



RESUMEN

El árbol de *Taxus globosa* Schltl se encuentra bajo protección especial debido a que está en peligro de desaparecer por lo que se hace necesario un sistema biotecnológico sustentable con la finalidad de tener una alternativa viable para la conservación de la especie. *T. globosa* posee un potencial biológico ya que presenta un alto contenido de taxanos con interés farmacológico, entre los más importantes se encuentra el taxol, el cual es utilizado como un potente anti cancerígeno. En este trabajo de investigación se estableció por primera vez el cultivo *in vitro* de *T. globosa*, obteniendo cultivos de callos friables de color café claro derivados de hoja en medio Gamborg (B5) de inducción (ácido naftaleno acético [ANA 2 mg/L]) a los 10 días de cultivo. Los cultivos de callo se subcultivaron en medio B5 de producción el cual contenía picloram (PIC) 4 mg/L, cinetina (CN) 1 mg/L y ácido giberélico (AG3) 0.5 mg/L, durante 33 días; estos cultivos presentaron un tiempo de duplicación de 14.5 días y una velocidad de crecimiento de 0.047 d⁻¹. Con respecto a la producción de taxanos los callos de *T. globosa* produjeron cuatro de los cinco taxanos que se analizaron. Los de mayor concentración fueron: la cefalomanina (80.82 µg/g de Peso seco y un rendimiento de 2.69 x10⁻⁰⁶) y el taxol (55.88 µg/g de Peso seco y un rendimiento de 1.86 x10⁻⁰⁶); por otro los que se produjeron en menor concentración fueron la baccatina III (38.06 /g de Peso seco y un rendimiento de 1.27 x10⁻⁰⁶) y el 10-deacetiltaxol (8.72/g de Peso seco y un rendimiento de 2.91 x10⁻⁰⁷). Los cultivos de células en suspensión se establecieron a partir de callo friable derivado de hoja en medio B5 producción, durante 32 días; los cuales fueron elicitados con jasmonato de metilo (100µM) en condiciones de obscuridad. Estos cultivos tuvieron un tiempo de duplicación de 1.2 días y una viabilidad celular de 81.5%. Mediante la elicitación se logró estimular e incrementar la producción de cinco taxanos presentes en la especie, de los cuales el taxol tuvo una producción total de 2574.1 µg/L al día 20 de cultivo con un porcentaje de excreción de 31.62%, el 10-deacetiltaxol tuvo una concentración de 629.7 µg/L al día 1 y 4.63% de excreción seguido de baccatina III con 302.24 µg/L al día 16 con 56.37% de excreción, la cefalomanina con 189.3 µg/L a las 6 horas de haber añadido el elicitor obteniendo 3.37% de excreción, por último la 10-deacetilbaccatina III se obtuvo a una concentración total de 120 µg/L con 96.01% de excreción al día 28 de cultivo. En estos cultivos no se logró estimular al 100% la excreción de los cinco taxanos al medio de cultivo. Con respecto a la expresión del gen *ts* y su relación con la producción de los



ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE TAXANOS Y SU RELACIÓN CON LA EXPRESIÓN DEL GEN *ts* EN CULTIVOS *in vitro* DE *Taxus globosa* Schldl.

Israel Benítez García, 2009

taxanos, se observó que en los cultivos control la expresión del gen *ts*, se mantiene sin cambios notables; sin embargo, en los cultivos elicitados se observa un incremento del transcrito a las 24 y 96 horas, el transcrito se acumula hasta cinco veces con relación a lo cuantificado en el control. En base a estos resultados se tienen establecidas las condiciones de cultivo de callos y líneas celulares productoras de cinco taxanos derivados del cultivo *in vitro* de *T. globosa* y su relación con la acumulación del transcrito del gen *ts* en los cultivos celulares control y elicitados con jasmonato de metilo.



ABSTRACT

Taxus globosa Schltl is under special protection because it is in danger of disappearing so we need to make a sustainable biotechnological system in order to have a viable alternative for the conservation of the species. *T. globosa* has a high content of taxanes with pharmacological interest among the most important taxol, which is used as a potent anticancer. This work was laid for the first time *in vitro* culture of *T. globosa*, obtaining light brown friable callus cultures derived from leaves in Gamborg (B5) induction medium (naftalen acetic acid [NAA 2 mg/L]) for 10 days of culture. Sub-cultivate the callus culture in B5 production medium with picloram (PIC) 4 mg/L, kinetina (KN) 1 mg/L and gibberellic acid (AG3) 0.5 mg/L for 33 days; these cultures had a doubling time of 14.5 days and a growth rate of 0.047 d⁻¹. Respect to the production of taxanes, the callus of *T. globosa* produced four of the five taxanes that were analyzed. The most concentrated were: cephalomanine (80.82 µg/g of dry weight and yield 2.69 x10⁻⁰⁶) taxol (55.88 µg/g of dry weight and yield 1.86 x10⁻⁰⁶) and the lowest concentration were: baccatine III (38.06 /g of dry weight and yield 1.27 x10⁻⁰⁶ and 10-deacetyltaxol (8.72/g of dry weight and yield 2.91 x10⁻⁰⁷). The cell suspension cultures were established from friable callus derived from leaf to production B5 medium during 32 days. These cultures were elicited with Methyl jasmonate (100µM) in darkness conditions. These cultures had a doubling time of 1.2 days and a cell viability of 81.5%. The elicitation was achieved enhance and stimulated the production of five taxanes, in which the taxol had a total production of 2574.1 mg/L on day 20 of culture with an excretion rate of 31.62%, the 10-deacetyltaxol had a concentration 629.7 µg/L on first day and 4.63% of excretion, the baccatine III had 302.24 µg/L on 16 day with 56.37% of excretion, the cephalomanine with 189.3 µg/L at a six hours after added the elicitor obtaining 3.37% of excretion and the 10-deacetyl baccatine III had a total concentration of 20 µg/L with 96.01% of excretion on day 28 of culture. In these cultures, the excretion was stimulated in a 100% of the five taxanes in the culture medium. The *ts* gene expression and its relation with taxanes' production, was observed in control cultures, where *ts* gene expression was maintained without