zavala-Chávez *et al.*, 2001), específicamente en los estados de Tamaulipas, Nuevo León, San Luis Potosí, Veracruz, Querétaro, Hidalgo y Oaxaca (figura 2). Aunque su población es aparentemente disyunta (Zamudio, 1992).

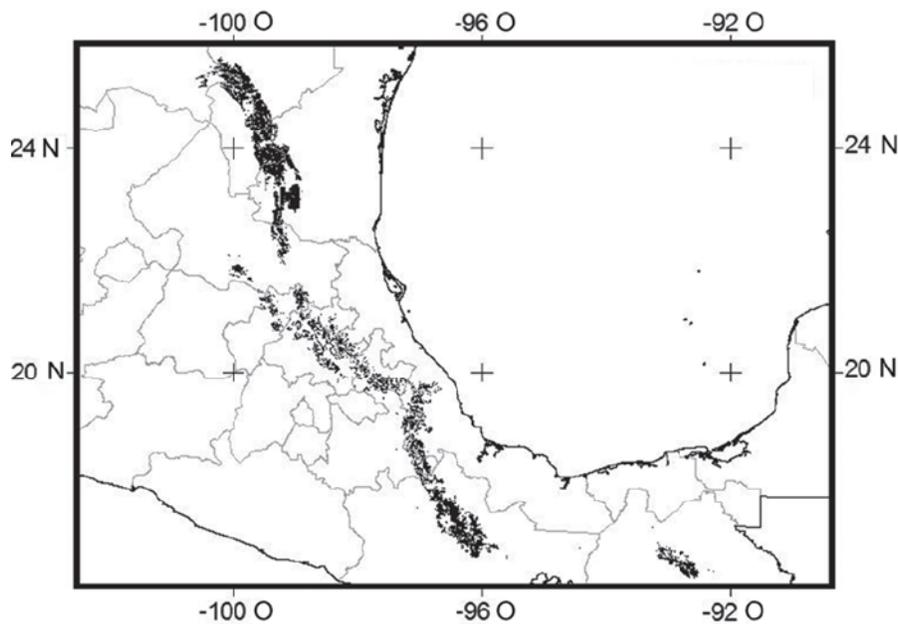


FIGURA 2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA POTENCIAL DE *Taxus globosa*. TOMADO DE CONTRERAS-MEDINA ET AL. , 2010

En términos de la interacción de *T. globosa* con su entorno, se sabe que las aves y los mamíferos pequeños comen los frutos y dispersan las semillas. Los árboles muertos que aún permanecen en pie brindan un hábitat para las aves que anidan en cavidades. Los árboles situados en zonas ribereñas refuerzan la estabilidad

de las orillas y brindan sombra. En general, las especies del género constituyen buenos indicadores de la contaminación ambiental, dada su sensibilidad a los contaminantes (Xu, 2000; tomado de CITES, 2004).

En general, el género *Taxus* presenta problemas de conservación dado que, la afectación a los ecosistemas donde se encuentran las poblaciones de sus especies se ven severamente afectados por el cambio de uso de suelo, por lo cual, más de la mitad de las especies se encuentran dentro de alguna categoría de riesgo a nivel internacional. En particular, *T. globosa* está considerada como una especie en la categoría *Near Threatened* (casi amenazada) de la Lista Roja de la UICN. De igual forma, las autoridades mexicanas la consideran como una especie Sujeta a Protección especial en la NOM-059-SEMARNAT-2010.

3.1.3 Usos

En el norte del continente Americano se ha hecho uso de los tejos que se distribuyen en esta región para la confección de armas, herramientas, objetos de cocina e incluso figuras decorativas (Shemluck, 2003). En particular, del tejo mexicano se tienen pocos registros, sin embargo, se sabe que es apreciada por ser una especie maderable y productora de leña; se utiliza como postes para cercas y columnas de paredes rústicas, ha servido como ornato e incluso en el aspecto religioso se vuelve importante al elaborarse ramos en Semana Santa, esto último por lo menos en el norte del país (Zamudio, 1992; García, 2011).

Sin embargo, el valor económico más importante que el género representa, radica en la producción de un metabolito secundario denominado genéricamente paclitaxel (comercialmente conocido como Taxol), el cual presenta características atribuibles a un fármaco de tipo antitumoral.

3.1.3.1 PACLITAXEL

El paclitaxel es un complejo diterpénico aislado por primera vez de la corteza de *Taxus brevifolia* Nutt, en el año 1971 (Wani, 1971), el cual fue presentado como un potente anticancerígeno. El mecanismo de acción del paclitaxel se diferencia de los demás productos anticancerígenos por impedir la despolimerización de los

microtúbulos, evitando consigo la división de las células cancerosas. La unión del taxol en un sitio único en el dímero de tubulina promueve el ensamble de ésta en el microtúbulo (figura 3), estabilizándolo altamente, incluso después de aplicar un tratamiento con calcio o bajas temperaturas, condiciones que usualmente promueven el desensamble (Strobel, 2001). Por lo anterior, fue aprobado para su uso como tratamiento para cáncer de ovario en primera instancia en 1992 por la Food and Drug Administration (FDA por sus siglas en inglés), posteriormente y con bases clínicas fue probado con éxito en el tratamiento de cáncer de pulmón y mama, principalmente.

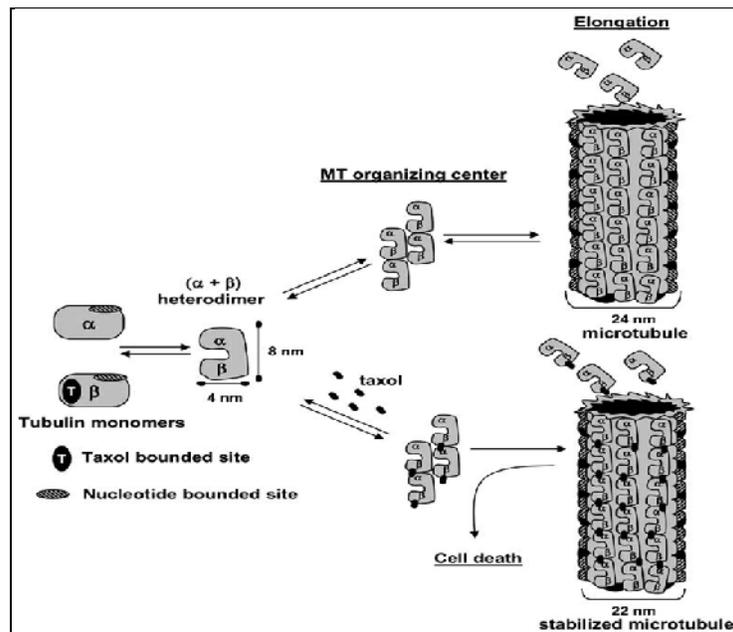


FIGURA 3. MECANISMO DE ACCIÓN DEL TAXOL SOBRE EL SISTEMA MICROTUBULAR DE LA CÉLULA. TOMADO DE EXPÓSITO ET. AL., 2009.

Los microtúbulos son el blanco principal de los fármacos antineoplásicos, pero a diferencia de los clásicos agentes antimicrotúbulos (vinblastina y colchicina), los cuales inducen la despolimerización de los mismos, el taxol promueve la polimerización de la tubulina dándole una altísima estabilidad, lo que ocasiona que el microtúbulo, en el huso mitótico, deje de ser funcional en el proceso de división celular (Rowinsky, 1990; Soto, 2000), por lo anterior las células quedan bloqueadas en la fase G₂/M del ciclo celular, lo que finalmente provoca la muerte de las mismas (Majumder y Jha, 2009). Además de su mecanismo citotóxico único, se ha comprobado que el taxol tiene un amplio espectro sobre diferentes tipos de cáncer, aunque su efecto sobre

muchos de ellos sigue siendo estudiado en laboratorio o como parte de pruebas pre-clínicas.

Lo anterior, provocó que la demanda sobre el fármaco incrementara de manera importante. Sin embargo, las concentraciones de paclitaxel en las plantas son muy variables, sin duda dependiente de la especie, mismas que van desde el 0.001% hasta 0.03% de peso seco (Expósito *et. al.*, 2009), (tabla 2).

TABLA 2
CONCENTRACIONES DE TAXOL EN DIFERENTES ESPECIES DEL GÉNERO *TAXUS*

Especie	Taxol (% peso seco)	Fuente
<i>Taxus cuspidata</i>	0.0074	Furmanowa <i>et al.</i> , 2000
<i>T. media</i>	0.0139	Furmanowa <i>et al.</i> , 2000
<i>T. media</i>	0.021	Furmanowa y Sykłowska-Baranek, 2000
<i>T. baccata</i>	0.0016	Cusidó <i>et al.</i> , 1999
<i>T. chinensis</i>	0.0035	Wu y Lin, 2003
<i>T. canadensis</i>	0.0117	Ketchum <i>et al.</i> , 1999
<i>T. baccata</i>	0.004	Khosroushahi <i>et al.</i> , 2006
<i>T. yunnanensis</i>	0.009-0.002	Wu <i>et al.</i> , 2001
<i>T. cuspidata</i>	0.038-0.0042	Xu <i>et al.</i> , 1998
<i>T. globosa</i>	0.0013-0.0085	Soto <i>et al.</i> , 2000
<i>T. globosa</i>	0.0027-0.027	Shemluck <i>et al.</i> , 2003

Sin embargo, una de las principales limitantes para que el taxol tenga una producción a escala industrial, es sin duda alguna la escasa fuente de obtención natural del metabolito, dado que las poblaciones silvestres tienen una distribución disyunta y generalmente se componen de pocos individuos. En general, cualquier miembro de las especies del género más estudiadas, tarda cerca de 100 años en alcanzar dimensiones adecuadas que permitan explotar su corteza, es decir, alcanzar un diámetro de 25 cm de tronco y una altura de entre 6 y 9 m como mínimo, sin mencionar el hecho de que la práctica antes mencionada deja desprovista a la planta de una protección natural, lo que ocasiona la eventual muerte del individuo (Soto, 2000; Ramos-Lobato *et. al.*, 2003).

A lo anterior se suma el hecho de que la concentración de taxol y sus análogos varían interespecífica e intraespecíficamente, incluso del órgano que se

estudia (corteza de tallo, corteza de raíz, ramitas y follaje), así como del sexo del individuo (recordando que son especies dioicas), clase diamétrica, exposición solar y época del año de la colecta (Ramos-Lobato *et. al.*, 2003).

3.1.3.2 PACLITAXEL EN *T. globosa*

De los tejos, el menos estudiado es la especie mexicana (*T. globosa*), en cuanto a su biología, ecología y potencial de producción de paclitaxel. A lo cual, pocos son los grupos que han centrado sus investigaciones en el posible aprovechamiento de la producción del metabolito. Soto y colaboradores (2000) reportaron, la presencia del metabolito tanto en corteza como en follaje de algunos ejemplares del Parque Nacional El Chico, Hidalgo. Así mismo, reportaron que la concentración variaba de 0.0013 a 0.0085% de paclitaxel (peso seco), destacando las acículas como los órganos de mayor concentración del mismo.

Por otro lado, Shemluck y colaboradores (2003) afirmaron que la cantidades de taxol que se pueden extraer de órganos de *T. globosa* eran muy variables, al igual que en otras especies, los cuales van desde 0.0027 a 0.027% (peso seco). Lo cual es muy equiparable a la producción del mismo metabolito por otras especies que han sido más estudiadas (tabla 2).

En adición a lo anterior, cabe señalar el estudio llevado a cabo por Martínez (2011), donde se menciona que la producción de paclitaxel en *T. globosa* puede aumentar de 0.091% en peso seco en condiciones normales a 0.121% en peso seco utilizando un elicitador (compuesto que cuando entra en contacto con un organismo estimula la síntesis de otro compuesto).

3.1.3.3 DEMANDA DEL FÁRMACO

Desde las primeras pruebas pre-clínicas, el paclitaxel ha tenido una gran aceptación como fármaco antineoplásico, dado su amplio espectro, modo de acción único y alta efectividad, lo que ha incrementado su demanda. Lo anterior exige una producción tal que satisfaga la necesidad creciente, si tomamos en cuenta que un tratamiento promedio contra cáncer, generalmente requiere entre 2.5-3 g de taxol, con dosis promedio de 175 mg cada 3 semanas. A lo anterior, tenemos que considerar la

escasa producción que se obtiene del metabolito (entre 0.02-0.05% del peso seco), por métodos convencionales de extracción directa de la planta: para obtener un gramo del fármaco se necesita en promedio 10 kg de corteza proveniente de tres árboles de por lo menos 100 años de edad (Bedi *et al.*, 1996; Expósito *et al.*, 2009).

A lo anterior, han surgido una serie de alternativas al aislamiento directo de la planta para la obtención del metabolito. En el año 1994 dos grupos independientes de investigación lograron con éxito la síntesis química total de paclitaxel (Holton *et al.*, 1994; Nicolaou *et al.*, 1994), por medio de por lo menos 28 reacciones químicas, lo que significó un alto costo de producción y una alternativa poco rentable. De igual forma, se propuso que a partir de diferentes especies de hongos endófitos asociados a algunas especies de *Taxus* se podría sustituir la práctica invasiva a las poblaciones de los tejos, al obtener directamente de los hongos el metabolito. Sin embargo, las bajas concentraciones del metabolito obtenidas por esta técnica se encuentra lejos de alcanzar los niveles industriales de la demanda actual (Visalakchi y Muthumary, 2010).

Por el contrario, una alternativa que ha logrado mediano éxito ha sido la semisíntesis o síntesis parcial, la cual consiste en utilizar un metabolito precursor avanzado de la ruta de síntesis del producto final, con el objetivo de completar el producto sólo por medio de algunas reacciones químicas (Camps García, *et al.*, 2010). En este caso se utiliza el bacatin-III, el cual se obtiene directamente de los tejos, que aunque sus concentraciones naturales son mayores que las de paclitaxel, no es lo suficientemente abundante para representar un menor impacto sobre el recurso silvestre, sin mencionar lo costoso y difícil de su aislamiento (Guo *et al.*, 2006). Lo anterior hace de la semisíntesis un procedimiento con ciertas carencias productivas.

Por otro lado, el cultivo de tejidos vegetales aplicado a prácticamente todas las especies del género *Taxus*, representa una alternativa promisoriosa a solventar la demanda del fármaco (Furmanowa *et al.*, 2000; Dong *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2005), lo que ayudaría a la conservación de las poblaciones silvestres de las especies, toda vez que se utilizarían cultivos de células a partir de fragmentos de unos cuantos individuos (hojas, tallos o semillas). Aunque actualmente ya existe un

proceso de cultivo de células vegetales en suspensión a gran escala para la producción de taxol, desarrollado y comercializado por la empresa alemana Phyton (Expósito *et al.*, 2009), los esfuerzos en laboratorio aplicando la mencionada técnica siguen vigentes, principalmente encaminados a, por un lado, incrementar los valores de concentración del fármaco producido por las células y por otro, aumentando las bajas tasas de proliferación celular de cultivos *in vitro* de cualquier especie del género *Taxus* (Barrios *et al.*, 2009).

3.2 EL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES COMO UNA HERRAMIENTA BIOTECNOLÓGICA

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) comprende una serie de técnicas fundamentadas en la totipotencialidad celular vegetal para controlar los procesos morfogénéticos, fisiológicos y bioquímicos de células o tejidos vegetales, bajo condiciones asépticas, medios nutritivos artificiales y específicos y condiciones ambientales controladas (Abdelnour-Esquivel, 1994).

El CTV es una técnica con un gran potencial de aplicación, principalmente en el apoyo a la ciencia básica y a la aplicada, particularmente en la producción y comercialización de derivados vegetales (tabla 3).

TABLA 3
APLICACIÓN DEL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

Aplicación	Descripción
Micropropagación	Se refiere a una metodología de reproducción asexual <i>in vitro</i> que permite multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajos costos y en tiempo económicamente costeable, con un mayor control sanitario del material a propagar que con métodos convencionales.
Obtención de plantas libres de virus	El CTV permite en muchos casos producir plantas libres de patógenos y de virus. Por medio de diferentes estrategias que pueden ser aplicadas o en conjunto cuando se requiere mayor esfuerzo para la eliminación del patógeno, generalmente se utiliza el cultivo de meristemos y la termoterapia.
Mejoramiento genético	Tradicionalmente algunas técnicas del CTV se utilizaron para ayudar y facilitar la creación de nuevas variedades o incrementar algunas características en especies de interés, sin embargo, en la actualidad se han sumado la ingeniería genética (introducción de genes) a la búsqueda de nuevas y mejores características.
Conservación de germoplasma	Es posible conservar células, tejidos y embriones por largo tiempo bajo condiciones asépticas, lo que permite disponer de los mismos en algún determinado tiempo, como una forma de conservación <i>ex situ</i> de preservar los recursos fitogenéticos.
Ciencia básica	Permite el estudio de la estructura y función de las proteínas, procesos fisiológicos y

Aplicación	Descripción
	bioquímicos, etapas clave del ciclo celular, metabolismo, entre algunos otros temas particulares.

Dentro del CTV, los procesos morfogénéticos o morfogénesis, pueden presentarse por medio de dos vías, la morfogénesis directa y la indirecta. La primera de ellas, se refiere al cultivo de órganos o secciones de una planta que pueden seguir su desarrollo predeterminado o generar otros órganos o plantas completas directamente a partir de un explante¹. Por su parte, la vía indirecta se caracteriza por presentar una fase de callo o tejido desorganizado entre la etapa inicial de explante y la formación de estructuras vegetales. Dicho callo puede contener algunos tipos de células especializadas encontradas en el tejido madre (figura 4).

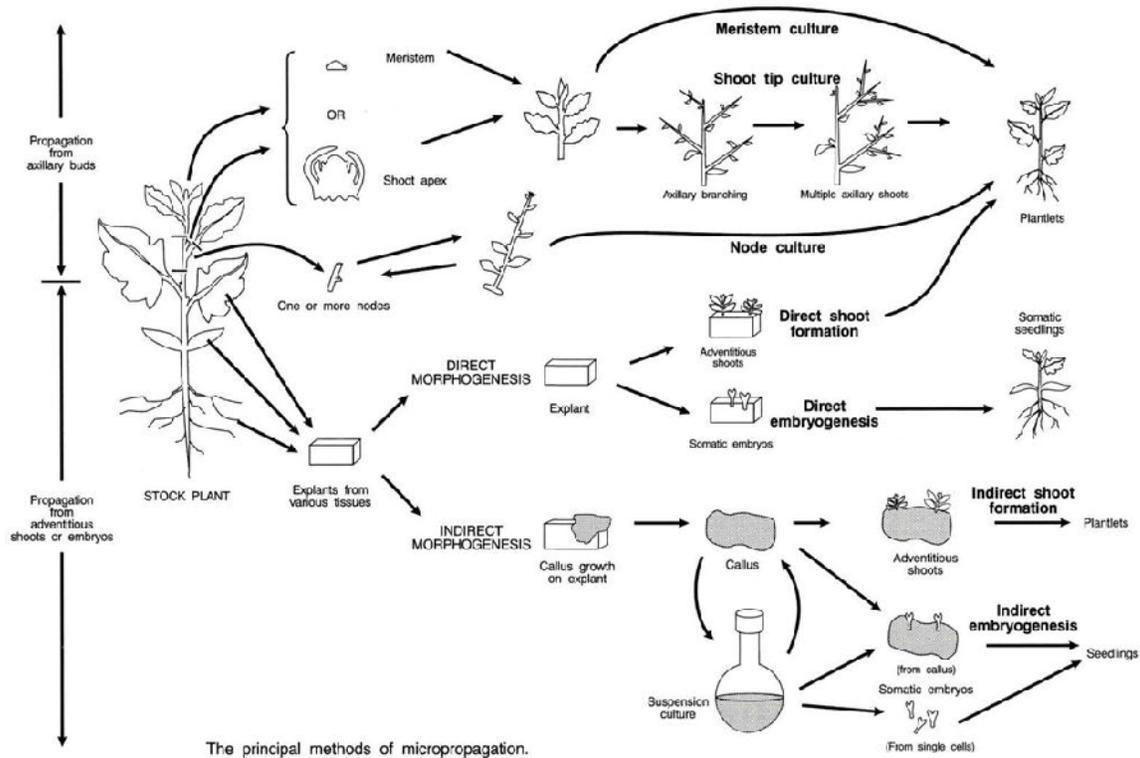


FIGURA 4. PROCESOS MORFOGÉNÉTICOS Y EL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

El tipo de respuesta morfogénética estará mediado por una serie de factores intrínsecos al explante utilizado (edad, posición dentro de la planta o cantidad

¹ Material inicial en el cultivo *in vitro* que puede ser un pedazo de tallo, hoja, yema o raíz, a partir del cual dará origen a los diferentes tipos de expresiones morfogénéticas.

endógena de fitoreguladores) y extrínsecos (tipo y componentes del medio de cultivo, condiciones de fotoperiodo, temperatura, pH, humedad, etc.).

Las características que se buscan, particularmente al trabajar con callos y células en suspensión, dependerán de los objetivos del trabajo experimental, sin embargo, una alta proliferación celular siempre es deseable.

3.2.1 FACTORES QUE CONTRIBUYEN AL INCREMENTO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Los factores que determinan la tasa de proliferación o división celular pueden ser agrupados en factores endógenos y exógenos. El genotipo de la planta es un factor endógeno determinante en la tasa de proliferación celular que presenten los cultivos *in vitro*, así como para la exigencia en su manejo, lo que muchas veces repercute en la oxidación de los mismos. De igual forma, los tipos de células que se utilizan para iniciar los cultivos determinará la tasa de proliferación, de esta forma, células meristemáticas tienden a una división celular más intensa que otras células con mayor diferenciación.

Los factores exógenos, a diferencia de los endógenos, son más controlables, tal es el caso de la condición de fotoperiodo, la temperatura y los componentes del medio de cultivo. Estos últimos son los factores de mayor interés en el cultivo *in vitro*.

A) REGULADORES DE CRECIMIENTO

A diferencia de los animales, la respuesta de las plantas a los estímulos ambientales involucra un crecimiento diferencial en lugar de patrones conductuales en respuesta a estímulos positivos o negativos. Este tipo de respuestas están mediadas por moléculas conocidas como fitoreguladores, de entre los que destacan seis grandes grupos: auxinas, giberelinas, citocininas, etileno, ácido abscísico y brasinoesteroides.

Los reguladores de crecimiento vegetal o fitoreguladores son un grupo de moléculas que promueven o inhiben el crecimiento y desarrollo vegetal, así como la respuesta a estímulos ambientales. Dichas moléculas estimulan las

respuestas morfológicas en bajas concentraciones. Sin embargo, en altas concentraciones pueden inhibir procesos (Sinha, 2004).

De todos los reguladores de crecimiento que se tiene conocimiento, las auxinas y citocininas se distinguen de las demás por ser moléculas indispensables para la viabilidad del organismo. Mientras que fitoreguladores como el ácido abscísico y el etileno regulan procesos específicos durante alguna etapa del desarrollo, las auxinas y citocininas se presentan de manera continua en el mismo, incluso la carencia de ellas es letal para el organismo (Taiz y Zeiger, 2006).

Las auxinas promueven el crecimiento vegetal mediante un mecanismo de elongación celular. Durante ese proceso, se incrementa la flexibilidad o elasticidad de la pared celular, caracterizado en dos eventos: el aflojamiento de la pared celular y el mantenimiento de la estructura relajada de la pared celular. Lo anterior tiene diferentes efectos y aplicaciones, con fundamento en que las diferentes concentraciones de auxinas permiten dirigir la respuesta morfogénica, así bajas concentraciones del fitoregulador permiten la elongación de las raíces, concentraciones más altas que las anteriores inhiben la elongación de raíces y permite la de tallos, mientras que concentraciones aun más altas promueven la floración (Sinha, 2004).

A diferencia de las auxinas, las citocininas promueven el crecimiento vegetal mediante la división celular, permitiendo un desarrollo de los órganos vegetales y el crecimiento secundario en algunas especies de plantas, también promueven la producción de pigmentos y el desarrollo de cloroplastos.

Dentro del cultivo de tejidos vegetales el uso adecuado de las concentraciones de estos dos fitoreguladores determinará la respuesta morfogénica esperada, dado que la alta proporción de auxinas con respecto a las citocininas provocará la formación de raíces, contrario a la formación de la parte aérea a partir de altas concentraciones de citocininas en comparación con las auxinas, mientras que una concentración similar de ambos permitirá mantener constante división celular evitando la diferenciación de las mismas.

B) COMPUESTOS ORGÁNICOS

Las vitaminas son sustancias orgánicas requeridas por los organismos en cantidades mínimas para una correcta función y crecimiento del mismo. Estas sustancias poseen diversas estructuras químicas como ácidos orgánicos, aminos, aminoácidos, esteroides, ésteres, etc.

Los efectos de las vitaminas aplicados en CTV son muy complejo, dado que dichas moléculas o incluso los metabolitos intermedios de su síntesis están relacionados en diversas reacciones bioquímicas importantes dentro de las plantas (tabla 4). Tal es el caso de la riboflavina que propicia el enraizamiento en algunas especies, biotina y ácido nicotínico han tenido efecto sobre la embriogénesis (Barwale, 1986) e incluso se ha demostrado el efecto sinérgico de la tiamina con la kinetina sobre el incremento en la masa celular sobre algunas especies (Abrahamian, 2011).

TABLA 4
EFECTO DE ALGUNAS VITAMINAS SOBRE LAS CÉLULAS VEGETALES

Vitamina	Función	Efecto
Tiamina	Cofactor en reacciones de carboxilación y biosíntesis de aminoácidos.	En diferentes concentraciones: <ul style="list-style-type: none">• Estimula el crecimiento celular• Estimula la embriogénesis• Disminuye o incrementa el peso del callo• Disminuye o aumenta el número de embriones
Riboflavina	Interviene en reacciones de óxido-reducción.	En diferentes concentraciones: <ul style="list-style-type: none">• Estimula o inhibe el enraizamiento.• Reduce la masa celular.
Vitamina D ₃	-----	Estimula el enraizamiento, la división celular y la absorción de calcio.
Biotina	Cofactor de enzimas	Incrementa el peso del callo, el número de embriones y su longitud.
Ácido nicotínico	Participa en reacciones de óxido-reducción.	Estimula la embriogénesis.

Tomado y modificado de Abrahamian, 2011.

Sin embargo, el efecto de la adición u omisión de las vitaminas en el medio de cultivo dependerá tanto del tipo y concentración de las mismas, como de la especie en particular. Por lo cual, asegurar un efecto deseado en la especie particular, es un tanto inseguro.

C) FACTORES DE CRECIMIENTO PARECIDOS A INSULINA (IGF's)

La insulina es una hormona peptídica encargada de mantener niveles normales de glucosa en sangre, facilitando la captación de la misma por parte de las células, regula el metabolismo de las proteínas, carbohidratos y lípidos y promueve además la división, diferenciación y crecimiento celular mediante la vía mitogénica de la proteína cinasa asociada a mitógenos (MAPK),-(Lima *et al.*, 2009).

Por su parte, los IGF's son péptidos estructuralmente relacionados con la insulina, que tienen acción estimuladora del crecimiento, potencian la acción de la insulina y regulan la proliferación celular (Granada, 2006).

Aunque la insulina y los IGF's están ampliamente estudiados en mamíferos no son exclusivos de este taxón, inclusive tampoco de los animales; en la década de 1920 se reconoció una proteína denominada glucocinina, la cual presentó actividad hipoglucémica (como la insulina), pero no reacción con el anticuerpo contra insulina bovina y su composición de aminoácidos fue diferente de ésta (Juárez, 2010). Años más tarde, a principios de la década de 1990 se reportó que la adición de insulina y factores de crecimiento parecidos a insulina (IGF-I, IGF-II) aceleraban el desarrollo post-germinativo de semillas como girasol, melón y pepino (Goodman y Davis, 1993). Lo cual fue explicado más tarde por Sánchez de Jiménez y su grupo de colaboradores (1999) donde menciona que la insulina estimula la fosforilación de la proteína S6 de la subunidad ribosomal 40S, aumentando la síntesis de ciertas proteínas tanto en tejidos animales como en maíz.

Más tarde, García Flores (2001) reportó la presencia de una proteína con actividad IGF (que aumentaba la fosforilación de la proteína ribosomal S6), aislada y purificada a partir de ejes embrionarios de maíz, por lo que se le llamó ZmIGF (*Zea mays* IGF). A lo anterior, se propuso que la ZmIGF es el factor de crecimiento endógeno del maíz que regula la síntesis específica de proteínas a través de una ruta similar a la de la insulina o los IGF's en las células animales.

Hasta el momento, los escasos reportes de la presencia de IGF's en plantas se refieren a un contado número de especies de angiospermas (maíz y *Arabidopsis*), mientras que no existen reportes en los demás taxa vegetales.

3.2.2 EL CULTIVO DE CALLOS Y CÉLULAS EN SUSPENSIÓN COMO MODELOS BIOLÓGICOS.

La formación de callo es una respuesta natural a las heridas en algún órgano de la planta, la cual consiste en un incremento en la división celular de forma desorganizada (Smith, 1986). Este tipo de formaciones puede ser producido *in vitro* por medio de ciertos fitoreguladores (principalmente auxinas) en el medio de cultivo, las células de los callos pueden variar en talla, forma, pigmentación y apariencia: algunas son células diferenciadas con grandes vacuolas y un núcleo al lado, mientras que las indiferenciadas son meristemáticas, isodiamétricas, pequeñas y carecen de prominente vacuola y presentan un núcleo grande y central.

Existen diferentes tipos de callo por su apariencia, color, grado de compactación y potencial morfogénico, muchas veces determinados por el origen y la edad del explante, así como el tipo de medio y componentes en el que se induzca.-En este sentido, el callo puede ser usado para dar inicio a suspensiones celulares y el que resulta más idóneo es aquel menos compacto o callo disgregable (George, 2007). El cultivo de callos ha sido utilizado para estudios de división celular, morfogénesis, metabolismo secundario y modificación genética.

Las suspensiones celulares son cultivos de células en medio líquido en movimiento, que pueden ser iniciadas a partir de un explante o a partir de callos disgregables, los componentes de un medio líquido son prácticamente los mismos que el de un medio sólido, salvo el componente gelificante (Smith, 1986). Las suspensiones celulares deben mantenerse en agitación constante para asegurar la dispersión celular y una adecuada aireación o intercambio de gases.

El trabajar con cultivos de células en suspensión representa la mejor opción en la producción a gran escala de metabolitos secundarios, incluso sobre el cultivo de callos, por representar un acortamiento en los tiempos de cultivo, alta productividad y dadas las condiciones controladas del cultivo es independiente de los cambios ambientales que supone interfieren con el metabolismo de la planta silvestre, previa caracterización de los cultivos celulares (Duong, 2006; Naill, 2004).

3.2.3 EVALUACIÓN DEL INCREMENTO EN LA MASA CELULAR

Los cultivos celulares, ya sea en forma de callo o en suspensiones celulares, presenta varias etapas durante su crecimiento: 1) la inducción de la división celular, 2) un periodo de división celular muy activo, 3) un periodo en el cual la velocidad de la división celular disminuye y por último, 4) un periodo de muerte celular, siempre y cuando se desarrollen en un medio cerrado. Dichas etapas son perfectamente reconocibles utilizando diferentes parámetros de medición, como conteo de células, peso seco, peso fresco, cuantificación de ADN, ARN, proteínas, etc.

Sin embargo, cualquiera que sea el método seleccionado proporcionará datos numéricos, los cuales representan el crecimiento celular medido. Cuando dichos datos son integrados en una gráfica simple formarán una curva, determinada curva de crecimiento, dentro de la cual se puede observar diferentes etapas o fases de crecimiento (figura 5). La primera fase, propiamente denominada fase lag, es el periodo de tiempo en el cual el inóculo se adapta a las condiciones del medio fresco. La siguiente etapa o fase log, es una fase de crecimiento exponencial, donde las células encuentran todos los requerimientos necesarios para alcanzar la velocidad máxima de división. La tercer fase corresponde a la fase estacionaria, donde los nutrientes comienzan a agotarse y el coeficiente de división es el mismo que el de muerte celular, por lo que la población celular se mantiene constante por un cierto periodo de tiempo; hasta que finalmente, comienza la fase de muerte debido a la deficiencia importante de nutrientes y presencia de toxina.

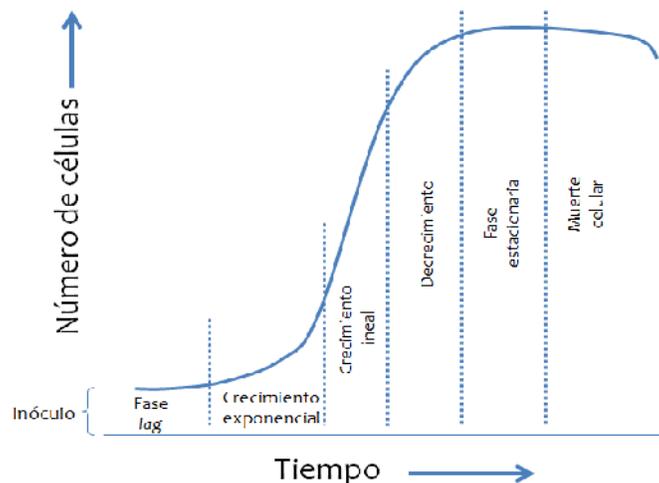


FIGURA 5. CURVA TÍPICA DE CRECIMIENTO DE UN CULTIVO CELULAR.

3.3 CULTIVOS IN VITRO DE *Taxus*

Actualmente, la investigación que se desarrolla alrededor de la producción de taxol con miras a niveles industriales, se concentran en la técnica de cultivo de tejidos vegetales (Expósito *et al.*, 2009), descrita con anterioridad. El primer trabajo que reportó la obtención del metabolito al aplicar el cultivo de tejidos vegetales en *Taxus brevifolia*, fue publicado en 1989 (Christen *et al.*, 1989). Posteriormente, la técnica fue aplicada a prácticamente todas las especies del género, siendo las más estudiadas *Taxus brevifolia*, *T. baccata* y *T. cuspidata*, los propósitos de la gran cantidad de investigaciones son muy variados: proliferación celular, estudio de la ruta de síntesis, ingeniería genética, micropropagación, incremento en la concentración de paclitaxel y transformación genética (tabla 5).

TABLA 5
REPORTES DEL USO DEL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES CON ESPECIES DEL GÉNERO *TAXUS*

Especie	Resumen	Autor
<i>Taxus baccata</i>	El artículo reporta un método de micropropagación de <i>Taxus baccata</i> a partir de árboles maduros y embriones cigóticos, utilizando sales de diferentes medios nutritivos (MS, B5 y WPM) adicionando diferentes tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento (BAP, Zea, Kin, ANA y AIB)	Abbasin <i>et al.</i> , 2010
<i>Taxus cuspidata</i>	Extracción de metabolitos secundarios a partir de callos de corteza de arboles de <i>Taxus cuspidata</i> , cultivados en un medio B5 modificado, diferentes concentraciones de ANA, probando dos condiciones de fotoperiodo.	Bai <i>et al.</i> , 2005
<i>T. cuspidata</i> y <i>T. media</i>	El incremento de paclitaxel y 10-DAB III adicionando diferentes concentraciones de fenilalanina, ácido aminobenzóico, sulfato de vanadilo y quitosán a un medio WR con ANA y picloram como reguladores de crecimiento. Incrementando con ello, la producción de ambos metabolitos	Furmonowa <i>et al.</i> , 2000
<i>T. chinensis</i>	Los autores probaron el efecto de la elicitación y su combinación con la cantidad de sacarosa en el crecimiento celular y la acumulación de diferentes taxanos en cultivos en suspensión. Utilizaron un medio MS adicionado con BA, 2,4-D y ANA en diferentes concentraciones. Se adicionaron diferentes concentraciones de metil jasmonato y soluciones concentradas de sacarosa.	Dong <i>et al.</i> , 2001
<i>T. chinensis</i>	Se probó la afinidad de dos elicitores para el incremento en la acumulación de taxol y taxanos relacionados en la especie <i>T. chinensis</i> . Primero a nivel teórico, con información de receptores de cada elicitor y posteriormente probando experimentalmente. Se utilizó para ello el medio de cultivo B5 modificado, adicionando inositol, diferentes vitaminas y BA como regulador de crecimiento.	Wang <i>et al.</i> , 2004
<i>T. baccata</i>	Establecimiento de células en suspensión utilizando un medio B5 modificado y ANA, 2,4-D y Kin como reguladores de crecimiento, con el objetivo de incrementar el crecimiento celular y la productividad de células de <i>Taxus</i>	Khosroushahi <i>et al.</i> , 2006

Especie	Resumen	Autor
	<i>baccata</i> . Después de la selección de las líneas celulares, se adicionaron al medio de cultivo diferentes concentraciones de algunos elicitores, precursores de taxanos y fuente de carbono.	
<i>T. brevifolia</i> y <i>T. baccata</i>	En este reporte se presenta la transformación genética de dos especies de género <i>Taxus</i> mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , donde se demuestra la transformación diferencial determinada por la diferencia específica particular. Se utilizó el medio WPM, usando ANA y BA como reguladores de crecimiento.	Han et al., 1994
<i>T. cuspidata</i>	El artículo describe el estudio del comportamiento del ciclo celular de células en suspensión de <i>Taxus cuspidata</i> . Se utilizó la técnica de citometría de flujo y protoplastos para conocer el porcentaje de células que participan en el ciclo celular, así como el comportamiento de la producción de paclitaxel.	Naill y Roberts, 2004.
<i>T. yunnanensis</i>	Se probó el efecto que tiene el tamaño y edad del inóculo de suspensiones celulares de <i>T. yunnanensis</i> sobre la producción de paclitaxel. Donde se probó que la producción del metabolito se incrementó conforme lo hace el tamaño del inóculo. Se utilizó los medios MS y B5 como medio de cultivo, adicionando diferentes concentraciones de ANA, 2,4-D y BA, además de diferentes compuestos orgánicos.	Zhang et al., 2002
<i>T. globosa</i>	El objetivo principal consistió en conocer el potencial de las líneas celulares de la especie en cuanto a producción de paclitaxel y poder comparar ésta, con los reportes de otras especies. Se utilizaron medios sólidos MS, WPM y B5, complementado con 2,4-D en algunas ocasiones, y medios líquidos MS y B5 utilizando diferentes concentraciones de metil jasmonato.	Barradas-Dermitz et. al. 2010

Los reportes del CTV aplicado a *T. globosa* son relativamente escasos en comparación con las demás especies estudiadas. No obstante, la investigación que se ha generado alrededor de dicha especie es variada desde distintos enfoques: elicitación, proliferación de callo, micropropagación y transformación genética (Barrios, 2009; Arandal, 2009; Barradas, 2010; Martínez, 2011)

3.3.1 PROBLEMAS PRESENTES EN CTV DE ESPECIES DEL GÉNERO *Taxus*

El género *Taxus* es en general un grupo de plantas recalcitrantes, contados son los autores que reportan micropropagación a partir de alguna especie del género (tabla 5) (Abbasin et al., 2010).

Uno de los principales problemas para establecer cultivos de especies del género *Taxus* es, en gran medida, la dificultad de obtener un eficiente y efectivo método de desinfección, ya que éste necesita ser agresivo para poder eliminar toda fuente de contaminación, principalmente hongos endófitos, pero no tanto para dañar la integridad y viabilidad del tejido madre.

A lo anterior se suma la dificultad que se presenta para poder estabilizar cultivos, Furmarowa (2000) reportó que tardó hasta 1.5 años en obtener cultivos estables de raíces de *T. x media*.

Por otro lado, una vez que se logra tener cultivos estables de callos y células en suspensión de especies del género, el principal problema se presenta en la alta tasa de oxidación de los mismos, provocado por la dificultad en su manejo (Bai *et al.*, 2005; Ketchum *et al.*, 2007). Barradas-Dermitz (2010) mencionó que gran parte de sus cultivos, durante la fase experimental presentaron considerable oxidación, lo que derivó en la pérdida de un alto porcentaje de los cultivos establecidos.

3.4 INGENIERÍA GENÉTICA EN PLANTAS

La ingeniería genética, definida como una rama de la biotecnología, representa el medio por el cual se puede conocer el rol de genes específicos dentro de una ruta metabólica, en el crecimiento y/o en el desarrollo de un organismo. Particularmente, la ingeniería genética en plantas abre además, la posibilidad de utilizarlas como pequeñas fábricas para la producción o incremento de ciertas moléculas útiles para el hombre, introduciendo genes ajenos a las células vegetales, los cuales deben ser integrados al genoma de la planta para ser expresados y transmitidos de generación en generación (Lindsey, 1996). Sin embargo, las metodologías más utilizadas en la transformación genética de plantas tienen desventajas particulares y es preciso mejorar el control de la expresión de los transgenes una vez realizada la transformación (Rakoczy, 2002).

3.4.1 MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

Actualmente, la transformación genética en plantas se realiza casi de manera rutinaria a través de tres técnicas, dos de ellas de manera directa y la tercera mediante el empleo de un vector. El método indirecto o mediado por un vector, consiste en utilizar células bacterianas (*Agrobacterium tumefaciens* y *A. rhizogenes*) para introducir a la célula vegetal un gen específico. Mientras que los métodos directos no utilizan dichos vectores (transformación por protoplastos y biobalística).

El sistema *Agrobacterium* está basado en la capacidad natural de las especies del género *Agrobacterium* (*A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*, principalmente) de integrar establemente parte de su material genético dentro del genoma de su hospedero vegetal. En la naturaleza, dichas bacterias introducen en las células vegetales la región T-ADN del plásmido inductor de la tumoración (plásmido Ti, figura 6). El T-ADN está integrado por oncogenes (codifican para enzimas involucradas en la biosíntesis de auxinas y citocininas en las células transformadas) y genes que codifican para la producción de opinas (aprovechadas por la misma bacteria como fuente de nitrógeno). Debido a la sobreproducción de fitorreguladores comienza un proceso de crecimiento neoplásico en la región infectada de la planta, lo que conlleva a una mayor producción de opinas para las bacterias hospederas (Valderrama et al., 2005; Tzfira, 2006).

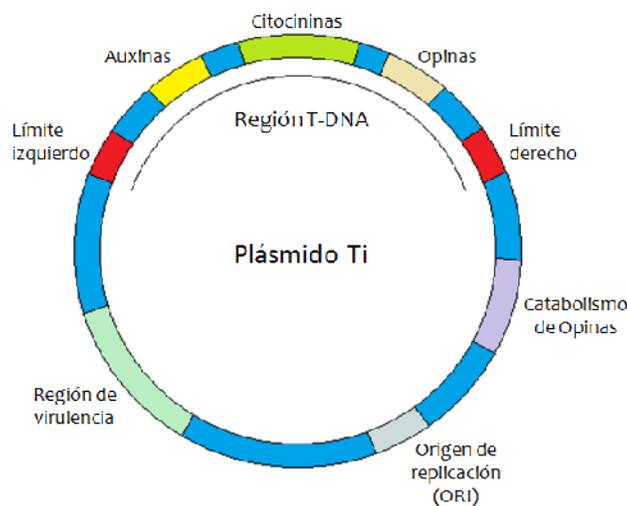


FIGURA 6. MAPA DEL PLÁSMIDO TI

Se ha demostrado que el reemplazo los genes bacterianos de la región T-ADN por genes específicos que funcionan en plantas o por otros genes de interés en la manipulación genética de las especies vegetales, no interfiere en el proceso de infección de la bacteria. Por lo que el sistema *Agrobacterium* representa un sistema biológico natural de transformación genética vegetal.

Aun con las ventajas y las capacidades que poseen las especies de *Agrobacterium* para infectar una gran variedad de especies de angiospermas, esta

metodología presenta dificultades en algunos grupos de monocotiledoneas, incluso con las cepas más virulentas (Vongpaseuth, 2007; Rakoczy, 2002), por lo que el sistema de infección es genotipo-específico.

Otro de los métodos más utilizado en ingeniería genética en plantas es el bombardeo de microproyectiles o biobalística, el cual no es especie-específico por lo que se puede aplicar a cualquier especie. Este método consiste en penetrar las células o tejidos vegetales con microesferas de metal (oro o tungsteno de 1-4 μm de diámetro) cubiertas con ADN, el cual una vez dentro de la célula puede ser liberado y expresado transitoriamente o puede ser integrado de forma estable en el cromosoma vegetal. Las micropartículas cubiertas con el ADN son aceleradas en dirección al tejido o células, mediante diferentes metodologías dependientes del equipo a utilizar, la más empleada consiste en descargas de helio a alta presión.

En el caso de las coníferas recalcitrantes la transformación mediada por biobalística ha sido utilizada para introducir fragmentos de DNA, lo que representa una alternativa al uso de *Agrobacterium* (Vongpaseuth, 2007). Sin embargo, la inserción de múltiples copias de transgenes puede producir supresión o cambio en la expresión de los mismos. Sin contar que el mecanismo de integración del transgen al genoma de la planta es incierto (Lindsey, 1996).

Independientemente del sistema elegido para la transformación genética de cualquier especie vegetal, es necesario conservar sólo aquellas células transformadas, eliminando las que no fueron transformadas mediante el uso de un agente selectivo. Lo que permitirá el crecimiento y desarrollo de tejido que expresa el marcador de selección introducido.

3.4.2 MÉTODOS REPORTADOS DE TRANSFORMACIÓN PARA *Taxus*

La ingeniería genética es una tecnología muy prometedora para lograr la completa industrialización de la producción de taxol a partir de células de cualquier especie del género *Taxus* (Han *et al.*, 2000). Gracias a los estudios en bioquímica se tiene conocimiento de cuáles son las enzimas que intervienen en la ruta de biosíntesis del taxol (Besumbes *et al.*, 2004; Nims *et al.*, 2006), con lo cual se pueden manipular aquellas que sean clave en el proceso, para obtener células constantemente

productoras del metabolito. Sin embargo, para lograr lo anterior, es necesario contar con un protocolo eficiente de transformación genética, en términos de alta estabilidad y rendimiento de células transformadas (Han *et al.*, 2000, Vongpaseuth *et al.*, 2007).

Retomando lo anterior, pocas son las publicaciones de protocolos de transformación genética para especies del género *Taxus* (tabla 6). Tal es el caso de Han *et al.* (1994), donde describen la transformación genética de tallos de *T. baccata* y *T. brevifolia* utilizando cepas de *Agrobacterium tumefaciens*.

TABLA 6
MÉTODOS REPORTADOS PARA LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE ALGUNAS ESPECIES DEL GÉNERO TAXUS

Método	Resumen	Autor
Dimetil sulfóxido y sonicación.	Embriones cigóticos germinados de <i>Taxus brevifolia</i> fueron transformados mediante. El gen de la B-glucoronidasa fue el gen reportero, el cual tuvo una expresión diferencial conforme el estado de desarrollo del embrión, generalmente la expresión fue más notoria después de las 8 semanas posteriores a la transformación.	Luan <i>et al.</i> , 1996
Agrobacterium	Se reporta la transformación genética de dos especies del género <i>Taxus</i> , mediada por <i>A. tumefaciens</i> . Se inocularon segmentos de tallo con dos cepas de la bacteria. Lo que originó un callo, después de cierto tiempo. La transformación se corroboró con un análisis de southern blot para determinar la presencia de T-DNA.	Han <i>et al.</i> , 1994
Agrobacterium	Se utilizaron cepas de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> para transformar plántulas de <i>Taxus x media</i> y poder iniciar y estabilizar cultivos de raíces, a partir de los cuales se obtuvo un considerable incremento en la acumulación de paclitaxel posterior a la elicitación.	Furmanowa <i>et al.</i> , 2000
Agrobacterium	Suspensiones celulares de <i>T. cuspidata</i> fueron transformadas mediante el uso de <i>A. tumefaciens</i> , la eficiencia de la transformación se corroboró mediante PCR para encontrar el gen <i>gfp</i> y análisis de western blot para reconocer GFP. El autor mencionó que la efectividad del método aumentó conforme aumentaron los días de cultivo entre las células vegetales y las bacterianas en conjunto, además del uso del sonicador.	Kim <i>et al.</i> , 2000
Agrobacterium	Se reportó la transformación genética de una línea celular de <i>T. cuspidata</i> mediante el método de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , la cual fue mantenida por más de 20 meses. Con lo cual se demostró la expresión del gen reportero. Por primera vez se reportó la transformación permanente de las células de alguna especie del género <i>Taxus</i> .	Ketchum <i>et al.</i> , 2007
Biobalística	Se reportó la transformación genética transitoria de células en suspensión de especies del género <i>Taxus</i> mediante la técnica de biobalística. Para lo anterior se utilizó una bomba de alta presión y se mencionó que múltiples bombardeos aseguraron una exitosa transformación.	Vongpaseuth <i>et al.</i> , 2007
Agrobacterium	Cultivos de raíz de <i>T. cuspidata</i> fueron estabilizados a partir de la infección de plántulas con <i>A. rhizogenes</i> , con la finalidad de comprobar la acumulación de paclitaxel. Cabe destacar que de las 107 líneas celulares que se trataron de infectar, únicamente tres tuvieron éxito.	Kim <i>et al.</i> , 2009

Otro reporte destacado es el de Ketchum *et al.* (2007), los cuales emplearon dos especies de *Agrobacterium* para transformar células de *T. cuspidata* y *T. chinensis*. Las células transformadas se mantuvieron por periodos entre 9 y 20 meses, sin la pérdida de la expresión de los genes reporteros. Lo destacable del reporte de Ketchum en comparación con otros grupos que declaran haber transformado células de alguna especie del género *Taxus* mediante el uso de *A. tumefaciens*, es que él reportó una transformación permanente, lo que hasta este momento no se ha documentado. Sin embargo, se menciona que el principal problema que presenta trabajar con bacterias en la transformación genética, es el estrés que la infección provoca en las células, de por sí ya difíciles de manipular *in vitro*, además de la dificultad que se tiene para eliminar toda célula bacteriana que pudiera ser fuente de contaminación posterior.

El segundo método reportado es el de biobalística, Vongpaseuth (2007) y su grupo de colaboradores reportan un protocolo de transformación genética donde se documenta la expresión transitoria de los genes reporteros y la confirmación de dicha transformación a través de técnicas moleculares. El autor asegura que un múltiple bombardeo aumenta las posibilidades de transformación genética.

A lo anterior, cabe destacar que de los escasos protocolos de transformación genética referidos, sólo uno reporta la expresión permanente, lo que demuestra la necesidad de mejorar las técnicas aplicadas a especies del género, en particular a *T. globosa*, ya que no existen antecedentes.

4. JUSTIFICACIÓN

Taxus globosa es una especie vegetal de importancia farmacéutica con un gran potencial para la producción de paclitaxel, no obstante, es una planta de baja densidad poblacional y los hábitats donde se encuentra presentan problemas de conservación, por lo que se considera una especie bajo protección especial según NOM-059-SEMARNAT-2010, por lo que su aprovechamiento no es una opción.

A pesar de que los individuos de esta especie no se emplean directamente para la obtención del fármaco, diversos estudios han demostrado que las cantidades de paclitaxel que pueden producir son equiparables a la producción del metabolito por otras especies del género. Sin embargo, es necesario resolver los dos principales problemas técnicos que presenta el trabajar con dichas especies: bajos valores de concentración del fármaco, así como las bajas tasas de proliferación celular.

A lo anterior, el cultivo de tejidos vegetales (CTV) representa la tecnología por medio de la cual será posible atender ambas situaciones. Por un lado, optimizando los componentes y condiciones de cultivo. En cuanto a la transformación genética mediada por biobalística, ésta promete en algún momento incrementar las concentraciones del fármaco, para ello es necesario el diseño de un protocolo de transformación, desarrollado particularmente para *T. globosa* y aún más específico para células de callo.

5. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Optimizar las condiciones de cultivo *in vitro* para la obtención de cultivos prolíferos de *Taxus globosa*, así como desarrollar un protocolo de transformación genética.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el efecto de insulina sobre la inducción de cultivos de callos prolíferos
- Probar diferentes medios de cultivo sobre la proliferación celular
- Evaluar el efecto de diferentes reguladores de crecimiento sobre la proliferación de células en suspensión.
- Determinar las diferentes etapas de crecimiento de cultivos en suspensión de *Taxus globosa*.
- Probar diferentes concentraciones de Basta para seleccionar callos transformados
- Realizar la transformación genética de callos de *Taxus globosa* mediante el uso de biobalística.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

En base a los objetivos del proyecto se planteó la ruta crítica en tres etapas (figura 7), las cuales se llevaron a cabo en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM, bajo la dirección de la M. en C. Ma. Teresa de Jesús Olivera Flores. Cabe señalar que las pruebas moleculares de la línea experimental III, para corroborar la transformación genética, se llevaron a cabo en el laboratorio 114 del mismo departamento bajo la asesoría del Biólogo Víctor Sánchez Camargo.

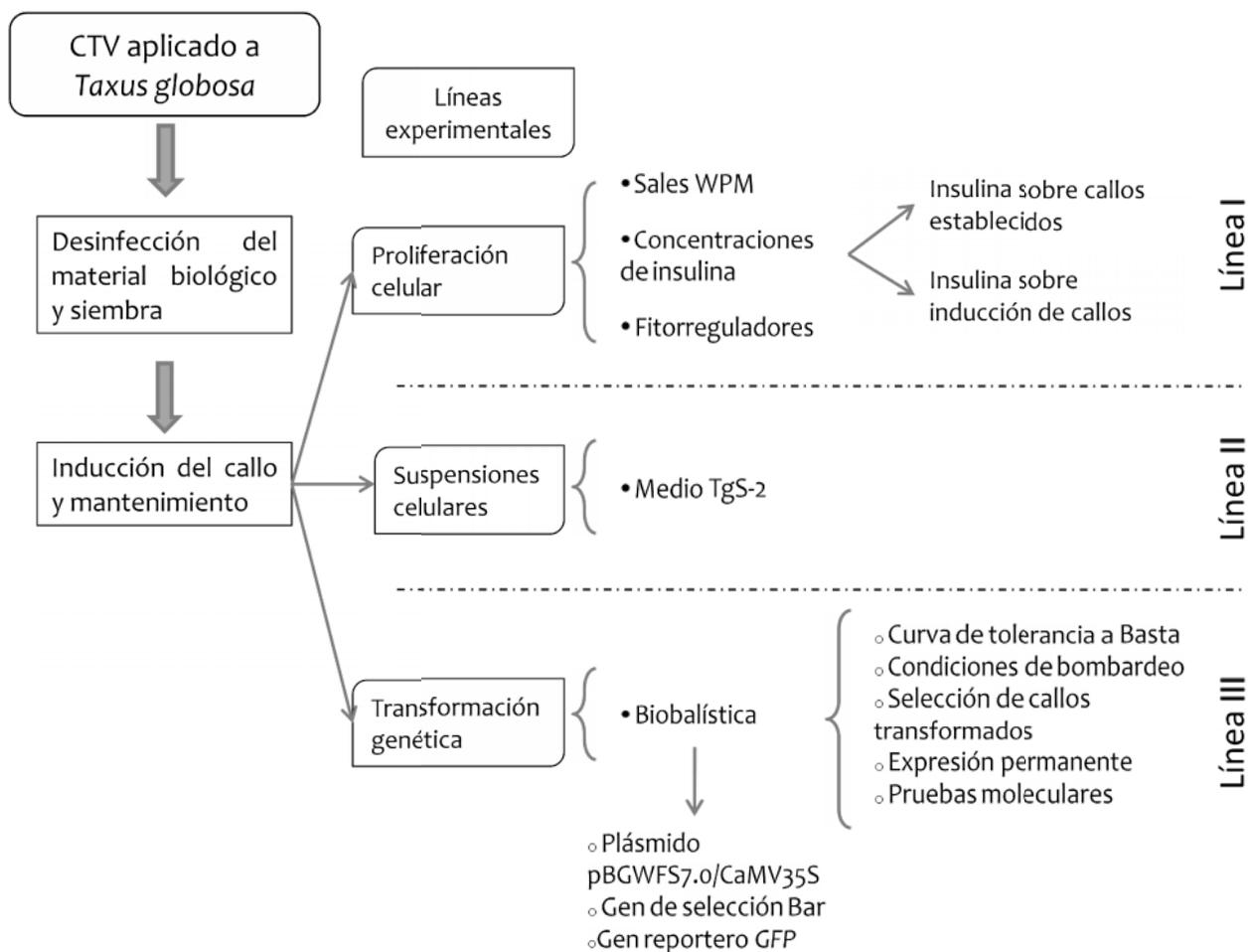


FIGURA 7. RUTA CRÍTICA DE LA METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

6.1 DESINFECCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO Y LA SIEMBRA

Las acículas y tallos que sirvieron como explantes para iniciar los cultivos *in vitro*, fueron tomados de los brotes de estacas de *Taxus globosa*, mantenidas en condiciones de invernadero. Todas las plantas se sometieron a un programa de mantenimiento, el cual consistió en riegos periódicos (2 veces por semana) y fertilizaciones dos veces cada mes con una solución de sales MS al 50%, vitaminas R2 al 100% y BA (1 mg/L), para estimular la formación de nuevos brotes.

Los explantes se seleccionaron en función de su edad y coloración, se tomaron únicamente aquellas acículas jóvenes de 3 a 4cm de longitud, con coloración verde claro, así como los tallos a los que pertenecían. Seguido de su selección, los explantes se desinfectaron con el protocolo modificado reportado por Martínez (2011) en condiciones de asepsia dentro de la campana de flujo laminar (figura 8).

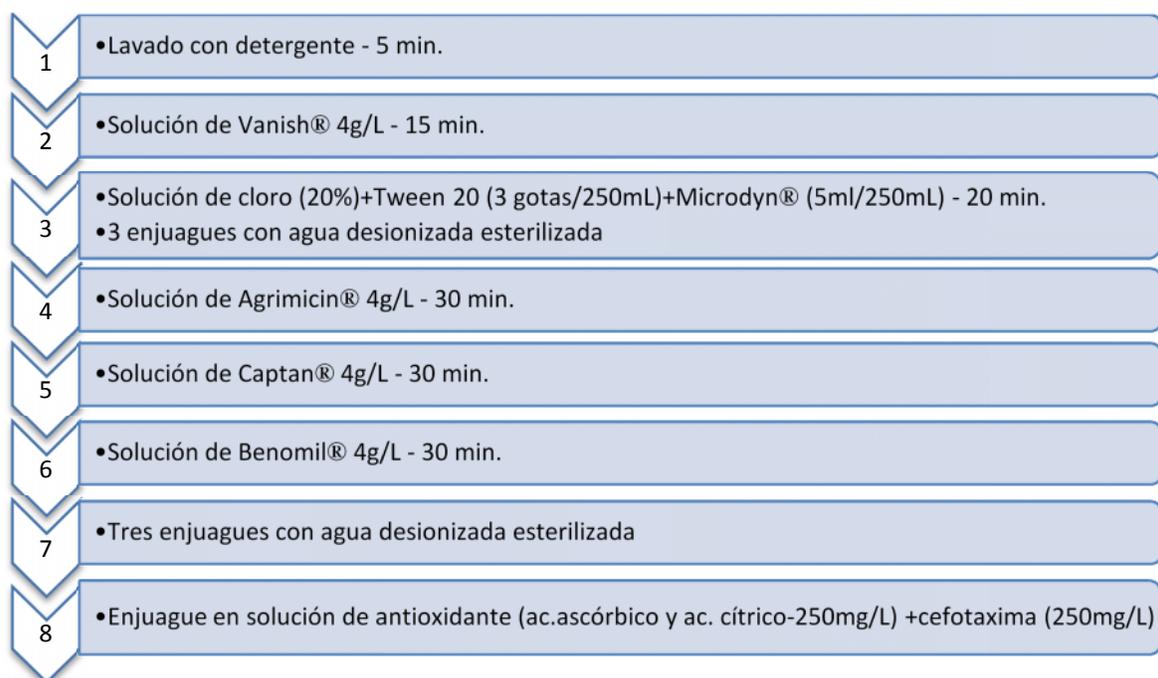


FIGURA 8. PROTOCOLO DE DESINFECCIÓN DE ACÍCULAS Y TALLOS DE *TAXUS GLOBOSA*

Una vez terminada la desinfección se llevó a cabo la siembra de los explantes en cajas Petri de 90mm de diámetro de diámetro que contenían 25ml de medio To reportado por Martínez (2011), (tabla 7). La preparación del material biológico antes de la siembra consistió en retirar los márgenes de las acículas, después de haberla cortado transversalmente, para finalmente hacer ligeras heridas por el haz y el

envés con ayuda de la navaja del bisturí, se mantuvo la polaridad del explante. Por otro lado, los explantes de tallo tuvieron una longitud aproximada de 1 cm, fueron cortados longitudinalmente y sembrados con el corte en contacto con el medio de cultivo, además de ligeros cortes en la superficie de la corteza, todo ello con la finalidad de estimular la formación de callo en aquellos sitios de corte.

Para la siembra se emplearon 40 cajas Petri con medio de cultivo, cuyo empleo es explicado en el apartado siguiente.

TABLA 7
COMPONENTES DEL MEDIO DE CULTIVO T₀

Componente	Concentración
Sales B5	100%
Vitaminas Kao	100%
Vitaminas Nitsch	100%
Ácido aspártico	0.127 g/L
Arginina	0.175 g/L
Glicina	0.072 g/L
Prolina	0.112 g/L
Picloram	1 mg/L
Kinetina	1.1 mg/L
PVP	1 g/L
Sacarosa	30 g/L
Gellan	3 g/L
pH	5.7

6.2 INDUCCIÓN DE CALLO Y MANTENIMIENTO

La inducción del callo tuvo lugar a partir de acículas y tallos, los cuales fueron sembrados en el medio T₀ (tabla 7), el cual fue esterilizado en una autoclave vertical a 121°C de temperatura y 1.2 kg/cm² de presión durante 18 minutos, y servido en campana de flujo laminar adicionando cefotaxima (250 mg/L) como antibiótico para asegurar el éxito del protocolo de desinfección.

Los explantes se mantuvieron en el medio T₀+cefotaxima durante un periodo de 9 semanas, se llevaron a cabo subcultivos periódicos a medio fresco cada tres semanas en cajas Petri. Una vez transcurrido este periodo, el callo generado de acículas y tallos fue retirado del explante original para ser proliferado.

Debido a la alta oxidación de los callos cuando eran subcultivados en bajas densidades, los callos generados por los diferentes explantes fueron agrupados en un

mismo medio, para evitar la pérdida del material celular. Aproximadamente en cada tubo con 20 ml de medio To, se colocaba entre 1.5 y 2 g de callo en cada subcultivo.

Las condiciones de incubación fueron establecidas desde la siembra de los explantes, se mantuvo un lote de 13 cajas Petri con aproximadamente 18 explantes de acículas y otro de 7 cajas Petri con aproximadamente 18 explantes de tallos en oscuridad a una temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. Mientras que otro lote igual se mantuvo en fotoperiodo a 16-8 horas luz-oscuridad, a una temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Para la etapa de proliferación del callo se llevaron a cabo subcultivos periódicos cada tres semanas, en 20 ml de medio To, servido en tubos de ensayo de capacidad de 40 ml. Una vez que se obtenía callo de los explantes, no volvieron a emplearse cajas Petri para los subcultivos ni para los diferentes ensayos.

Una vez que el callo en proliferación alcanzó los volúmenes necesarios, se pudieron llevar a cabo las diferentes líneas experimentales.

6.3 LÍNEA EXPERIMENTAL I: AUMENTO EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR.

Para el incremento de la proliferación de células de *T. globosa* se probaron diferentes estrategias, ya sea adicionando algún componente al medio original o cambiando los fitorreguladores, como se explicará posteriormente.

6.3.1 MEDIO To MODIFICADO CON SALES WPM

En este ensayo se probó modificar el medio To cambiando las sales B5 que originalmente se utilizaron, por sales WPM (McCown *et al.*, 1981), manteniendo los mismos componentes orgánicos y fitoreguladores, así como sus proporciones correspondientes (tabla 8), empleando los tubos de 40 ml. El Medio To modificado con sales WPM fue probado con callo de tallo previamente establecido con medio To, en cinco repeticiones.

TABLA 8
COMPONENTES DEL MEDIO DE CULTIVO T₀ MODIFICADO

Componente	Concentración
Sales WPM	100%
Vitaminas Kao	100%
Vitaminas Nitsch	100%
Ácido aspártico	0.127 g/L
Arginina	0.175 g/L
Glicina	0.072 g/L
Prolina	0.112 g/L
Picloram	1 mg/L
Kinetina	1.1 mg/L
PVP	1 g/L
Sacarosa	30 g/L
Gellan	3 g/L
pH	5.7

De igual forma, los cultivos fueron mantenidos bajo condiciones de oscuridad a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, los subcultivos se llevaron a cabo en periodos de 3 semanas entre cada uno.

Durante este ensayo se evaluó cualitativamente la oxidación de los callos en relación a su aspecto y coloración, la coloración más oscura reflejó más oxidación que la coloración más clara.

6.3.2 TRATAMIENTO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE INSULINA

Durante esta línea experimental se probó el efecto de diferentes concentraciones de insulina (0, 150, 300 y 450 U/L de HUMULIN®-R) sobre la proliferación de callos de *T. globosa*.

El medio de cultivo T₀ se preparó sin insulina para ser esterilizado en autoclave a 121°C durante 18 minutos. Una vez esterilizado el medio de cultivo se agregaron, dentro de campana, las diferentes concentraciones de la hormona, se requirió que el medio alcanzara una temperatura aproximada de 40°C para evitar al máximo que las altas temperaturas pudieran desnaturalizar la proteína.

a) EFECTO DE LA INSULINA SOBRE CALLOS ESTABLECIDOS DE *T. globosa*

Se probó el efecto de la insulina sobre callos de tallo previamente establecidos en medio To (cinco repeticiones para cada tratamiento), los cuales permanecieron durante 6 semanas en los diferentes tratamientos, con subcultivos cada tres semanas.

Posteriormente los callos se llevaron a suspensiones celulares con la finalidad de tomar datos para la formulación de una cinética de crecimiento, tanto en peso fresco como en peso seco, de cada uno de los tratamientos, cuyo proceso es explicado en páginas subsecuentes.

b) EFECTO DE LA INSULINA SOBRE LA INDUCCIÓN DE CALLOS DE *T. globosa*

Adicionalmente se probó agregar las diferentes concentraciones de insulina desde la etapa de inducción del callo en explantes de tallo y acícula, para probar la diferencia que había entre callos con periodos cortos y periodos largos de tratamiento sobre la proliferación celular. Los componentes del medio se mantuvieron constantes.

El procedimiento de desinfección y siembra se siguió nuevamente como ya se ha mencionado, se emplearon 20 cajas para cada uno de los tratamientos, de los cuales 14 correspondieron a explantes de acícula (7 en fotoperiodo y 7 en oscuridad), mientras que las 6 cajas restantes correspondían a tallo (3 fotoperiodo y 3 oscuridad). Las mismas proporciones de siembra fueron empleadas en los diferentes tratamientos. La temperatura promedio fue de 25°C.

Para comparar el efecto de cada una de las concentraciones contra el control (To) se llevó a cabo una cinética de crecimiento de los callos a través de peso fresco y seco, cuyo proceso es explicado en páginas subsecuentes.

6.3.3 FITOREGULADORES

Mediante otro ensayo y tomando como base el medio To, se probó cambiar los reguladores de crecimiento, haciendo combinaciones entre diferentes auxinas (Picloram, AIA, AIB y ANA) y diferentes citocininas (Kinetina y BA). Con base a las combinaciones, se prepararon cuatro diferentes medios de cultivo (tabla 9), donde

se probó el efecto de los mismos sobre la proliferación celular sobre callo que se indujo inicialmente en medio de cultivo To. Los componentes orgánicos y las sales se conservaron conforme al medio original.

TABLA 9
DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO PROBADOS EN LA PROLIFERACIÓN DE CALLOS DE *T. globosa*

Componentes	To	H1	H2	H3
Sales	B5	B5	B5	B5
Aminoácidos	Arg, Gli, Pro, Asp	Arg, Gli, Pro, Asp	Arg, Gli, Pro, Asp	Arg, Gli, Pro, Asp
Vitaminas	Kao y Nitsch	Kao y Nitsch	Kao y Nitsch	Kao y Nitsch
Fitoreguladores	Pic 1mg/L Kin 1.1mg/L	Pic 1mg/L BA1.1mg/L	ANA 2.5mg/L AIA 2.5mg/L AIB 2.5mg/L BA 1mg/L	ANA 2.5mg/L AIA 2.5mg/L AIB 2.5mg/L Kin 1mg/L
PVP	1 g/L	1 g/L	1 g/L	1 g/L
Sacarosa	30 g/L	30 g/L	30 g/L	30 g/L

Posteriormente se llevó a cabo una cinética de crecimiento de los diferentes tratamientos (cada uno de ellos con 3 repeticiones en cada una de las tomas de peso que conforman la cinética) con la finalidad de discernir cuál de ellos tuvo un mejor efecto sobre la proliferación celular de callos de tallo.

6.3.4 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE CALLOS

En los diferentes ensayos descritos con anterioridad, se mencionó la elaboración de una cinética de crecimiento en callos, para conocer el comportamiento del incremento de la masa celular e identificar las diferentes etapas de crecimiento (lag, exponencial o logarítmica, de desaceleración y estacionaria), así como determinar el máximo de masa celular que se gana entre un subcultivo y otro.

El procedimiento de la elaboración de la cinética fue básicamente el mismo en los diferentes ensayos que la requería, con diferencia en el número de repeticiones. Independientemente del número de repeticiones, se inoculó cada uno de los tubos por tratamiento con 1.5 g de callo, lo que se consideró el día cero de la cinética. A partir de las tres semanas del inicio de la cinética se tomó el peso fresco de los callos en cada uno de los diferentes tratamientos en condiciones de asepsia, para

así poder regresar el callo a su respectivo tubo. Se volvió a tomar el peso fresco de los callos a las tres semanas de la toma anterior. De esta forma, se pudo obtener una cinética de crecimiento de 6 semanas o 42 días de duración.

6.4 LÍNEA EXPERIMENTAL II: CÉLULAS EN SUSPENSIÓN.

Se probó el comportamiento en cuanto a oxidación y proliferación celular de los callos de acículas y tallos de *T. globosa* en medios líquidos, en condiciones tanto de luz como de oscuridad, a una temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. Los cultivos en suspensión se mantuvieron en agitación constante.

El medio en suspensión, denominado TgS-2, contiene como base las sales B5 y AIA+ANA+AIB y BA como reguladores de crecimiento, entre otros componentes (tabla 10).

TABLA 10
COMPONENTES DEL MEDIO TgS-2

Componente	Concentración
Sales B5	100%
Vitaminas Kao	100%
Vitaminas Nitsch	100%
Ácido aspártico	0.127 g/L
Arginina	0.175 g/L
Glicina	0.072 g/L
Prolina	0.112 g/L
ANA	2.5 mg/L
AIB	2.5 mg/L
AIA	2.5 mg/L
BA	1 mg/L
PVP	1 g/L
Sacarosa	30 g/L
pH	5.7

Se utilizaron matraces de capacidad de 125 ml con 15 ml de medio TgS-2 y un inóculo de 2 g de callo. Los subcultivos se hicieron cada dos semanas y consistieron en cambiar parcialmente el medio de cultivo. Antes del subcultivo se dejaron en reposo las suspensiones celulares para poder, con la ayuda de una pipeta, retirar 8 ml de medio y adicionar la misma cantidad de medio fresco.

6.4.1 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN.

La cinética de crecimiento fue tomada en dos condiciones, peso fresco y peso seco, haciendo la medición semanalmente. La primera condición consistió en la cosecha de todas las células y agregados celulares contenidos en cada matraz, por medio de filtración al vacío con la ayuda de un matraz kitasato, un embudo de porcelana y una bomba de vacío. Antes del filtrado se tomó el peso del papel filtro con la finalidad de ser restado al terminar el proceso, para obtener el peso fresco, posteriormente se dejó secar el papel filtro con la masa celular por un periodo de 3 días y nuevamente al peso total se restó el del papel filtro para obtener el peso seco. Este proceso se hizo por triplicado cada semana durante tres semanas.

6.5 LÍNEA EXPERIMENTAL III: TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

La transformación genética de callos de *T. globosa*, se llevó a cabo por medio de la técnica de transformación directa biobalística, se utilizó el plásmido pBGWFS7.0/CaMV35S (Sánchez Camargo, 2012) el cual tiene el promotor CaMV35s del virus del mosaico de la coliflor, el gen *bar* como gen de selección, el cual le confiere resistencia a glufosinato de amonio y los genes reporteros *gus* y *gfp* (figura 9).

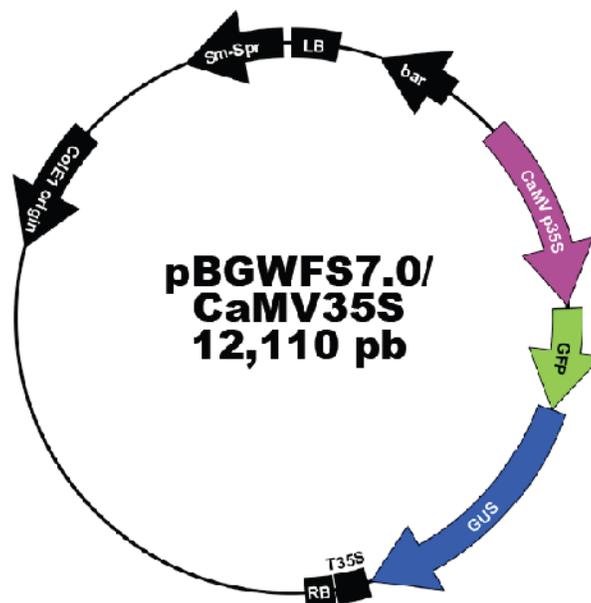


FIGURA 9. PLÁSMIDO pBGWFS7.0/CAMV35S

6.5.1 CURVA DE TOLERANCIA A BASTA®

Se utilizó como agente de selección el glufosinato de amonio (Basta®). Para determinar la concentración necesaria para seleccionar células de *T. globosa*, se llevaron a cabo pruebas con diferentes concentraciones del agente de selección (0, 5, 15, 25 mg/L). El medio de cultivo se preparó y esterilizó para ser servido en campana (T₀), ya esterilizado se le agregaron las diferentes concentraciones de Basta®.

Cada uno de los tratamientos (diferentes concentraciones) se llevó a cabo con un respaldo de 5 repeticiones, consistentes en colocar 1.5 g de callo de tallo por cada tubo de las diferentes concentraciones del agente de selección. Se tomó el peso de cada callo a partir de las 3 semanas de la siembra en condiciones de asepsia para poder regresarlo al mismo tubo y así poder tomar una última medición a las 3 siguientes semanas. Lo que permitió determinar cuál de las concentraciones tuvo mayor efecto en la selección de callos, es decir, qué concentración de glufosinato de amonio provocaba mayor muerte celular.

6.5.2 CONDICIONES DE BOMBARDEO

Con base a las curvas de crecimiento de callo, se determinó tomar callos de entre 18 y 24 días a partir del último subcultivo, el callo empleado para este ensayo fue disgregable y con poca oxidación aparente, inferido por su color claro. El callo seleccionado se subcultivó en medio de bombardeo (T₀ con 4 g de gellan) un día antes de la fecha del bombardeo de micropartículas. Se bombardearon callos de tallo de *T. globosa* con balas de tungsteno M5 (0.4 µm) a una distancia de 13 cm y una presión de 6 bar (tabla 11).

TABLA 11
CONDICIONES DE BOMBARDEO DE CALLOS DE *T. globosa*

	Control negativo	Tratamiento
Bala	M5	M5
Distancia	13 cm	13 cm
Presión	6 bar	6 bar
DNA	---	5 µg/µl
Repeticiones	5	30

Los callos bombardeados permanecieron 7 días en el mismo medio, transcurrido este tiempo, se subcultivó en medio de selección.

6.5.3 SELECCIÓN DE CALLOS TRANSFORMADOS

Con base en los ensayos realizados en el punto 1.5.1, se utilizó la concentración de 25 mg/L de Basta® para hacer la selección de los callos bombardeados. Se decidió emplear el medio denominado H2 (explicado en el punto 1.3.3) por ser el de mejor respuesta en cuanto a incremento de la masa celular. Los callos bombardeados se subcultivaron cada tres semanas retirando aquellas partes que presentaban mayor oxidación. Finalmente y en referencia a lo anterior, los callos bombardeados fueron mantenidos en medio de selección durante 6 semanas.

6.5.4 EXPRESIÓN PERMANENTE DEL GEN *GFP*

Una de las pruebas que se llevaron a cabo para corroborar la transformación de los callos de *T. globosa*, fue la visualización de la expresión de *GFP* con la ayuda de un microscopio confocal, en los callos de tallo bombardeados (después de 6 semanas a partir del bombardeo).

El microscopio confocal (Olympus FluoView FV1000) permite ver la luminiscencia de la proteína *GFP*, esto al calibrar la intensidad de fluorescencia que se percibe para evitar un falso positivo con la fluorescencia endógena de las paredes celulares, lo que permite asegurar que la luminiscencia que se capta sea en realidad proveniente de la proteína *GFP*.

La prueba consistió en tomar cinco muestras de callo bombardeado y observar cada una de ellas bajo el microscopio, una vez que ha sido calibrado, se comienza la búsqueda de fluorescencia, la cual debe ser lo suficientemente intensa para ser analizada por el programa (Olympus Fluoview Ver.1.7c Viewer), donde se registran fotografías del campo visual a diferentes niveles de profundidad, como si fuese una tomografía.

6.5.5 PRUEBAS MOLECULARES DE DETECCIÓN DE ADN EXTERNO

Para confirmar la presencia de los transgenes en el ADN de las células bombardeadas, y posterior a la extracción del material genético, se empleó la técnica PCR específicamente para visualizar la presencia del gen *GFP* y el promotor CaMV35s del virus del mosaico de la coliflor, como control negativo se utilizó el ADN genómico (gADN) de callos no bombardeados de *T. globosa*.

Para ello, se llevó a cabo la extracción y purificación de ADN de 5 muestras de diferentes callos bombardeados con la ayuda del kit denominado “ChargeSwitch® gDNA Plant Kit” (Invitrogen™, número de catálogo CS18000), siguiendo la metodología propuesta por el proveedor (ANEXO 1).

Posteriormente se cuantificó la concentración de ADN de cada una de las muestras con un espectrofotómetro a 260 nm de longitud de onda.

Para llevar a cabo la PCR se utilizaron 10 ng de gADN, tanto de los callos experimentales como de los controles, previamente purificado. Las condiciones en las cuales se llevó a cabo la PCR, fueron determinadas en base a las recomendaciones del fabricante de la enzima utilizada (JumpStart™ Taq ReadyMix™, Cat. No. P2893), con ligeras modificaciones (tabla 12).

Tabla 12
Condiciones de la PCR

Etapa	Tiempo	Temperatura (°C)
Desnaturalización inicial	2 minutos	94
35 ciclos		
Desnaturalización	30 segundos	94
Alineamiento	30 segundos	58
Extensión	2 minutos	72
Extensión final	10 minutos	72

7. RESULTADOS

7.1 DESINFECCIÓN E INDUCCIÓN DE CALLO

Después de la desinfección se presentaron algunos eventos aislados de contaminación, principalmente por hongos. No obstante, dados los bajos porcentajes de contaminación (2-6 %), ésta permitió la continuidad del proceso de inducción de callo. La respuesta fue diferencial en cuanto al tiempo y cantidad de callo generado, dependiendo de las condiciones de incubación y el tipo de explante (figura 10).

Mientras que los tallos comenzaban a hincharse a partir de los 15 días posteriores al día de la siembra (signo de algún tipo de respuesta a los fitorreguladores), las acículas lo hacían después de los 30 días a partir del mismo. Cabe destacar que los tallos fueron más resistentes a la oxidación que las acículas, estas últimas comenzaban a adquirir un aspecto de marchitamiento a partir de los 15 días de la siembra, mientras que los tallos conservaban un mejor aspecto por más tiempo.

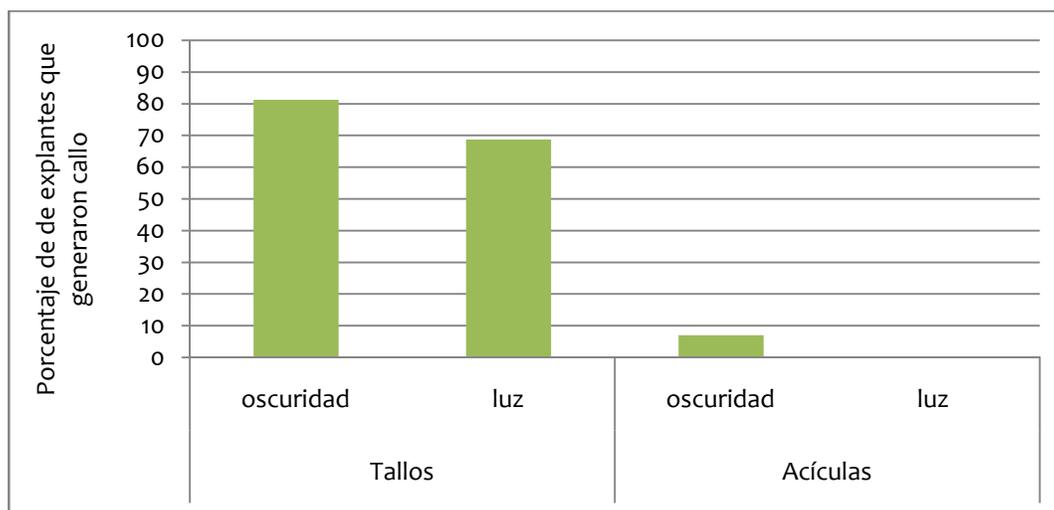


FIGURA 10. PORCENTAJE DE RESPUESTA DE FORMACIÓN DE CALLO POR CADA TIPO DE EXPLANTE, SEMBRADOS EN MEDIO T₀, DESPUÉS DE 9 SEMANAS A PARTIR DE LA SIEMBRA.

Por un lado, los tallos mostraron un mayor porcentaje de respuesta que las acículas en ambas condiciones de incubación. Y a su vez, los tallos en oscuridad tuvieron mejor respuesta que los que se encontraban en fotoperiodo ya que cerca del 80% de explantes de tallo-oscuridad generaron callo en contraste con los tallos-fotoperiodo que apenas el 70% mostraron respuesta de formación de callo (figura 11).

Como muestra la figura 10, los explantes acícula, presentaron una baja respuesta en la producción de callo en condiciones de oscuridad mientras que los de fotoperiodo, carecieron de ella. Los callos generados se clasifican como disgregables y tendientes a la oxidación, ya que en su fase inicial son de color blanquecino a amarillento, sin embargo, con el paso de los subcultivos adquieren una coloración marrón.

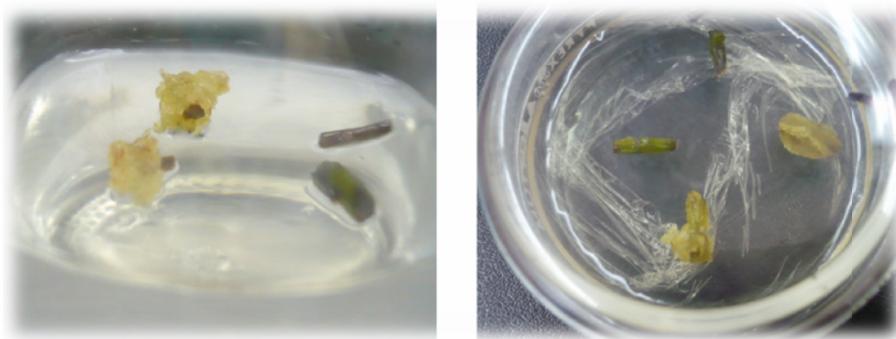


FIGURA 11. TALLOS DE *T. globosa* QUE RESPONDIERON A LA INDUCCIÓN DE CALLO EN MEDIO T₀. RESPUESTA OBSERVADA A LOS 19 DÍAS A PARTIR DE LA FECHA DE SIEMBRA.

A partir de las primeras señales de respuesta en los explantes, estos se colocaron en el centro de la caja en el siguiente subcultivo. El callo fue separado del explante inicial para pasar a la etapa de proliferación a partir del tercer subcultivo en ambos explantes, o antes en caso que hubiera iniciado un proceso de oxidación aparente (cambio de coloración en el callo). Después de pasadas 9 semanas se descartó la posibilidad de respuesta en aquellos explantes que no formaron callo, debido a que los mismos adquirieron un aspecto de marchitamiento y una coloración negruzca, por lo que se evocaron los trabajos al mantenimiento del callo en la fase de proliferación (figura 12).

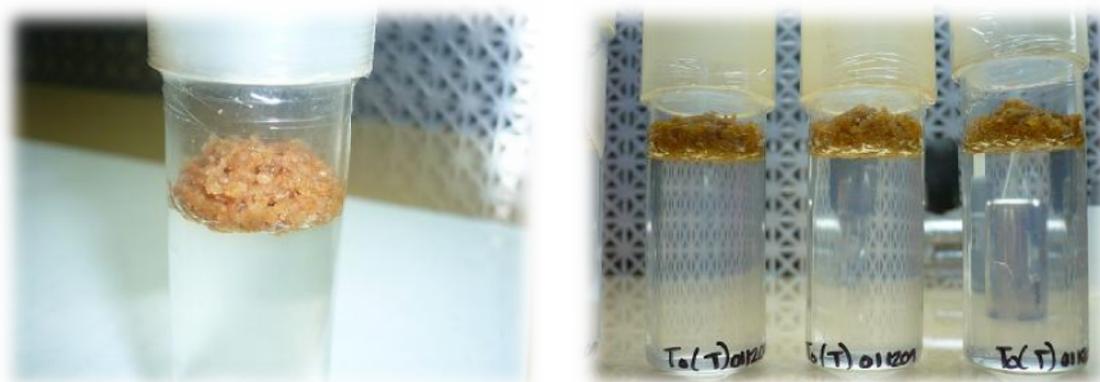


FIGURA 12. PROLIFERACIÓN DE CALLOS DE *T. globosa* EN OSCURIDAD.

Una vez obtenida una cantidad suficiente de callo se llevaron a cabo las líneas experimentales que dieron origen a los siguientes resultados

7.2 LÍNEA EXPERIMENTAL I: AUMENTO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

7.2.1 MEDIO T₀ MODIFICADO CON SALES WPM

Los callos de tallo que fueron empleados para probar el medio T₀ modificado con sales WPM, fueron mantenidos durante un periodo de 3 meses, durante el cual los callos mostraron mayor oxidación que la habitual y tras los subcultivos no se observó un incremento en la masa celular de los callos. Por lo que no fue posible continuar con el ensayo.

7.2.2 TRATAMIENTO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE INSULINA

El primer ensayo que se hizo para probar el efecto de la insulina en sus diferentes concentraciones sobre la proliferación celular (0, 150, 300 y 450 U/L de insulina, marca HUMULIN®-R), consistió en aplicar los tratamientos (6 semanas de duración) sobre callos de tallo establecidos con anterioridad en medio T₀, éste fue evaluado a través de una cinética de crecimiento de células en suspensión en medio TgS-2. Aparentemente no hubo una diferencia significativa en la respuesta presentada entre las diferentes concentraciones de insulina y el control (figura 13). Ya que todas las curvas de crecimiento presentaron un comportamiento similar en cuanto a la forma de la curva y los valores que ésta alcanzó en las diferentes etapas que la caracterizan.

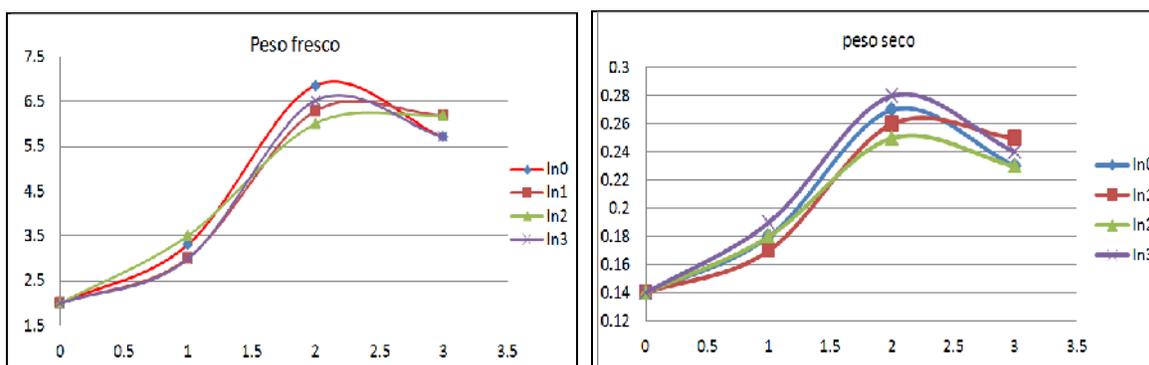


FIGURA 13. CURVAS DE CRECIMIENTO EN PESO FRESCO Y PESO SECO, DE SUSPENSIONES CELULARES CON LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS DE INSULINA

Aunque en ambas gráficas de la figura 13 vemos que el tratamiento In3 fue el que alcanzó un mayor incremento en la masa celular al incrementar su peso en un 100% (en relación al peso inicial del inóculo) en comparación de los tratamientos In1 e In2, que alcanzaron un incremento en 85.7% y 78.5%, respectivamente, el comportamiento de la cinética de crecimiento resultante del tratamiento In3 fue muy similar al del control (tabla 13).

TABLA 13
GANANCIA MÁXIMA DE PESO (P. SECO) DE SUSPENSIONES CELULARES CON LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS DE INSULINA, EN UN PERIODO DE 21 DÍAS.

Tratamiento	Peso inicial-peso máximo (g)	Incremento neto (g)	Incremento (%)
In0	0.14-0.27	0.13	92.85
In1	0.14-0.26	0.12	85.71
In2	0.14-0.25	0.11	78.57
In3	0.14-0.28	0.14	100

A razón de los valores presentados con anterioridad, se dispuso a realizar nuevos ensayos utilizando las mismas concentraciones de insulina, en esta ocasión adicionándola desde la etapa de inducción del callo, probando los mismos explantes en condiciones de oscuridad. Durante la inducción de callo en tallos con las diferentes concentraciones de insulina se observó que el control (sin insulina) respondió como en ocasiones anteriores con una respuesta cercana al 80%, mientras que en los tratamientos (150, 300 y 450mU/mL) la respuesta fue menor, entre 35-65% de formación de callo (figura 14). En el caso de las acículas, únicamente el tratamiento In2 generó callo, los demás tratamientos no mostraron respuesta por parte de este explante.

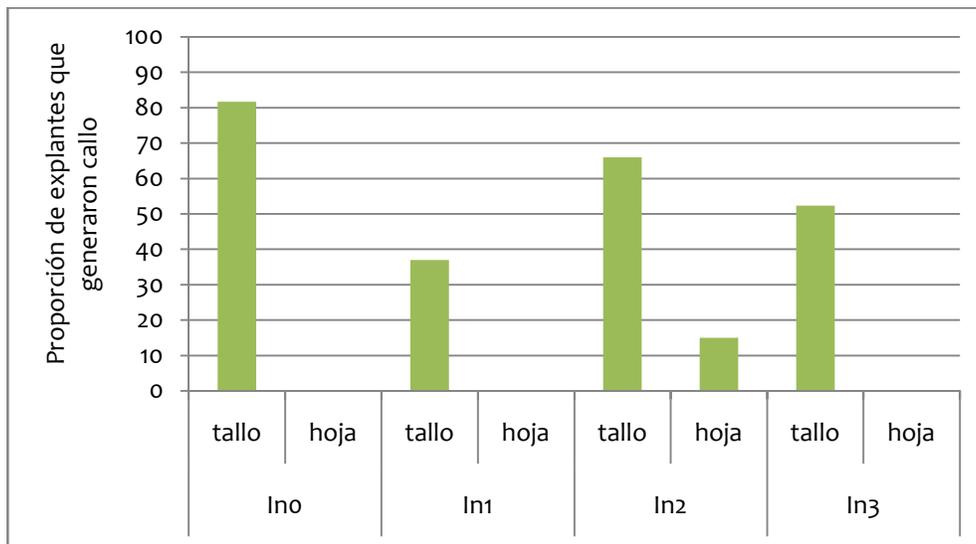


FIGURA 14. RESPUESTA DE LOS DIFERENTES EXPLANTES A LOS TRATAMIENTOS CON INSULINA, DESPUÉS DE UN PERIODO DE 9 SEMANAS.

Generalmente el callo generado en los tratamientos de insulina fue físicamente muy similar a los del control, los cuales fueron disgregables, de coloración blanquecina al inicio de la etapa de inducción, volviéndose parda con los subcultivos, lo que refleja oxidación a medida que transcurre el tiempo de cultivo (figura 15).

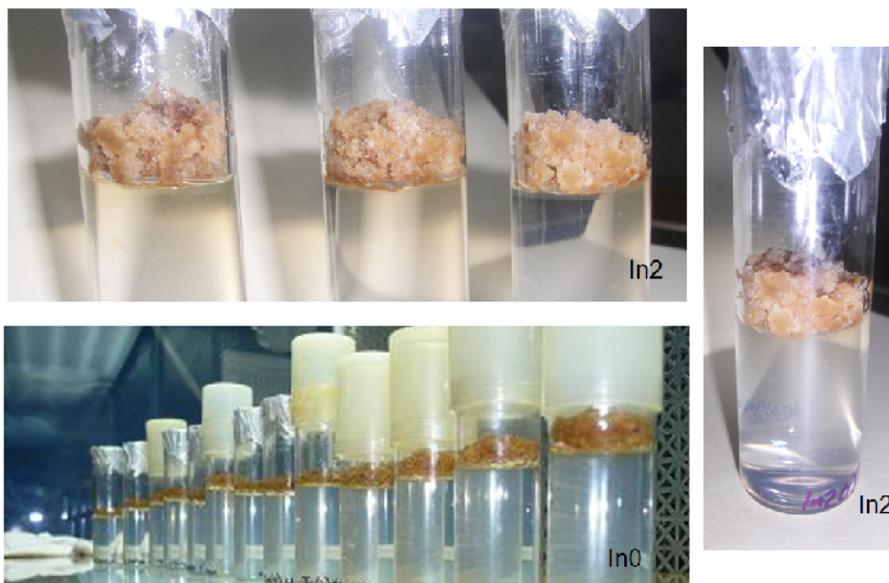


FIGURA 15. CALLOS DE *T. globosa* CULTIVADOS CON LOS TRATAMIENTOS DE INSULINA

7.2.2.1 Suspensiones celulares con insulina

A lo largo de los periodos de subcultivo los callos generados por los tratamientos In1 e In3 se perdieron por oxidación y finalmente sólo se compararon las cinéticas de crecimiento del tratamiento In2 contra el control, tomando el peso fresco y seco de las suspensiones celulares (figura 16).

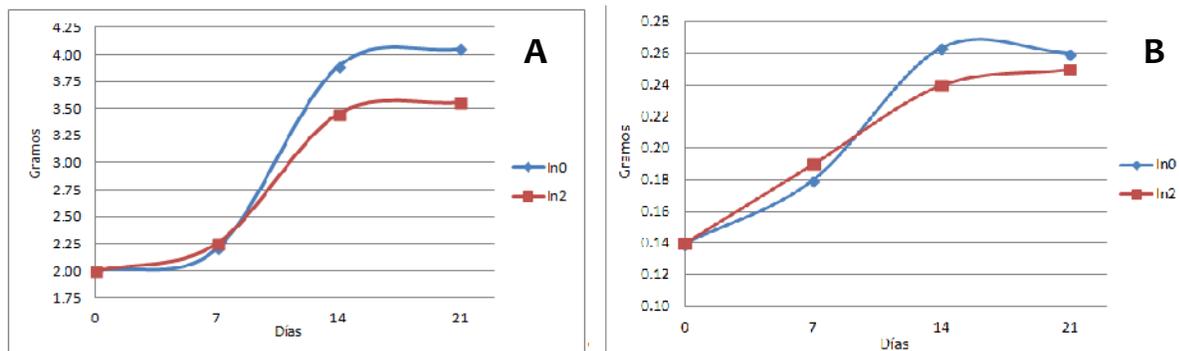


FIGURA 16. CURVAS DE CRECIMIENTO EN PESO FRESCO (A) Y PESO SECO (B), DE SUSPENSIONES CELULARES CON LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS DE INSULINA, TOMADA DESPUÉS DE UN AÑO DE CULTIVO

El resultado anterior muestra que el incremento en la masa celular fue mayor en el control que en el tratamiento de In2 (tabla 14). Mientras que el incremento porcentual de masa celular del control después de 3 semanas de iniciado el inóculo fue de 85.7%, el incremento del tratamiento In2 fue tan sólo de 71.4%, lo que representa un 14.3% menos que el incremento del control.

TABLA 14.

VALORES COMPARATIVOS DEL INCREMENTO CELULAR DEL CONTROL Y EL TRATAMIENTO IN2, TOMADA DESPUÉS DE UN AÑO DE CULTIVO

Tratamiento	Peso inicial-peso máximo (g)	Incremento neto (g)	Incremento (%)
In0	0.14-0.26	0.12	85.71
In2	0.14-0.24	0.10	71.42

7.2.3 Fitorreguladores

El efecto de la combinación de los diferentes fitorreguladores sobre la proliferación celular fue diferencial (figura 17), cuando se probó sobre callo de tallos de *T. globosa*. En lo que respecta al medio To, éste tuvo un peso fresco máximo después de 42 días de 3.26 g, lo que representa una ganancia de 117.3% de su peso inicial (1.5g). Mientras que el tratamiento con mejor resultado fue el denominado H1 cuyo

peso máximo después de los 42 días de la cinética de crecimiento fue de 5.16 g, lo que representa un incremento de 244% de su peso inicial (1.5 g). El segundo tratamiento de mayor ganancia de peso en comparación al medio To fue el tratamiento H2, cuya ganancia máxima de peso fue de 4.40 g, lo que representa un incremento en un 193.3% de su peso original. Caso contrario al del tratamiento H3, cuyo resultado no pudo mejorar el del medio To, dado que sólo aumentó un 28.6% de su peso inicial (tabla 15).

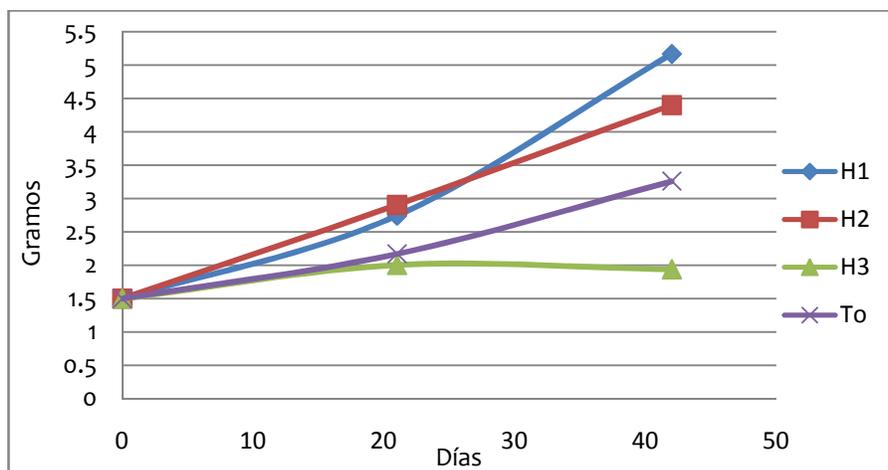


FIGURA 17. CURVA DE CRECIMIENTO EN PESO FRESCO DE CALLOS EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS DE FITORREGULADORES, DESPUÉS DE 42 DÍAS DE INICIADA LA CINÉTICA.

TABLA 15
VALORES COMPARATIVOS DEL INCREMENTO CELULAR CON LOS TRATAMIENTOS DE LA COMBINACIÓN DE FITOREGULADORES

Tratamiento	Peso inicial-peso máximo (g)	Incremento neto (g)	Incremento (%)
To	1.5-3.26	1.76	117.3
H1	1.5-5.16	3.66	244
H2	1.5-4.40	2.9	193.3
H3	1.5-1.93	0.43	28.6
To: Pic+Kin; H1: Pic+BA; H2: AIA+ABA+ANA+BA; H3: AIA+ABA+ANA+Kin			

La consistencia de los callos fue siempre la misma, callos disgregables y húmedos, con tendencia evidente a la oxidación en diferentes grados, incluso en los tratamientos H1 y H2, donde los valores del incremento de la masa celular superaron los resultados del medio To, lo cual se observó desde la primera toma de datos, 21 días de iniciada la cinética de crecimiento (figura 18).

A partir de la primera toma de datos se observó que los callos del tratamiento H2 permanecían sin aparente oxidación y con mayor incremento en la masa celular que los demás tratamientos. Sin embargo, al finalizar el ensayo (42 días de duración) el tratamiento que mejor respuesta tuvo en cuanto a incremento en la masa celular fue el H1 (figura 19), mientras que los callos del tratamiento H3 fueron los que presentaron una mayor oxidación, lo que corresponde con el bajo porcentaje en su incremento celular.

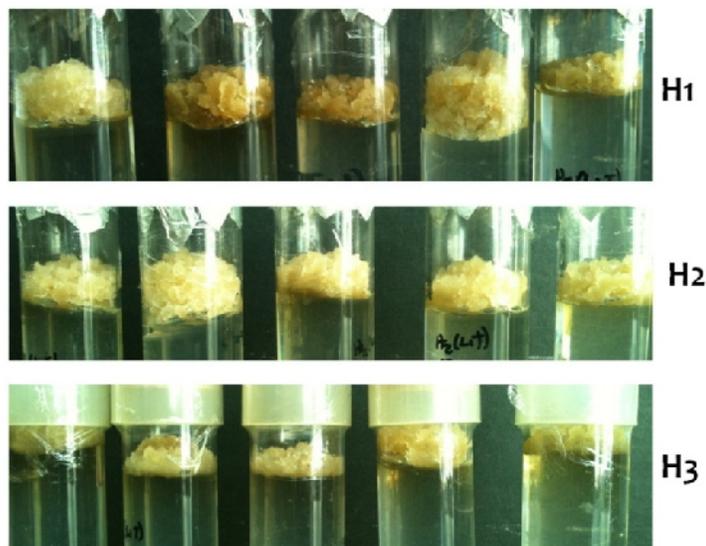


FIGURA 18. PRIMERA MEDICIÓN DE LA GANANCIA DE PESO EN CALLOS SOMETIDOS A LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS CON FITORREGULADORES, DESPUÉS DE 21 DÍAS DE INICIADA LA CINÉTICA

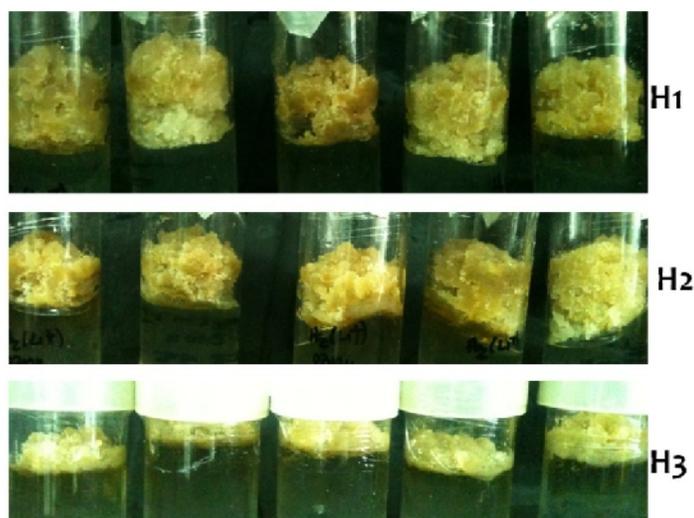


FIGURA 19. SEGUNDA MEDICIÓN DE LA GANANCIA DE PESO EN CALLOS SOMETIDOS A LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS CON FITORREGULADORES, DESPUÉS DE 42 DÍAS DE INICIADA LA CINÉTICA.

7.3 LÍNEA EXPERIMENTAL II: CÉLULAS EN SUSPENSIÓN.

La curva de crecimiento obtenida de los cultivos en suspensión en medio TgS-2, tuvo una duración de 21 días, la cual se caracterizó por presentar una fase *log* o de crecimiento exponencial entre los días 1-6, posteriormente es muy visible la fase de crecimiento lineal entre los días 7-14, presentando un periodo corto de la fase estacionaria que aparentemente dura 2 días, y comenzó su periodo de muerte hacia el día 21. En general, ambas gráficas (peso fresco y peso seco, figura 20) coinciden en los periodos de las fases. Siendo los días de mayor actividad mitótica los del periodo entre el día 1 y el 14.

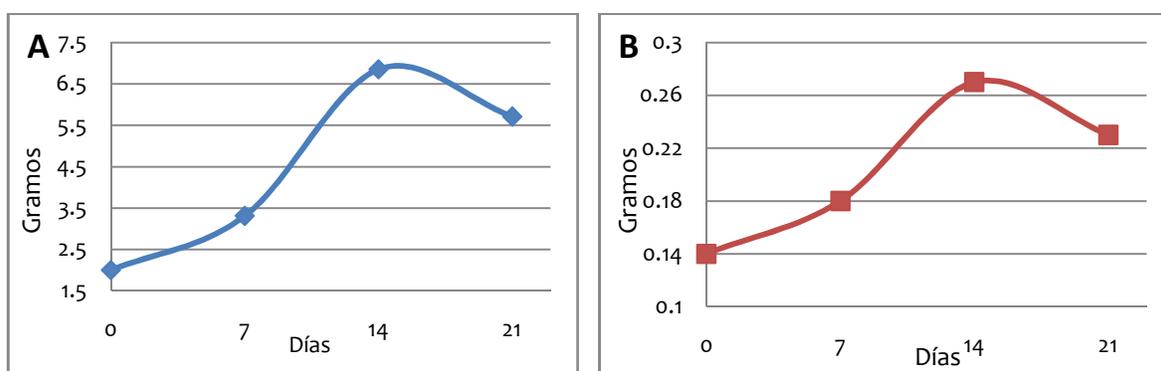


FIGURA 20. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE CULTIVOS EN SUSPENSIÓN EN MEDIO TgS-2.
A. PESO FRESCO, B. PESO SECO

Los cultivos en suspensión en medio TgS-2 mostraron, después de las 3 semanas que duró la cinética de crecimiento, un incremento de su masa celular en un 242.5% en peso fresco y un 92.85% en peso seco (tabla 16). Los callos presentaron poca oxidación a pesar de que el medio de cultivo presentó una coloración de turbidez, los callos se mantuvieron disgregables como uno de los aspectos que siempre los ha caracterizado (figura 21).

TABLA 16.
RELACIÓN DE PESO FRESCO Y PESO SECO DE SUSPENSIÓNES CELULARES EN MEDIO TgS-2

	Peso inicial-peso máximo (g)	Incremento neto (g)	Incremento máximo (%)
Peso fresco	2-6.85	4.85	242.5
Peso seco	0.14-0.27	0.13	92.85

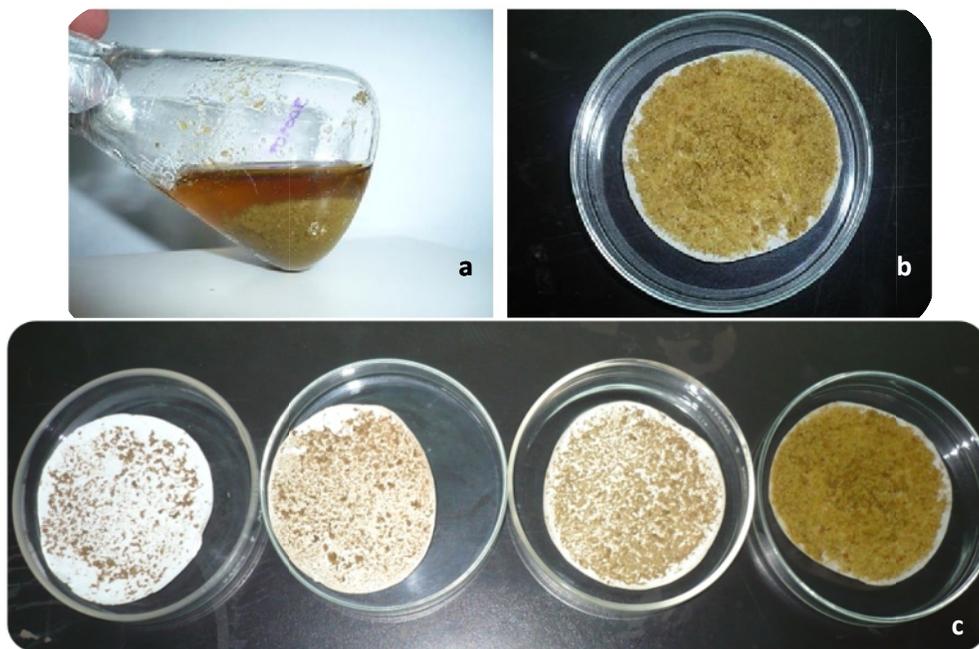


FIGURA 21. SUSPENSIONES CELULARES DE *T. globosa*. a) SUSPENSIONES CELULARES EN MEDIO TGS-2 EN CONDICIONES DE FOTOPERIODO; b) COSECHA DE LAS CÉLULAS EN SUSPENSIÓN PARA LA TOMA DE PESO FRESCO Y c) PREPARACIÓN DE LAS CÉLULAS EN SUSPENSIÓN PARA LA TOMA DE PESO SECO.

7.4 LÍNEA EXPERIMENTAL III: TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

7.4.1 TOLERANCIA A BASTA

Los callos que fueron sometidos a diferentes concentraciones (CL=0; CL=5; CL=15 y CL=25 mg/L) del herbicida glufosinato de amonio tuvieron un comportamiento diferencial en cuanto a la ganancia de peso a lo largo de cierto tiempo, lo que se representa en las diversas curvas de crecimiento, pero siempre con una tendencia a obtener una menor ganancia de peso que el control (figura 22).

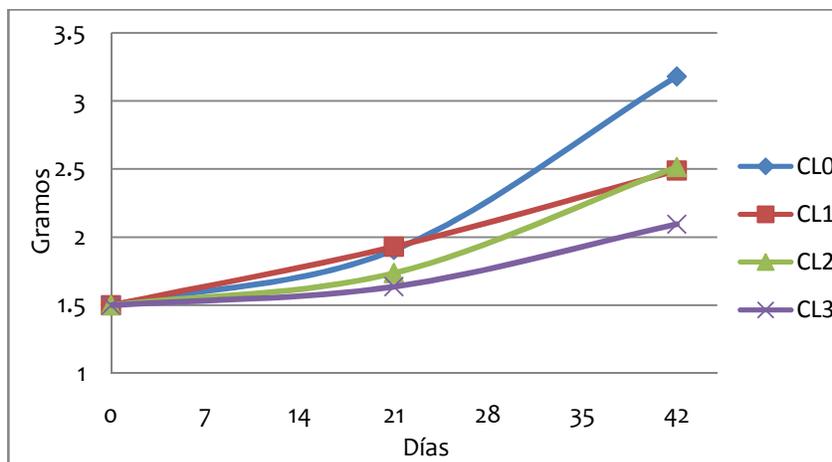


FIGURA 22. CURVA DE TOLERANCIA A GLUFOSINATO DE AMONIO.

Mientras que el control tuvo un peso máximo de 3.18 g a los 42 días de iniciado el tratamiento, los callos de las tres concentraciones del herbicida no lograron sobrepasar los 2.5 g de peso fresco al final de la prueba. De los tres, el tratamiento CL3 fue el de menor peso final, con tan sólo 2g (figura 23). Por lo que se eligió este último como la concentración indicada para la selección de los callos bombardeados.

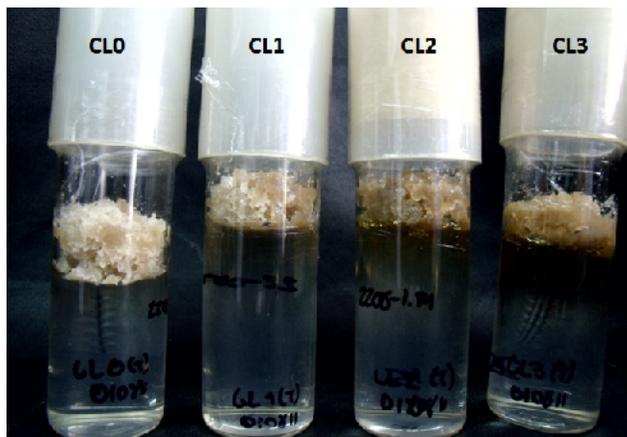


FIGURA 23. CALLOS DE *T. GLOBOSA* SOMETIDOS A LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS DE TOLERANCIA AL GLUFOSINATO DE AMONIO, DESPUÉS DE 42 DÍAS. CL0) CONTROL; CL1) 5mg/L; CL2) 15mg/L y CL3) 25mg/L.

7.4.2 SELECCIÓN DE CALLOS TRANSFORMADOS

Una vez llevado a cabo el bombardeo de los callos de *T. globosa*, éstos fueron mantenidos en el medio de bombardeo durante una semana en condiciones de oscuridad a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ y posteriormente fueron mantenidos en medio de selección con 25mgL^{-1} de glufosinato de amonio, subcultivados con la misma periodicidad (figura 24).

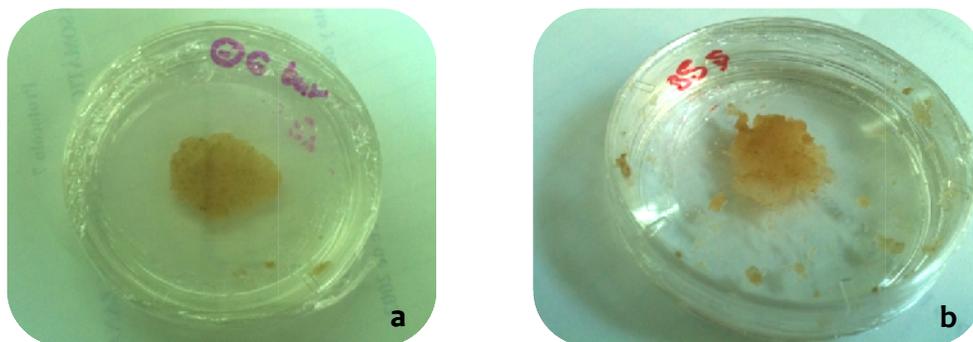


FIGURA 24. CALLOS DE *T. GLOBOSA* DESPUÉS DE LA SESIÓN DE BOMBARDEO. a) CONTROL NEGATIVO: CALLO BOMBARDEADO SIN PLÁSMIDO Y b) TRATAMIENTO: CALLO BOMBARDEADO CON EL PLÁSMIDO.

El control negativo se fue perdiendo poco a poco, bajo el efecto del agente de selección, mientras que el callo bombardeado con el plásmido pBGWFS7.0/CaMV35S fue ligeramente incrementado a lo largo de 60 días (figura 25). El callo seleccionado fue subcultivado en medio fresco To para proliferación con 25 mg/L de Basta, para seguir el tratamiento de selección. Dicho callo conservó su coloración blanquecina, tras los subcultivos, así como su disgregabilidad característica,



FIGURA 25. CALLOS BOMBARDEADOS DE *T. globosa* DESPUÉS DE 60 DÍAS DEL BOMBARDEO EN ETAPA DE PROLIFERACIÓN.

7.4.3 EXPRESIÓN DEL GEN *GFP*.

Las pruebas de expresión permanente del gen *GFP* se llevaron a cabo a los 42 días posteriores al bombardeo a través de un microscopio confocal de fluorescencia, el microscopio fue calibrado con la autofluorescencia de las células de *T. globosa* (control positivo), para asegurar que la fluorescencia que se pudiera visualizar al revisar los callos bombardeados correspondiera precisa y únicamente a la de la proteína *GFP*.

Cada una de las réplicas del control negativo fue revisada con el microscopio confocal, en varios campos visuales, lo que permitió determinar que no se registraron eventos de fluorescencia (figura 26).

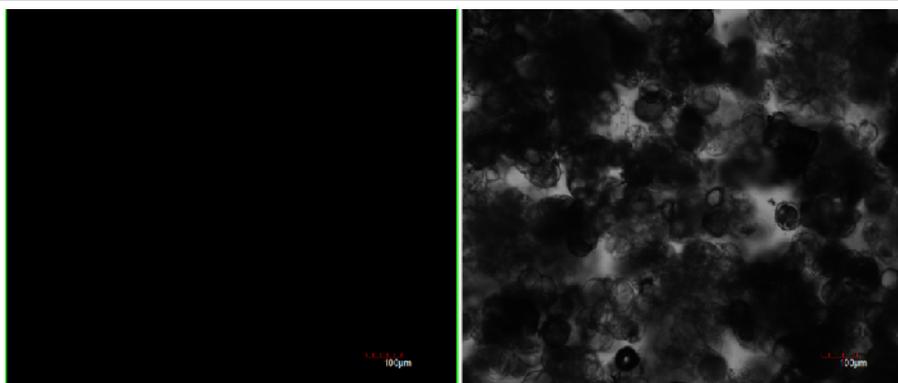


FIGURA 26. CONTROL NEGATIVO VISTO BAJO EL MICROSCOPIO CONFOCAL, EL CUAL NO PRESENTÓ FLUORESCENCIA.

Los callos bombardeados fueron revisados con el microscopio confocal después de 42 días del evento de transformación, los cuales mostraron una fluorescencia en diferentes puntos de revisión, visualizado cúmulos de células de color verde fluorescente en cuatro de las cinco muestras de callos bombardeados (figura 27; Anexo).

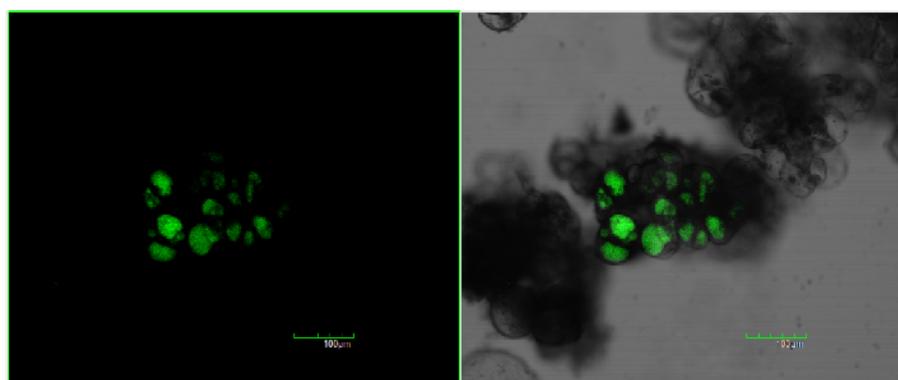


FIGURA 27. FLUORESCENCIA DE LA PROTEÍNA GFP OBSERVADA BAJO EL MICROSCOPIO CONFOCAL

7.4.4 Pruebas moleculares

Durante las pruebas de PCR se logró amplificar el gen que codifica para la proteína verde fluorescente en la muestra 2, 4 y el control positivo, donde se observó una banda ubicada entre los 650 y 850 pb, debido a que el gen tiene cerca de 680 pb. Mientras que el promotor 35S se logró amplificar en las muestras 2, 3 y el control positivo, donde en cada posición se observó una banda entre los 1000 y 1650 pb, dado que el gen tiene 1335 pb. En la muestra 1 ninguno de los dos genes fue visualizado (figura 28).

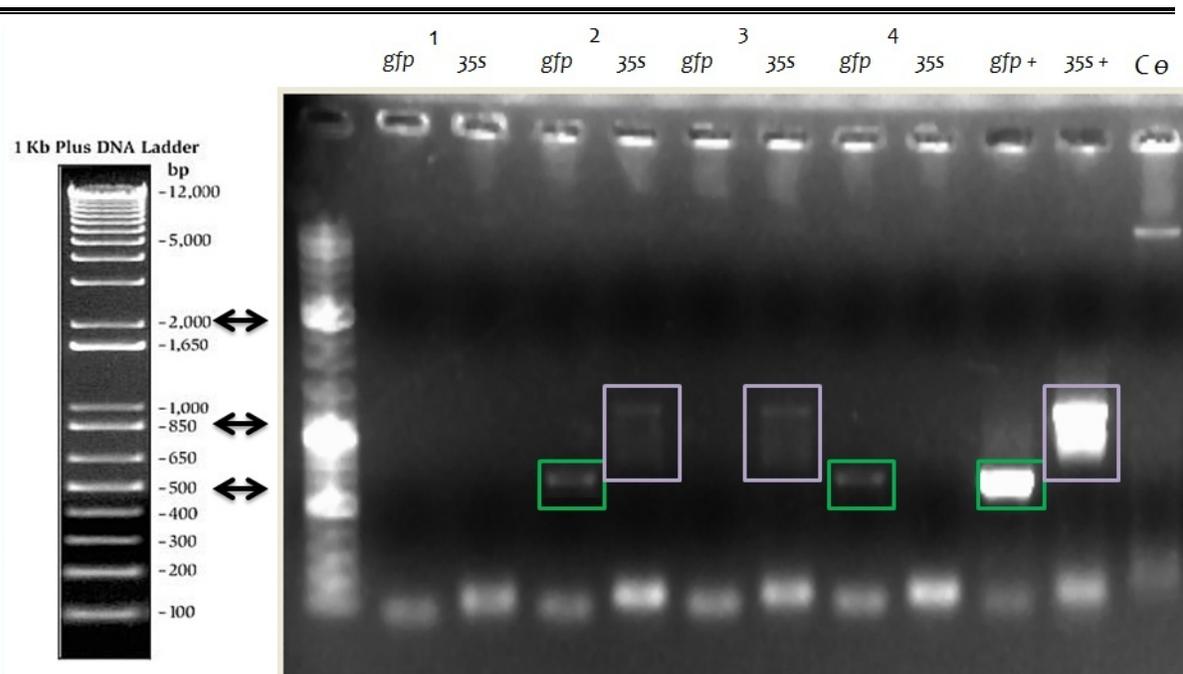


FIGURA 28. ELECTROFORESIS PARA DETECTAR GENES INSERTADOS EN EL GENOMA DE CALLOS TRANSFORMADOS DE *T. globosa*. 1-4) REPLICA DEL BOMBARDEO, GEN GFP Y PROMOTOR 35S; 5) CONTROL POSITIVO, GEN GFP Y PROMOTOR 35S Y 6) CONTROL NEGATIVO, GENOMA DE *T. globosa*.

El control negativo en la imagen anterior, es el gDNA de callos de *T. globosa* no bombardeados, se utiliza como una prueba de la presencia de material genético proveniente de las células en cuestión. Aunque la intensidad de los marcadores registrados en los pozos experimentales es menor que la de los controles positivos, se observan a la misma distancia de corrimiento, lo que comprueba que se trata de los mismos genes.

8. Discusión

El protocolo modificado de Martínez (2011) resultó efectivo para la desinfección de los explantes de *T. globosa*, ya que sólo el 5% de los explantes presentaron contaminación por hongo, mientras que un 2% presentaron contaminación por bacterias. Dicho protocolo fue modificado ligeramente en la reducción del tiempo de exposición a los agentes de desinfección, lo que no afectó la efectividad reportada por Martínez, donde menciona que cerca del 95% de los explantes quedaron libres de patógenos. Cabe destacar que el efecto que produce el aislamiento de los árboles de *T. globosa* dentro del invernadero permitió aumentar los porcentajes de explantes asépticos, aun cuando se reduzcan los tiempos de exposición a los agentes desinfectantes, dado que se mantuvo al individuo vegetal en una constante cuarentena (López, 2012).

En cuanto a la inducción de callo, los tiempos y producción fue diferencial en cuanto a tipo de explante y condiciones de incubación probadas. Mientras que los tallos comenzaron a formar callo a partir de los 15 días de la siembra, las acículas lo hacían posterior a los 30 días; del igual modo, mientras que el 80-85% de los tallos formaron callo, sólo entre el 10-15% de las acículas lo hicieron. Incluso, se puede decir que la respuesta en acículas fue tan lenta (a partir de los 30 días de la siembra), que mucho material ya había muerto para este tiempo. En el mismo sentido, la respuesta fue mejor en condición de oscuridad en comparación con el fotoperiodo, dado que el porcentaje de respuesta en ambos explantes fue entre 10 y 5% menor en fotoperiodo que en oscuridad. Lo que concuerda con los datos reportados por Martínez (2011).

La razón por la cual la respuesta en fotoperiodo en cuanto a tiempo y porcentaje de producción de callo, sea tal vez el hecho de que ambos fitorreguladores usados tienen tendencias altas a fotólisis, y por lo menos en el caso del picloram, tiene una vida media por fotólisis de 2.3-9.5 días (Dow AgroSciences, s/a), lo que podría explicar la baja respuesta en fotoperiodo, tomando en cuenta que en oscuridad la formación de callo se hizo visible a partir de los 15 días de la siembra.

Línea experimental I

WPM

Los callos provenientes de medio de cultivo To, el cual contiene como base las sales B5, que fueron subcultivados en medio con sales WPM, tuvieron una respuesta desfavorable al cambio de sales, ya que mostraron un incremento en la oxidación: los callos pasaron de tener una coloración café claro a una coloración más oscura y aunque no se llevó a cabo una cinética de crecimiento, se apreció visiblemente que no había el incremento celular que normalmente se observó en callos que permanecían en medio To.

El proceso de oxidación comenzó a observarse a partir del tercer subcultivo, los cuales se llevaban a cabo cada tres semanas. Por lo anterior, no fue posible llevar a cabo una cinética de crecimiento que pudiera arrojar datos cuantitativos del efecto del cambio de sales en el medio de cultivo.

Insulina

La primera prueba que se realizó con las diferentes concentraciones de insulina, mostró una ligera diferencia en la ganancia de peso de los diferentes tratamientos, sin embargo, esta diferencia no resultó significativa en la proliferación celular de callos de *T. globosa*. Por lo que en dicho experimento no se comprobó el efecto potencial de la insulina sobre el incremento de la proliferación celular reportada por García Flores (2001), siendo posible que el corto periodo de prueba (el tiempo de duración de una curva de crecimiento), haya sido la causa de dicho comportamiento, ya que muchas veces es preciso que los cultivos se habitúen a las nuevas condiciones (Sherrington, 1984), recordando que se emplearon para ello cultivos ya establecidos con aproximadamente un año de edad.

En función de lo anterior, se iniciaron nuevos cultivos de callo de *T. globosa*, bajo el mismo procedimiento descrito adicionando las diferentes concentraciones de insulina. El establecimiento de callos bajo los tratamientos con la proteína, tardaron alrededor de un año, desde la siembra de los explantes hasta la etapa de proliferación. Cabe destacar que a lo largo de ese año, se perdieron paulatinamente por oxidación los tratamientos denominados In1 e In3, por lo que al momento de hacer la comparación

en cuanto a proliferación celular entre los diferentes tratamientos de insulina, esto sólo se llevó a cabo entre el control y el tratamiento denominado In2.

Los resultados de las curvas de crecimiento de ambas condiciones mostraron una ligera diferencia en la ganancia de peso, pero siempre el peso de los callos del tratamiento In2 estuvo por debajo del control, lo que podría indicar que la insulina no tuvo efecto como un regulador de crecimiento a favor del incremento de la proliferación celular de callos de *T. globosa*.

Sin embargo, cabe la posibilidad de que la insulina se haya desnaturalizado y perdido su función al momento de adicionarla al medio de cultivo, a pesar de haber tomado las precauciones pertinentes. El hecho de que una de las causas por las cuales las proteínas pierden su estructura o conformación nativa, es que se encuentre a una temperatura de entre 40 - 50°C (Melo *et al.*, 2006). Se procuró adicionar la insulina al medio de cultivo posterior a su esterilización, a una temperatura menor a los 40°C, no obstante y contrario a todas las precauciones, cabe la posibilidad de que la temperatura del medio de cultivo no haya sido la adecuada para conservar la estructura de la proteína y por tanto no es posible aseverar que la insulina no tiene efecto en el incremento de la proliferación celular en *T. globosa*.

Por otro lado, aunque hay reportes del efecto de la insulina sobre algunos procesos del desarrollo vegetal en angiospermas, no existe reporte de la presencia de receptores de insulina o de los genes ortólogos para receptores de insulina en plantas (Rodríguez-López *et al.*, 2011). Lo que podría justificar que en *T. globosa* (una gimnosperma) no se presente una respuesta a la proteína en función del aumento en la proliferación celular, por falta de un receptor celular compatible con dicha proteína.

Sin embargo, existe evidencia de que la ZmIGF presenta diversas similitudes funcionales con la insulina como el incremento en la síntesis de proteínas ribosomales, tal cual sucede en animales y el hecho de que el ZmIGF fue reconocido por el anticuerpo de insulina durante las pruebas bioquímicas (Goodman *et al.*, 1993; Sánchez de Jiménez *et al.*, 1999), por lo que sería incorrecto pensar que la insulina no pudiera ser reconocida por el receptor de ZmIGF en las células vegetales, dado que tienen una estructura muy similar y la cascada de señalización que producen ambas proteínas son

equivalentes, aunque aún existe el hecho de que el ZmIGF sólo se ha encontrado en maíz.

Fitorreguladores

Los callos crecidos en el medio H1 fueron más prolíferos debido a la acción sinérgica de dos reguladores crecimiento considerados de alta potencia. Por un lado el picloram ejerce un efecto de auxina, este regulador de crecimiento ha sido utilizado en bajas concentraciones (0.012-0.05 μM) para la inducción de callo y en combinación con una citocinina se ha utilizado en cultivos de meristemos y nudos (George, 2007). Su efecto como auxina recae en el hecho de inducir la división y el alargamiento celular. El estímulo del piclorán se intensificó con la presencia de la bencil aminopurina, una citocinina que tiene como efecto la división celular. Dodds y Roberts (1985) sostienen que las auxinas y citocininas suplementadas son el instrumento para la regulación de la división celular, y el alargamiento celular. Algunos autores han demostrado que el sustituir la cinetina por la bencil aminopurina induce más la proliferación celular (Sherrington, 1984). Aún cuando los otros medios también tenían auxinas y citocininas en combinación, éstas no eran tan potentes. Como se ha demostrado no sólo dependen de los reguladores del crecimiento, sino también de la especie y de las condiciones de incubación, para el caso de *Taxus globosa*, es una especie que con dificultad se dividen las células tanto en callo como en suspensión, por ello que requieran reguladores de crecimiento que tenga mayor potencia.

Línea experimental II

Las curvas de crecimiento (peso fresco y seco) elaboradas a partir de las mediciones de cultivos en suspensión con medio TgS-2, mostraron todas las etapas de una típica curva de crecimiento, durante las tres semanas que duró el muestreo. Se observa una fase *log*, de entre 4 a 5 días. Posteriormente, es posible observar la etapa de crecimiento lineal entre los días 7 y 14, pasando por una breve etapa estacionaria, seguida de la etapa de muerte celular. Cabe destacar que la ganancia de masa celular en este periodo corresponde a un aumento de casi 242% con respecto al valor del

inóculo inicial, tomando en cuenta el peso fresco: mientras que con los datos de peso seco, la masa celular prácticamente se duplicó, teniendo un aumento de 100%. Es importante aclarar que mucho de lo representado en la toma de peso fresco, corresponde en su mayoría a agua, de ahí la diferencia tan grande entre los datos antes mencionados y por lo que es más fiable entender que las suspensiones celulares de *T. globosa* duplican su masa celular en un periodo de 3 semanas.

Lo anterior puede ser comparado con los datos de Arandal (2009), donde reporta el incremento de 100% (peso fresco) en suspensiones celulares de *T. globosa* utilizando un medio con sales SH, mediante una cinética de crecimiento que duró 15 días. De igual forma con lo reportado por Martínez (2011), donde menciona el incremento de un 57% (peso seco) en suspensiones celulares de la misma especie, utilizando sales B5, mediante una cinética de crecimiento que duró 28 días. Por consiguiente se concreta que el medio TgS-2 logró aumentar considerablemente la tasa de proliferación celular en suspensiones de *T. globosa*, reportadas con anterioridad.

En relación con otras especies del género, Kim (2005) informó el aumento celular de *T. cuspidata* hasta en un 166% respecto al inóculo inicial tomando en cuenta el peso fresco; Hao (2001) reportó el aumento de hasta un 185% en células de *T. chinensis* tomando peso seco; Wu (2001) reportó el aumento de hasta un 183% de la ganancia de masa celular de *T. yunnanensis* mediante una cinética de crecimiento hecha con valores de peso fresco y finalmente Xu (1998) reportó el aumento del inóculo en un 250% en peso fresco de células de *T. cuspidata*.

A lo anterior, los valores reportados en este trabajo respecto al incremento celular y los valores que otros autores reportan son muy similares, e incluso en ocasiones superiores, lo que refleja el efecto favorable de los componentes del medio TgS-2 para el incremento de la proliferación celular en cultivos en suspensión de *T. globosa*.

Línea experimental III

Determinación de la concentración mínima letal

Un elemento fundamental en el proceso de transformación genética en plantas es la determinación del proceso de selección de células transformadas, el cual comprende la elección de un agente selectivo que permitirá el crecimiento de las células que expresen el marcador introducido, así como la concentración y el tiempo de exposición al agente selectivo (Lindsey, 1996). En este caso, se utilizó el glufosinato de amonio como agente de selección, el cual es un inhibidor de la enzima glutamino sintetasa, enzima que participa en el metabolismo del nitrógeno, particularmente en la asimilación de amonio, por lo que al inhibir dicha enzima se acumula el amonio en cantidades tóxicas para las células, por lo que causa muerte celular (Fernández y Méndez, 2004; Reyes *et al.*, 2010).

Sin embargo, el efecto del agente de selección puede ser inhibido cuando se inserta el gen *bar* a las células vegetales, ya que produce un efecto de acetilación que inactiva al glufosinato de amonio; por tanto, si se ha introducido de manera exitosa y se logra expresar, las células transformadas podrán resistir el efecto del herbicida Basta®.

En relación con lo anterior, en esta etapa de la parte experimental se determinó la concentración mínima de glufosinato de amonio que limita la división celular de callos de *T. globosa*, con lo cual se encontró que dicha concentración debe ser como mínimo de 25 mg/L para provocar un efecto negativo sobre el incremento en la masa celular; cualitativamente, este efecto se apreció con una elevada oxidación en los cultivos, mientras que mediante la cinética de crecimiento se apreció cualitativamente que la masa celular no incrementó su peso.

Por el contrario, al emplear concentraciones menores a los 25 mg/L, no se observa una afectación negativa significativa al incremento de la masa celular de los callos.

Transformación genética mediante biobalística

Los reportes que existen actualmente en relación con la transformación genética de individuos de especies del género *Taxus*, están inclinados al uso de la técnica *Agrobacterium*, de ellos, sólo uno reportó la transformación permanente

después de 20 meses de cultivar las células transformadas. En lo que respecta a la publicación donde utilizaron la biobalística, se empleó una bomba de alta presión y se confirmó una expresión transitoria. Cabe recordar que para este trabajo experimental se empleó una bomba de baja presión.

Las células bombardeadas con el plásmido pBGWFS7.0/CaMV35S, permanecieron 42 días en proceso de selección con 25 mg/L de Basta®. Durante este periodo se observó una reducción en las cantidades de callo que en un inicio fue sometido a bombardeo, aproximadamente se conservó el 40% de ese callo. Esto evidencia el efecto de selección del herbicida empleado. Al finalizar el periodo de 42 días, el callo que sobrevivió, conservó las características de todos los callos con los que hemos trabajado: coloración marrón, disgregables y húmedos.

De las cinco muestras analizadas bajo el microscopio, en cuatro de ellas se pudieron observar eventos de fluorescencia. En diferentes zonas de cada muestra se observaron agregados celulares cuya fluorescencia se registró desde el centro de cada una de las células.

El PCR permitió amplificar el gen *GFP* a partir del genoma de dos callos bombardeados de *Taxus globosa* y el promotor 35s en otros dos callos. En una de las muestras no se observó la amplificación de ninguno de los dos genes. Por consiguiente, en tres de las cuatro muestras de callo analizadas con PCR se encontraron los genes introducidos mediante la sesión de biobalística, después de 42 días del evento.

Recapitulando lo anterior, cuatro de cinco pruebas de expresión permanente resultaron positivas, mientras que tres de los cuatro callos analizados mediante pruebas moleculares, resultaron positivos a la transformación. Con lo que se demuestra la transformación permanente de células de *Taxus globosa*.

9. CONCLUSIONES

- Las modificaciones hechas al protocolo de desinfección de Martínez (2011) en cuanto a la reducción de tiempos y concentraciones de exposición, fueron exitosas al obtener un porcentaje del 94 % de explantes asépticos.
- Los explantes mantenidos en oscuridad tuvieron una mayor tasa de inducción de callo que los mantenidos en fotoperiodo.
- Los tallos presentaron un mayor porcentaje de inducción de callo que las acículas.
- No hubo ningún efecto sobre la proliferación de callos utilizando la insulina como un factor de crecimiento.
- La combinación de picloram y BA en medio sólido, resultó la más adecuada en comparación con las otras combinaciones probadas, ya que se registró incremento de hasta 240% del peso fresco.
- En cuanto a los cultivos de células en suspensión, se demostró que el medio con ANA, AIA, AIB y BA y sales B5 (TgS-2), promovió la proliferación al incrementar hasta en 2.5 veces la masa de las células de *T. globosa*.
- Se identificaron las distintas fases del crecimiento de células en suspensión de *T. globosa*, encontrándose que la esta logarítmica tiene lugar del día 0 al séptimo, la lineal del séptimo día al décimo cuarto y la de decaimiento inicia del décimo cuarto al vigésimo primer día.
- La concentración mínima de glufosinato de amonio para la selección de células de callo transformadas de *T. globosa* fue de 25 mg/L.
- La biobalística resultó ser una técnica adecuada para la transformación genética de células de *T. globosa*, al observar los resultados positivos de las pruebas de expresión permanente y la identificación del gen *gfp* y el gen del promotor 35S por PCR.

10. Perspectivas

Emplear el medio H1 desde la etapa de inducción de callo, con la finalidad de corroborar su efecto y reducir los tiempos de proliferación celular.

Llevar a cabo el escalamiento de los cultivos en suspensión, con la intención de desarrollar cultivos celulares a nivel industrial.

Proliferación y monitoreo de células transformadas con la finalidad de comprobar la estabilidad de la transformación genética.

11. Anexos

Anexo 1. Contenido del medio de cultivo conocido como MS

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	1900	18.792
Nitrato de amonio	NH ₄ NO ₃		1650	20.615
Solución II: Sulfatos				
Sulfato de magnesio	MgSO ₄ .7H ₂ O	246.498	370	1.501
Sulfato de manganeso	MnSO ₄ .H ₂ O	169.01	16.9	0.099
Sulfato de zinc	ZnSO ₄ .7H ₂ O	287.54	8.6	0.029
Sulfato de cobre	CuSO ₄ .5H ₂ O	249.68	0.025	0.1μM
Solución III: Halógenos				
Cloruro de calcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	147.02	440	2.993
Yoduro de potasio	KI	166.01	0.83	0.004
Cloruro de cobalto	CoCl ₂ .6H ₂ O	237.93	0.025	0.105μM
Solución: IV Fosfato, ac. Bórico, molibdeno				
Fosfato de potasio monobásico	KH ₂ PO ₄		170	1.249
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	61.68	6.2	0.1002
Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	241.95	0.25	1.03μM
Solución V: Quelantes				
Sulfato ferroso	FeSO ₄ .7H ₂ O	278.21	27.8	0.099
Na ₂ EDTA	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ .2H ₂ O	372.30	37.3	0.1002

Anexo 2. Contenido del medio conocido como B5

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	(NH ₄) ₂ SO ₄	132.146	134	1.014
Solución 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	0.025	1.001x10 ⁻⁴
Solución 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	0.025	1.050x10 ⁻⁴
Solución: 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	0.25	1.033x10 ⁻³
Solución V: Quelantes				
Sulfato ferroso	FeSO ₄	278.21	28.1	
EDTA	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ .2H ₂ O	372.30	37.4	0.0753

Anexo 3. Contenido del medio de cultivo conocido como WPM

Nombre del compuesto	Fórmula	P. M. (g)	Cantidades para un litro en	
			Masa (mg)	Moles (Mm)
Solución I: Nitratos				
Nitrato de amonio	KNO ₃	101.108	400	4.9975
Nitrato de calcio	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	132.146	556	2.3539
Solución II: Sulfatos				
Sulfato de magnesio	MgSO ₄ ·7H ₂ O	246.498	370	1.5010
Sulfato de manganeso	MnSO ₄ ·H ₂ O	169.01	22.3	0.132
Sulfato de zinc	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	287.54	8.6	0.0299
Sulfato de cobre	CuSO ₄ ·5H ₂ O	249.68	250μ	0.001
Solución III: Halógenos				
Cloruro de calcio	CaCl ₂ ·2H ₂ O	147.02	96	0.6529
Solución: IV Fosfato, ac. bórico, molibdeno				
Fosfato de sodio	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	138.02	170	1.249
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	61.68	6.2	0.1003
Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	241.95	250μ	0.001
Solución V: Quelantes				
Sulfato ferroso	FeSO ₄	278.21	27.8	0.099
EDTA	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ ·2H ₂ O	372.30	37.3	0.1002

Anexo 4. Contenido de diferentes cocteles de vitaminas

Nombre del compuesto	Fórmula	P. M. (g)	mgL-1
Vitaminas Nitsch			
Myo-inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.20	1000
Tiamina-HCl	C ₁₂ H ₁₇ N ₄ O ₅ Cl·HCl	337.30	5
Ácido nicotínico	C ₆ H ₆ NO ₂	123.10	5
Piridoxina-HCl	C ₈ H ₁₁ NO ₃ ·HCl	205.60	0.5
Biotina	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	244	0.05
Ácido fólico	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆	417	0.5
Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂	75	2
Vitaminas Kao			
Ácido P-aminobenzoico	C ₇ H ₇ NO ₂	20.01	2
Ácido L-ascórbico	C ₆ H ₈ O ₆	176	200
Biotina-D	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	244	1
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
Ácido fólico	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

Anexo 5. Protocolo de extracción de ADN mediante el kit denominado ChargeSwitch® gDNA Plant Kit

Antes de iniciar con el protocolo se debe macerar el material vegetal con la ayuda de un mortero y nitrógeno líquido. El material residual se concentra en tubos de microcentrífuga. Lo siguiente será seguir los pasos del fabricante:

Materiales y soluciones

- Muestra vegetal macerada, suspendida con la solución L18 del Kit (1.2 ml)
- MagnaRack™ (soporte para tubos de microcentrífuga que cuenta con imanes).
- Tubos de microcentrífuga de 1.5 ml
- Micropipetas
- Perlas magnéticas ChargeSwitch®
- Detergente al 10% ChargeSwitch® (solución D1)
- Buffer de lavado ChargeSwitch® (solución W12)
- Buffer de elusión ChargeSwitch® (solución E6)

Procedimiento

1. Resuspender la solución Perlas magnéticas ChargeSwitch®
2. Adicionar 100 µl de la solución D1 al tubo que contiene el material vegetal
3. Adicionar 40 µl de Perlas magnéticas ChargeSwitch®, previamente resuspendido
4. Mezclar lentamente con una micropipeta de 1 ml, de abajo hacia arriba. Evitar formas burbujas con la solución
5. Incubar por 1 minuto a temperatura ambiente
6. Colocar los tubos en el MagnaRack™ hasta que se haya formado una pastilla.
7. Sin remover los tubos del imán, cuidadosamente retirar y desechar el sobrenadante evitando mezclar la pastilla. Se procede inmediatamente a lavar el ADN
8. Remover los tubos del magneto
9. Adicionar 1 ml de la solución W12 en el tubo y lentamente resuspender la pastilla, sin agitar demasiado para evitar formar burbujas
10. Colocar los tubos en el magneto hasta que se haya formado nuevamente la pastilla y el sobrenadante quede claro.

-
11. Sin remover los tubos del imán, cuidadosamente retirar y desechar el sobrenadante evitando mezclar la pastilla.
 12. Remover los tubos del magneto
 13. Repetir nuevamente del paso 9 al 12. Se procede inmediatamente a la elución del ADN
 14. Remover los tubos que contienen las pastillas magnéticas
 15. Adicionar 150 ml de la solución E6
 16. Resuspender lentamente entre 15 y 30 veces, usando una pipeta de 100 μ l, hasta que las perlas magnéticas estén completamente dispersadas o no haya grumos
 17. incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto
 18. Colocar los tubos en el magneto hasta que se haya formado nuevamente la pastilla y el sobrenadante quede claro.
 19. Sin remover los tubos del imán, transferir cuidadosamente el sobrenadante que contiene el ADN a un tubo de microcentrífuga estéril

12. Referencias

- Abbasin, A., Zamani, S., Movahedd, S., Khaksar, G. y Sayed Tabatabaei, B. E. 2010. In vitro micropropagation of yew (*Taxus baccata*) and production of plantlets. *Biotechnology*. 9(1): 48-58.
- Abdelnour-Esquivel, A. y Vincent-Escalant, J. 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Costa Rica.
- Abrahamian, P. y Kantharajah, A. 2011. Effect of vitamins on in vitro organogenesis of plant. *American Journal of Plants Sciences*. 2:669-674.
- Arandal Martínez, A. 2009. Producción de células transformadas genéticamente estables de *Taxus globosa*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México
- Bai, J., Ito, N., Sakai, J., Kitabatake, M., Fujisawa, H., Bai, L., Dai, J., Zhang, S., Hirose, K., Tomida, A., Tsuruo, T. y Ando, M. 2005. Taxoids and abietanes from callus cultures of *Taxus cuspidata*. *Journal of Natural Products*. 68(4):497-501.
- Bailey, L. H. 1949. Manual of cultivated plants. Revised edition. MacMillan Publishing Co. Inc. New York. Pp. 99-101.
- Barradas-Dermitz, D., Hayward-Jones, P. M., Mata-Rosas, M., Palomeros-Sánchez, B., Platas-Barradas, O. B. J. y Velásquez-Toledo, R. F. 2010. *Taxus globosa* S. cell lines: initiation, selection and characterization in terms of growth, and of bacatin III and paclitaxel production. *Biocell*. 34(1):1-6.
- Barrios, H, Zhang, Y. L., Sandoval, C. y Xiao, Z. A. 2009. Increase of taxol production in *Taxus globosa* shoot callus by chlorocholine chloride. *The Open Natural Products Journal*. 2:33-37
- Barwale, U. B., Kerns, H. R y Widholm, J. M. 1986. Plant regeneration from callus of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. *Plant*. 167(4):473-481.
- Bedi, Y. S., Ogra, R. K., Koul, K, Kaul, B. L., Kapil, R. S.. 1996. Yew (*Taxus* spp.). A new lok on utilization, cultivation and conservation,. In: Hada S. S., Kaul, M. K., Edits. Supplement to cultivation and utilization of medicinal plants. Jammu-tawi: regional research laboratory; p.443-456.
- Besumbes, O., Sauret-Gúeto, S., Phillips, m. A., Imperial, S., Rodríguez-Concepción, M y Boronat, A. 2004. Metabolic engineering of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis* for the production

-
- of taxadiene, the first committed precursor of taxol. *Biotechnology and Bioengineering*. 8(2):168-175
- Camps García, P., Vázquez Cruz, S. y Escolano Mirón, C. 2010. *Química farmacéutica I*. Tomo 1., Volumen 1. Edicions Universitat Barcelona. 294 páginas.
- Christen, A. A., Bland, J. y Gibson, D. M. 1989. Cell cultures as a means to produce Taxol. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 30:566.
- Conifer Specialist Group 1998. *Taxus globosa*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on **25 July 2012**.
- Contreras, R., Luna, I. 2001. Presencia de *Taxus globosa* Schlecht. (Taxaceae) en el estado de Chiapas, México. *Polibotánica*. 12:51-55
- ¹Contreras-Medina, R., Luna-Vega, I., Ríos-Muñoz, C. 2010. Distribución de *Taxus globosa*(Taxaceae) en México: Modelos ecológicos de nicho, efectos del cambio del uso de suelo y conservación. *Revista Chilena de Historia Natural* 83:421-433.
- Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES). 2004. Décimo tercer convención de las partes en bangkok (thailand), 2–14 de octubre 2004.
- Cusidó RM, Palazón J, Navia-Osorio A, Mallol A, Bonfill M, Morales C, Piñol MT. 1999. Production of Taxolr and baccatin III by a selected *Taxus baccata* callus line and its derived cell suspension cultures. *Plant Sci.* **146**: 101–107.
- Dong, H. D., Zhong, J. J. 2001. Significant improvement of taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* by combining elicitation with sucrose feed. *Biochemical Engineering Journal* 8: 145-150.
- Expósito, O., Bonfill, M., Moyano, E., Onrubia, M., Mirjalili, M. H., Cusidó, R. M., Palazón, J. 2009. Biotechnological production of taxol and related taxoids: current state and prospects. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 9: 109-121.
- Fernández Da Silva, R. y Menéndez, A. 2004. Efecto del herbicida glufosinato de amonio en diferentes explantes de *Coffea Arabica* cv. Catimor. *Acta Científica Venezolana*. 55: 211-217.
- Furmanowa, M. y Syklovska-Baranek, K. 2000. Hairy root cultures of *Taxus x media* var. *Hicksii* Rehd. As a new source of paclitaxel and 10-deacetylbaaccatin-III. *Biotechnology Letters*. 22:683-686.

-
- Furmanowa, M., Oledzka, H., Slykowska-Baranek, K., Józefowicz, J. y Gieracka, S. 2000. Increased taxane accumulation in callus cultures of *Taxus cuspidata* and *Taxus x media* by some elicitors and precursors. *Biotechnology Letters*. 22: 1449-1452
- García Flores, C., Aguilar, R., Reyes de la Cruz, H., Albores, M. y Sánchez de Jiménez, E. 2001. A maize insuline-like growth factor signals to a transduction pathway that regulates protein synthesis in maize. *Biochemical Journal*. 358:95,100.
- García, M. A. 2011. Distribución potencial y análisis ecológico de *Taxus globosa* en México. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Nuevo León Facultad de Ciencias Forestales.
- George, E., Hall, M. y Klerk, G. 2007. Plant propagation by tissue culture. 3rd edition. Volume 1. The background. Springer.
- Goodman, D. B. y Davis, W. L. 1993. Insulin accelerates the post germinative development of several fat-storing seeds. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 190(2):440-446.
- Granada, M. L. 2006. Factor de crecimiento similar a la insulina y sus proteínas de transporte. *Endocrinol Nutr*. 53(7):467-75.
- Guo, B. H., Kai, G. Y., Jin, H. B. y Tang, K. X. 2006. Taxol synthesis, review. *African Journal of Biotechnology*. 5(1):15-20.
- Han, K. H., Fleming, P., Walker, K., Loper, M., Chilton, W. 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 Science*. 95: 187-196.
- Han, K. H., Fleming, P., Walker, K., Loper, M., Chilton, W. 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. *Plan Science*. 95: 187-196.
- Han, K.-H., Gordon, M. P. and Floss, H. G. 2000. Genetic transformation of *Taxus* (yew) to improve production of taxol. In *Biotechnology in Agriculture Forestry*, 44 (Transgenic Trees), edited by Y. P. S. Bajaj, pp. 291–306. Berlin: Springer-Verlag.
- Holton RA, Somosa C, Kim H-B, Liang F, Biediger J, Boatman PD, Shindu M, Smith CC, Kim S, Nadizadeh H, Suzuki Y, Tao C, Vu P, Tang S, Zhang P, Murthi KK, Gentile LN, Liu JH. 1994. First total synthesis of taxol. *J. Am. Chem. Soc.* **116**: 1597–1600.
- Juárez Domínguez, A., Santillán Mendoza, R., Mellado Rojas, M. E. y Beltrán Peña, E. M. 2010. Insulina estimula el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* a través de la cinasa MAPK3. *Biológicas*, 12(1): 14 – 19

-
- Ketchum, R. E. B., Gibson, D., Croteau, R. B. y Shuler, M. L. 1999. The kinetics of taxoid accumulation in cell suspension cultures of *Taxus* following elicitation with methyl jasmonate. *Biotechnology and bioengineering*, 62(1): 97-105.
- Ketchum, R. E. B., Wherland, L. y Croteau, R. B. 2007. Stable transformation and long-term maintenance of transgenic *Taxus* cell suspension cultures. *Plant Cell Reports*. 26: 1025-1033.
- Khosroushahi, A. Y., Valizadeh, M., Ghasempour, A., Khosrowshahli, M., Naghdibadi, H., Dadpour, M. R. y Omid, Y. 2006, Improved taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus baccata*. *Cell Biology International*. 30: 262-269.
- Kim, B. J., Gibson, D. M. y Shuler, M. L. 2005. Relationships of viability and apoptosis to taxol production in *Taxus sp.* suspension cultures elicited with methyl jasmonate. *Biotechnology Progress*. 21: 700-707.
- Kim, C. H., Kim, K. I. y Chung, I. S. Expression of modified green fluorescent protein in suspension culture of *Taxus cuspidate*. *Journal of Microbiology and biotechnology*. 10(1): 91-94.
- Kim, J. A., Baek, K. H., Son, Y. M., Son, S. H. y Shin, H. 2009. Hairy root cultures of *Taxus cuspidate* for enhanced production of paclitaxel. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 52(2): 144-150.
- Lima, M. M., Velásquez, E., Unshelm, G., Torres, C., Rosa, F. y Lanza, P. 2009. Asociación de la insulina y el factor de crecimiento semejante a la insulina tipo 1 (IGF-1) en el cáncer de mama. *Gaceta médica Caracas*. 117(3):226-231
- López Carrillo, A. 2012. Establecimiento y micropropagación de cultivos in vitro de papa (*Solanum tuberosum*) libres de virus. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. p65.
- Luan, E. C., Allen, S. E. y Bolyard, M. G. 1996. Transient GUS expression in zygotic embryos of *Taxus brevifolia*. *In vitro Cellular and Development Biology-Plant*. 32:81-85.
- Luna Vega, M. I. 2003. *Taxus globosa*. Taxones del bosque mesófilo de montaña de la Sierra Madre Oriental incluidos en la norma oficial mexicana. Herbario FCME, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto W025. México. D.F.
- Majumder, A. y Jha, S. 2009. Biotechnological approaches for the production of potential anticancer leads podophyllotoxin and paclitaxel: an overview. *E Journal of Biological Science*. 1(1):46-69.

-
- Martínez García, M. 2011. Producción in vitro de taxanos de *Taxus globosa* bajo diferentes condiciones de cultivo. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México,
- McCown, B. H. y Lloyd, G. 1981. *Woody plant medium (WPM) A mineral formulation for microculture of woody plant species*. Journal of Horticultural Science 16, pág. 453.
- Melo, V., Melo Ruiz, V y Cuamatzi, O. 2006. Bioquímica de los procesos metabólicos. Editorial REVERTE. México. PP. 98
- Naill, M. C. y Roberts, S. C. 2005. Cell cycle analysis of *Taxus* suspension cultures at the single cell level as an indicator of culture heterogeneity. Biotechnology and bioengineering. 90(4): 491-500.
- Nicolaou KC, Yang Z, Liu JJ, Ueno H, Nantermet PG, Guy RK, Claiborne CF, Renaud J, Louladouros EA, Pautvannan K, Sorensen EJ (1994) Total synthesis of taxol. *Nature* 367: 630–634.
- Nims, E., Dubois, C. P., Roberts, S. C. y Walker, E. L. 2006. Expression profiling of genes involved in paclitaxel biosynthesis for targeted metabolic engineering. *Metabolic Engineering*. 8:385-394.
- Rakoczy, M. 2002. Alternative methods of plant transformation –A short review. *Cellular and Molecular Biology Letters*. 7(3):849-858.
- Ramos-Lobato, N. A., Soto-Hernández, M., Zavala-Chávez, F y Roodríguez –González, M. T. 2003. Taxoides en el follaje del tejo mexicano (*Taxus globosa* Schelecht.). *Revista Chapingo Serie Horticultura* 9(1): 29-38.
- Reyes, M., Kosky, R. G., Bermúdez-Carabaloso, I. y Chong-Pérez, B. 2010. Determinación de la concentración mínima letal de glufosinato de amonio en diferentes materiales vegetales de banano cv. ‘Grande naine’ (*Musa AAA*). *Bioteología Vegetal* 10 (3): 157 – 168.
- Rodríguez-López, C. D., Rodríguez-Romero, A., Aguilar, R y Sánchez de Jiménez, E. 2011. Biochemical characterization of a new maize (*Zea mays* L.) peptide growth factor. *Protein and Peptide Letters*. 18:84-91.
- Rowinsky, E. K., Cazenave, L. A. y Donehover, R. C. 1990. Taxol: a novel investigational antimicrotubule agent. Review. *Journal of the National Cancer Institute*. 82(15): 1247-1258.
- Sánchez de Jiménez, E., Beltrán Peña, E. y Ortíz López, A. 1999. Insulin-stimulated ribosomal protein synthesis in maize embryonic axes during germination. *Physiologia Plantarum*. 105(1):148–154
- Sánchez-Camargo, V. A. 2012. Análisis comparativo de la región promotora del gen de ciclina D2;2 de maíz (*Zea mays* L.) y el promotor constitutivo CaMV35S. Tesis de licenciatura.

-
- Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería. México. 91p.
- Shemluck, M. J., Estrada, E., Nicholson, R. y Brobst, S. W. 2003. A preliminary study of the taxane chemistry and natural history of the mexican yew, *Taxus globosa* Schlttdl. Boletín de la Sociedad Botánica de México. 72:119-127.
- Sherrington, P. y George, E. 1984. Plant propagation by tissue culture. Handbook and directory of commercial laboratories. Exegetics limited. Inglaterra.
- Sinha, R. K. 2004. Modern Plant Physiology. Inglaterra. Alpha Science International. 461 p.
- Smith, R. H. 1986. Establishment of calli and suspension cultures. En: Weissbach, A. y Weissbach, H, (eds.). Methods in enzymology. 188: 539-549.
- Soto, M., Sanjurjo, M., González, M. T., Cruz, D., Giral, F. 2000. El tejo mexicano (*Taxus globosa* Sch.). Potencial de su aprovechamiento en taxol. Ciencia Ergo Sum. 7(3):277-279.
- Spjut R.W. 2007. Taxonomy and nomenclature of *Taxus* (TAXACEAE). Journal of Botany Reserach Institute of Texas 1:203- 289.
- Strobel, G. A. 2001. Taxol. Encyclopedia of Life Science.
- Taiz, L. y Zeiger, E., 2006. Plan physiology. Fifth edición. Sinauer assotiates incorporated. Pp. 650
- Tobar, F. 2010. Galería fotográfica de *Taxus globosa*. En línea:
<http://www.flickr.com/photos/41457628@N02/4950675684/>. Flirck.com
- Tzfira, T. y Citovsky, V. 2006. Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. Current Opinion in Biotechnology. 17: 147–154.
- Valderrama, A. M., Arango, R. y Afanador, L. 2005. Transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*: “ingeniería genética natural aplicada”. Revista Facultad Nacinal de Agronomía de Medellin. 58(1):2569-2585
- Visalakchi, S., Muthumary, J. 2010. Taxol (anticancer drug) producing endophytic fungi: an overview. International Journal of Pharma and Bio Sciences. 1(3):1-9
- Vongpaseuth, K., Nims, E., St. Amand, M., Walker, E. L. y Roberts, S. C. 2007. Development of a particle bombardment-mediated transient transformation system for *Taxus* spp. cells in culture. Biotechnology progress. 23(5): 1180-5.
- Wang, Y. D., Yuan, Y. J. y Wu, J. C. 2004. Induction studies of methyl jasmonate and salicylic acid on taxane production in suspenstion cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei*. Biochemical Engineering Journal 19: 259-265.

-
- Wani, M.C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P., McPhail, A. T. 1971. Plant antitumour agents. VI. The isolation and structure of Taxol, a novel antileukemic and antitumour agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society*. 93: 2325–2327.
- Wu, J., Wang, C. y Mei, X. 2001. Stimulation of production and excretion in *Taxus spp* cell cultures by rare earth chemical lanthanum. *Journal of biotechnology*. 85: 67-73.
- Wu, L. y lin, L. 2003. Enhancement of taxol production and release in *Taxus chinensis* cell cultures by ultrasound, methyl jasmonate and in situ solvent extraction. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 62: 151-155.
- Xu, J. F., Yin. P. Q., Wei, X. G. y Su, Z. G. 1998. Self-immobilized aggregate cultura of *Taxus cuspidate* for improved taxol production. *Biotechnology techniques*. 12(3):241-244.
- Zavala Chávez, F. 2001a. Análisis demográfico preliminar de *Taxus globosa* Schlecht en el Parque Nacional El Chico, Hidalgo, México. I. Población de adultos y algunas características del hábitat. *Ciencia Ergo Sum* 8(2): 169-174
- Zavala-Chávez, F., M. Soto-Hernández, Ma. T. Rodríguez-González. 2001b. El romerillo (*Taxus globosa* Schlecht.): biología, dificultades y perspectivas de su uso. *Revista Chapingo Serie horticultura* 7(1): 77-94.
- Zhang, C. H., Wu, J. Y. y He, G. Y. 2002. Efects of inoculums size and age on biomass growth and paclitaxel production of elicitor-treated *Taxus yunnanensis* cell cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 60:396-402.
- Zamudio, S. 1992. Familia Taxaceae. En: flora del bajo y de regions adyacentes. Instituto de ecología. Patzcuaro, Michoacán. Fasículo 9, 7p .