



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS
ASOCIADOS AL TEJO MEXICANO (*Taxus globosa*) Y ESTUDIO DE SU
CAPACIDAD PARA PRODUCIR TAXOL

T E S I S

Que como uno de los requisitos para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS
QUIMICOBIOLOGICAS
P R E S E N T A:

M. EN C. ZOILA ROSA FLORES BUSTAMANTE

DIRECTORES

DR. CUTBERTO JOSÉ GALÍNDEZ MAYER
DR. LUIS BERNARDO FLORES COTERA



MÉXICO, D. F.

2009

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Metabolismo Secundario de Microorganismos del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional y en el Laboratorio de Bioingeniería del Departamento de Ingeniería Bioquímica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional; bajo la Codirección de los Doctores: Dr. Cutberto José Juvencio Galíndez Mayer y Dr. Luis Bernardo Flores Cotera.

El trabajo se desarrollo dentro del proyecto: “Estudio de la biodiversidad de hongos endofíticos asociados al tejo mexicano del estado de Hidalgo y de su potencial para producir paclitaxel”. Financiado por FOMIX-HGO-2006-CO1-49004.

Índice general

índice general	i
Índice de figuras	iv
Índice de tablas	vii
Resumen	x
Abstract	xi
1. Introducción	1
2. Justificación	26
3. Objetivo general	28
4. Objetivos particulares	29
5. Material y métodos	31
6. Resultados	45
7. Discusión	83
8. Conclusiones	86
9. Prospectivas	87
10. Literatura citada	88

Índice de figuras

Figura 1. Sistema de numeración del esqueleto normal de taxano	1
Figura 2. Estructura del Paclitaxel (Paclitaxel®). Ph: grupo fenilo, PhONH: grupo N-acilo, AcO: Grupo Acetil o Acetoxi, OCOPh: grupo Benzoiloxi, anillo Oxetano 5-20	2
Figura 3. Vista longitudinal (a) y transversal (b) del microtúbulo.	3
Figura 4. Equilibrio dinámico de la tubulina y sus monómeros α y β tubulinas	4
Figura 5. Representación esquemática de ensamble normal de los microtúbulos (A) y ensamble de los microtúbulos promovido por paclitaxel (B)	5
Figura 6. Esquema propuesto de fragmentación de paclitaxel. Ac: Acetato, Bz: Benzoato	6
Figura 7. Espectro de masas de paclitaxel por barrido. Los asteriscos Representan los iones fragmentados	7
Figura 8. Espectro de masas de iones producto del fraccionamiento de paclitaxel (MS/MS), a partir del ion molecular protonado m/z 854	8
Figura 9. Biosíntesis de paclitaxel ; ilustrando la acetilación de 10-diacetilbacatina III a bacatina III por la enzima 10-diacetilbacatina III O-acetiltransferasa (DBAT) a) y la tranferencia de un grupo aminofenilpropanoil al C-13 de bacatina III por una O-(3-amino-3-fenilpropanoil) transferasa (BAPT)	9
Figura 10. Diagrama general de bloques de la Estrategia experimental del proyecto de tesis doctoral	10

Figura 11. Aislamiento de hongos.....	11
Figura 12. Aislamiento de bacterias.....	12
Figura 13. Inmunoensayo de paclitaxel de 72 aislados bacterianos de <i>Taxus globosa</i> .(valores de la tabla 11).....	13
Figura 14. Segundo inmunoensayo de paclitaxel de aislados bacterianos.....	14
Figura 15. Tercer inmunoensayo de paclitaxel de aislados bacterianos.....	15
Figura 16. Promedio del segundo y Tercer inmunoensayo de paclitaxel de aislados bacterianos.....	16
Figura 17. Inmunoensayo de paclitaxel de 73 aislados fúngicos de <i>Taxus globosa</i>	17
Figura 18. Primer y Segundo inmunoensayo de paclitaxel de aislados fúngicos de <i>taxus globosa</i>	18
Figura 19. Tercer inmunoensayo (M1D-2X) y promedio de 1er y 2º inmunoensayos de 7 aislados fúngicos de <i>taxus globosa</i>	19
Figura 20. Espectrograma del estándar de 13 taxanos en el equipo Agilent 1100 Series LC/MSD.	20
Figura 21. Espectrogramas del extracto del cultivo del aislado BCHCNZ-249 y del estándar de 13 taxanos.....	21
Figura 22. Espectro de masas del estándar de 13 taxanos al tiempo de retención 26.4 minutos.....	22
Figura 23. Espectro de masas del extracto del cultivo del aislado BCHCNZ-249 al tiempo de retención 26.4 minutos.....	23

Figura 24. Espectrogramas de las transiciones 854 → 286 y 876→308 del estándar de paclitaxel. Infusión directa en el equipo 3200 QTRAP LC-MS-MS. Applied Biosystems.....24

Figura 25. Espectrogramas de las transiciones 854 → 286 extracto del cultivo del aislado BCHCNZ-249. Infusión directa en el equipo 3200 QTRAP LC-MS-MS. Applied Biosystems..... 25

Figura 26. Gel de agarosa al 1.5% que muestra el fragmento amplificado de 200 pb del gen *dbat* del aislado bacteriano BCHCNZ-249. Carril 1 y 3: marcador 100bp DNA Ladder, Fermentas, carril 2: BCHCNZ-249.... 26

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Principales acontecimientos históricos del paclitaxel.....	1
Tabla 2	Paclitaxel en <i>Taxus</i>.....	2
Tabla 3	Hongos con capacidad de producción de paclitaxel.....	3
Tabla 4	Bacterias con capacidad de producir paclitaxel.....	4
Tabla 5	Aislados bacterianos de muestras del árbol <i>Taxus</i>.....	5
Tabla 6	Aislados bacterianos de muestras del árbol <i>Taxus Globosa</i> No. 27, utilizando el tratamiento II, (limpieza con etanol al 95%, homogenización con agua e incubación por 1 ó 24 horas a temperatura ambiente. Medios de cultivo: M1= R2A, M2=BHA y M3=AN).....	6
Tabla 7.	Aislados bacterianos de muestras del árbol <i>Taxus Globosa</i> No. 27 utilizando el tratamiento III (Duramen sin lavar y lavado con agua destilada estéril. Medios de cultivo: M1= R2A, M2=BHA y M3=AN).....	7
Tabla 8.	Hongos aislados de las muestras de los árboles de <i>Taxus Globosa</i> No. 11 y No. 29, tratadas con cloro al 3% o etanol al 96% a los: 1, 5, 15 y 25 minutos. El fruto únicamente se enjuagó con agua destilada. El medio para aislamiento fue PDA.....	8
Tabla 9.	Aislados bacterianos con capacidad de crecer en medio S-7. Cultivo en 25 mL a 25 °C y 120 rpm.....	9
Tabla 10.	Aislados fúngicos con capacidad de crecer en medio M1D. Cultivo en 25 mL a 25 °C y 40 rpm.....	10

Tabla 11. Inmunoensayo de 72 aislados bacterianos de <i>Taxus globosa</i>	11
Tabla 12. Segundo y tercer inmunoensayo de aislados bacterianos.....	12
Tabla 13. Aislados bacterianos positivos a paclitaxel por inmunoensayo.....	13
Tabla 14. Primer inmunoensayo de paclitaxel de aislados fúngicos de <i>taxus globosa</i>	14
Tabla 15. Segundo inmunoensayo de paclitaxel de aislados fúngicos de <i>taxus globosa</i>	15
Tabla 16. Similitud entre los aislados fúngicos de <i>T. globosa</i> y cepas de referencia del Genbank, estimadas por BLAST del rDNA 26S.....	16
Tabla 17. Similitud entre las bacterias aisladas de <i>T. globosa</i> (El Chico, Hidalgo) y cepas de referencia del Genbank, estimadas por BLAST del rDNA 16S. 25.....	17
Tabla 18. Morfología colonial y celular de los aislados bacterianos: BCHCNZ-246, BCHCNZ-248, BCHCNZ-249, BCHCNZ-284 y BCHCNZ-294.....	18

RESUMEN

El objetivo de aislar bacterias y hongos asociados al árbol de tejo mexicano (*Taxus globosa*), determinar su capacidad de producción de paclitaxel e identificar los aislados positivos.

Se obtuvieron un total de 297 aislados bacterianos y un total de 119 aislados fúngicos asociados a *Taxus globosa* del Parque Nacional “El Chico”, Hidalgo, México. Del total de los aislados obtenidos, se lograron conservar y analizar por inmunoensayo, 72 bacterias y 73 hongos asociados a *Taxus globosa*.

Por medio del análisis de inmunoensayo se pudieron detectar 5 aislados bacterianos (BCHCNZ-246, BCHCNZ-248, BCHCNZ-249, BCHCNZ-284, BCHCNZ-294), y 7 aislados fúngicos (CHTAM26, CHTAM32, CHTAM41, CHTAM72, CHTAM86, CHTAM90 y CHTAM100), con capacidad de producir paclitaxel.

Los 5 aislados bacterianos con capacidad para producir paclitaxel, pertenecen a los géneros *Paenibacillus* (BCHCNZ-249, BCHCNZ-284 y BCHCNZ-294) y al género *Bacillus* (BCHCNZ-246 y BCHCNZ-248). Bacterias del género *Bacillus* han sido reportadas como productoras de paclitaxel, mientras que bacterias del género *Paenibacillus*, no han sido reportadas como productoras de paclitaxel.

Los 7 aislados fúngicos con capacidad para producir paclitaxel pertenecen a los géneros *Eutypa* (CHTAM26), *Pestalotiopsis* (CHTAM32), *Trichoderma* (CHTAM41), *Fusarium* (CHTAM72), *Daldinia* (CHTAM86), *Bionectria* (CHTAM90) y *Biscogniauxia* (CHTAM100). De estos siete géneros de hongos, los que se han reportado como productores de paclitaxel son: *Pestalotiopsis* y *Fusarium*.

El análisis de LC/MS del extracto bacteriano del aislado BCHCNZ-249, perteneciente al género *Paenibacillus*, muestra el valor de masa/carga (m/z) 876, característico del aducto de sodio del paclitaxel.

El aislado BCHCNZ-249 mostró PCR positivo para un fragmento característico del gen *dbat* que codifica para 10-deacetylbaocatin III-10-O-acetyltransferase.

Los resultados de inmunoensayo, LCMS y la presencia del gen *dbat*, sugiere que el aislado BCHCNZ-249 del género *Paenibacillus*, tiene la capacidad de producir paclitaxel.

ABSTRACT

The objective of this work was to isolate bacteria and fungi associated to the tejo tree (*Taxus globosa*), determine their capacity to produce paclitaxel and identified the positive isolates.

A total of 297 bacterial and 119 fungal isolates associated to *Taxus globosa* from the National Park “El Chico”, Hidalgo, México were obtained. From the total isolates obtained, 72 bacteria and 73 fungi associated to *Taxus globosa* were analyzed by immunoassay.

Five bacterial isolates (BCHCNZ-246, BCHCNZ-248, BCHCNZ-249, BCHCNZ-284, BCHCNZ-294), y seven fungal isolates (CHTAM26, CHTAM32, CHTAM41, CHTAM72, CHTAM86, CHTAM90 y CHTAM100), were found positive to taxol analyzed by immunoassay.

The five taxol positive bacteria belonged to *Paenibacillus* (BCHCNZ-249, BCHCNZ-284 y BCHCNZ-294) and to *Bacillus* genus (BCHCNZ-246 y BCHCNZ-248). Bacteria from *Bacillus* genus have been reported as paclitaxel producers, while *Paenibacillus* genus was not.

The seven fungal isolates, positive to paclitaxel, belonged to the genus: *Eutypa* (CHTAM26), *Pestalotiopsis* (CHTAM32), *Trichoderma* (CHTAM41), *Fusarium* (CHTAM72), *Daldinia* (CHTAM86), *Bionectria* (CHTAM90) and *Biscogniauxia* (CHTAM100). From these seven fungal genuses, *Pestalotiopsis* and *Fusarium* have been reported as paclitaxel producers.

The extract from the bacterial BCHCNZ-249 isolate, belonging to *Paenibacillus* genus, showed a (m/z) 876 value, characteristic of paclitaxel sodium adduct, detected by LC/MS analysis.

The bacterial BCHCNZ-249 isolate, showed a characteristic DNA fragment, from the *dbat* gene, which codifies to -deacetylbaaccatin III-10-O-acetyltransferase.

The results from immunoassay, LCMS and the presence of the *dbat* gene suggested that the *Paenibacillus* BCHCNZ-249 isolate, had the capacity to produce paclitaxel.

Introducción

1. Introducción.

Reseña histórica del paclitaxel.

En 1856, el farmacéutico alemán Lucas obtuvo una mezcla de taxoides, a partir de *Taxus baccata*, a la que llamó taxina. Posteriormente Graff, en 1956, reportó que la taxina es una mezcla de al menos 11 compuestos, tres de los cuales son: taxina A, taxina B y Taxina C (Yuan H., 1998). No fue sino hasta 1960, cuando dio inicio el programa de búsqueda de extractos de plantas con actividad antitumoral, convocado por el Nacional Cáncer Institute de los Estados Unidos (NCI), en acuerdo con el United States Department of Agriculture (USDA). En 1962, se recolectaron miles de muestras de plantas y, particularmente Arthur Barclay, recolectó muestras de *Taxus brevifolia* en el estado de Washington. (Patel R. N., 1998). La citotoxicidad del extracto de corteza de *Taxus brevifolia* sobre células KB del carcinoma nasofaríngeo fue confirmado en 1964 (Zubrod C. G., *et al.*, 1966) y el aislamiento del compuesto activo (paclitaxel), de *Taxus brevifolia* fue reportado en 1967 por Wall and Wani, quienes, en 1971, reportaron también su estructura como un diterpeno poli-oxigenado complejo (Wani M.C., *et al.*, 1971). La actividad del paclitaxel en el modelo de melanoma B16 en 1975, atrajo aún más el interés de este compuesto y en 1977 se iniciaron las primeras pruebas preclínicas del paclitaxel, demostrándose posteriormente su actividad en sistemas de tumores mamarios (Cragg G. M., 1998). En 1980, Horwitz, del Albert Einstein Medical College, reportó que el modo de acción del paclitaxel era único, pues al contrario de cómo se pensaba, las propiedades citotóxicas del paclitaxel no se debían a su habilidad para desestabilizar los microtúbulos (estructuras importantes relacionadas a la división celular), sino a su capacidad para estabilizarlos, de tal manera que la mitosis se interrumpía (Horwitz S. B., *et al.*, 1982). A partir de este acontecimiento, se inició el desarrollo del paclitaxel como compuesto anticancerígeno, y hubo un avance muy rápido, de 1982 a 1994. Los estudios toxicológicos se iniciaron en 1980, terminándose en 1982 (Mc. Guire W. P., *et al.*, 1989). Posteriormente, en 1983, la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos, aprobó la primera fase de pruebas clínicas

del paclitaxel (seguridad humana y evaluación de dosis), finalizándose en 1984 y en 1985 se aprobó la segunda fase de pruebas clínicas (eficacia en varios tipos de cáncer). Para esta segunda fase de pruebas clínicas se recolectaron cerca de 120 toneladas de corteza de *Taxus brevifolia* entre 1987 y 1988, lo que alarmó a los grupos ecologistas y se colocó a *Taxus brevifolia* como una especie en peligro de extinción (Cragg G. M., *et al.*, 1993). Quedaba claro, en ese momento, que la insuficiencia del paclitaxel, tanto para las pruebas clínicas como para su uso terapéutico era un problema que aún quedaba pendiente por resolver. En 1989 se reportaron estudios clínicos favorables para el tratamiento de cáncer de ovario y en 1991 la compañía Bristol-Myers Squibb (BMS) fue seleccionada para comercializar el paclitaxel, quedando como responsable de la producción y comercialización del paclitaxel, así como del desarrollo de fuentes alternativas de producción del mismo (Patel R. N., 1998). El desarrollo de fuentes alternativas de producción se incrementó, ya que en 1992, la FDA aprobó el tratamiento de cáncer de ovario, en 1994 el tratamiento de cáncer de mama y en 1997 el tratamiento del sarcoma de Kaposi relacionado al SIDA (Patel R. N., 1998). Aunado a esto, el paclitaxel tiene una importancia económica muy grande, ya que las ventas de la compañía Bristol Mayers Squibb Co., sobrepasaban 1 billón de dólares anuales en 1998, para 1999 llegaron a 1.5 billones y para el año 2000 se reportaban ventas arriba de 2 billones de dólares anuales, considerándose al paclitaxel como la droga anticancerígena más lucrativa de la historia (Thayer A. M., 2003). Por otro lado, la NCI se había percatado de la importancia del suministro de paclitaxel por fuentes alternas y desde 1990, había otorgado financiamiento a diversos grupos de investigación, para estudios sobre: genética y propagación de cultivo de tejidos del tejo, biosíntesis, semi y síntesis total del paclitaxel, mejoras en métodos analíticos y de purificación del mismo, resistencia a la droga y factores que afectan la unión del paclitaxel a los microtúbulos; iniciándose así, una amplia investigación sobre el paclitaxel, con la finalidad principal de resolver la crisis de suministro del mismo (Cragg G. M., *et al.*, 1993). Adelantándose a la resolución de este problema, Christen publicó, en 1989, el primer reporte de producción de paclitaxel a partir del cultivo de células vegetales de *Taxus brevifolia* (Christen A. A., *et al.*, 1989) y en 1991, el mismo

autor, reportó la obtención de 1 – 3 mg/L de paclitaxel en el medio de cultivo de dichas células (Christen A. A., *et al.*, 1991, US Patent 50 19504). En 1994, las compañías ESCAgenetic y Phyton, en Estados Unidos, cultivaron células de *Taxus brevifolia* en reactores de 2500 y 75000 L, respectivamente. Actualmente las compañías Phyton, USA, Samyang Gebex en Taejon, Korea; y Phyton Biotech en Alemania (Zhong, 2002; Wink *et al.*, 2005), producen comercialmente el paclitaxel por cultivo de células vegetales y varios grupos de investigadores han hecho grandes avances en la elucidación de la biosíntesis de paclitaxel en *Taxus* durante los últimos 15 años (Hezari M., *et al.*, 1997; Ketchum R. E. B., *et al.*, 1999; Croteau R. B., 2006; Nims E., *et al.*, 2006). En 1994 Patel y colaboradores, reportaron la semisíntesis del paclitaxel a partir de la 10-deacetil-baccatina III, obtenida de hojas de árboles de *Taxus brevifolia*, y en ese mismo año, la compañía BMS, comercializó la producción de paclitaxel por este método (Patel R. N., 1998). La síntesis total de paclitaxel, la reportaron dos grupos de investigación en 1994, pero no fue factible su producción comercial, debido a sus bajos rendimientos y numerosos pasos (Holton R. A., *et al.*, 1994; Nicolaou K. C., *et al.*, 1994). Por otro lado, se han hecho estudios sobre la obtención de análogos del paclitaxel, con el fin de obtener: precursores del mismo, compuestos con actividad anticancerígena incrementada o compuestos alternativos para cánceres que hayan adquirido resistencia al paclitaxel (Kingston D. G. I., 2001). En 1996, el análogo del paclitaxel, docetaxel (Taxotere®), fue aprobado por la FDA para su uso como anticancerígeno. Otra fuente de obtención de paclitaxel que ha sido explorada, es el cultivo de microorganismos. En 1993, Stierle y Strobel reportaron el hongo *Taxomyces andreanae*, aislado de *Taxus brevifolia*, el cual producía de 24-25 ng/L de paclitaxel (Stierle A., *et al.*, 1993) y a partir de esa fecha se han aislado decenas de hongos (Strobel G. A., *et al.*, 1996 (a); Strobel G. A., *et al.*, 1997; Li J. Y., *et al.* 1998; Wang J., *et al.*, 2000; Guo B. H., *et al.*, 2006(a)) y algunas bacterias productoras de paclitaxel (Page M., *et al.*, 1996; Page M., *et al.*, 2000). Un dato importante, es el de la producción de 418 µg/L de paclitaxel, en una cepa mutada del hongo *N. silviforme*, aislado de *Taxus cuspidata* (Yuan J., *et al.*, 2006, Zhou D., *et al.*, 2005; Zhao K., *et al.* 2004), que comparado con la

producción de paclitaxel del primer hongo aislado por Stierle A., *et al.*, 1993, es de 15 000 veces más. A la fecha, se continúan haciendo numerosas investigaciones sobre el paclitaxel, en todas las áreas mencionadas anteriormente, con el fin principal, de abastecer la demanda, cada vez mayor de este anticancerígeno. La tabla 1, resume los principales acontecimientos históricos del paclitaxel.

Tabla 1. Principales acontecimientos históricos del paclitaxel.

Año	Evento	Referencia
1856	Lucas obtuvo taxina de <i>Taxus baccata</i>	Baloglu E., 2001
1956	Graf purificó taxina A, taxina B y taxina C de taxina	Yuan H., 1998
1960	National Cancer Institute- Agricultural Department USA, iniciaron búsqueda de extractos naturales con actividad antitumoral	Cragg G. M., <i>et al.</i> , 1993
1962	Arthur Barclay recolectó muestras de <i>Taxus brevifolia</i>	Patel R. N., 1998
1964	Wall confirmó la citotoxicidad de extracto de corteza de <i>Taxus brevifolia</i> sobre células KB del carcinoma nasofaríngeo	Wall M. E., 1998; Zubrod C. G., <i>et al.</i> , 1966
1967	Wall y Wani aislaron el compuesto activo de <i>Taxus brevifolia</i>	Wani M. C., <i>et al.</i> 1971
1971	Wall y Wani publicaron la estructura del paclitaxel	Wani M. C., <i>et al.</i> 1971
1980	Horwitz propuso el mecanismo de acción del paclitaxel	Horwitz S. B., <i>et al.</i> , 1982
1989	Publicación de la pruebas clínicas del paclitaxel	Mc. Guire W. P., <i>et al.</i> , 1989
1989	Primera publicación de paclitaxel a partir de cultivo de células de <i>T.brevifolia</i>	Christen A. A., <i>et al.</i> ,1989
1991	Christen obtuvo 1-3 mg/L de paclitaxel de cultivo de células de <i>T.brevifolia</i>	Christen A. A., <i>et al</i> US Patent 50 19504, 1991
1992	Bristol-Myers Squibb recibió autorización de la FDA para la comercialización de paclitaxel para uso en cáncer de ovario	Wall M. E., 1998
1993	Stierle y Strobel aislaron el hongo <i>Taxomyces andreanae</i> de <i>Taxus brevifolia</i> que producía de 24-25 ng/L de paclitaxel	Stierle A., <i>et al.</i> , 1993
1993	Bringi V., <i>et al.</i> , obtuvo 153 mg/L de paclitaxel en 42 días en cultivos de <i>Taxus chinensis</i>	Bringi V., <i>et al.</i> , 1993
1994	Semisíntesis del paclitaxel a partir del 10-Deacetil-baccatina III, obtenido de hojas de árboles de <i>Taxus brevifolia</i>	Chauviere G., <i>et al.</i> , 1981; Senilh V., <i>et al.</i> , 1984; Patel R. N., 1998
1994	Síntesis total de paclitaxel por los grupos de Holton y Nicolaou	Holton R. A., <i>et al.</i> , 1994; Nicolaou K. C., <i>et al.</i> , 1994
1994	ESCAgenetic y Phyton, USA, cultivaron células de <i>Taxus brevifolia</i> en reactores de 2500 y 75000 L, respectivamente.	Smith M. A. L., 1995
1996	La FDA aprobó el uso de docetaxel, análogo de paclitaxel en cancer de mama (Adventis)	Engels F. K., <i>et al.</i> , 2005
1996	Page M., <i>et al.</i> , reportaron la producción de 0.2 a 1 µg/L de paclitaxel en la bacteria <i>Sphingomona taxi</i> aislada de <i>T. candiense</i>	US Pat, 5,561,055,1996
1996	Strobel, obtuvo 60 -70 µg/L de paclitaxel en el hongo <i>Pestalotiopsis microspora</i> aislada de <i>Taxus wallachiana</i>	Strobel G. A., <i>et al.</i> , 1996(a)
1996	Yukimune, reportó una producción de 115.2 mg/L de paclitaxel en 2 semanas de cultivo de células de <i>Taxus media</i>	Yukimune Y., <i>et al.</i> ,1996
2001	La compañía Samyang genes, Corea, comercializó la producción de paclitaxel de cultivo de células vegetales.	Zhong J. J., 2002
2005	Zhou reportó la producción de 418 µg/ de paclitaxel, en una cepa mutada del hongo <i>N. silviforme</i> proveniente de <i>Taxus cuspidata</i>	Zhou D., <i>et al.</i> , 2005
1997-2007	Walter, Croteau, Chang, Jennewein han hecho progresos relevantes en la elucidación de la biosíntesis de paclitaxel en <i>Taxus</i>	Ketchum R. E. B., <i>et al.</i> , 1999; Croteau R. B., 2006; Nims E., <i>et al.</i> , 2006

1.1.1. Estructura química del paclitaxel.

En 1971, Wall and Wani asignaron el nombre de paclitaxel al compuesto con propiedades anticancerígenas recién descubierto; posteriormente, la compañía Bristol-Myers Squibb Pharmaceuticals utilizó el nombre de Paclitaxel® como la marca registrada de su formulación farmacéutica de paclitaxel y al paclitaxel se le dio el nombre genérico de paclitaxel (Baloglu E., *et al.*, 1999). El paclitaxel pertenece a una familia de productos naturales complejos llamados taxanos dipertenoides o taxoides (Baloglu E., 2001). Algunos taxoides se caracterizan por contener un esqueleto básico pentametil-triciclopentadecano llamado esqueleto normal de taxanos al que se le ha asignado un sistema de numeración propio (Figura 1), (Yuan H., 1998).

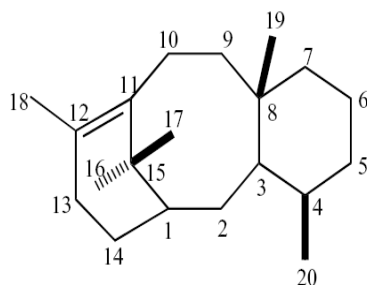


Figura 1. Sistema de numeración del esqueleto normal de taxano.

El paclitaxel pertenece a la clase de taxoides con esqueleto normal de taxanos y a la subclase llamada: taxoides con un anillo oxetano y una cadena lateral de β -fenilisosserina (Baloglu E., 2001), (Figura 2). Su fórmula condensada es $C_{47}H_{51}NO_{14}$ con peso molecular de 853 g/gmol.

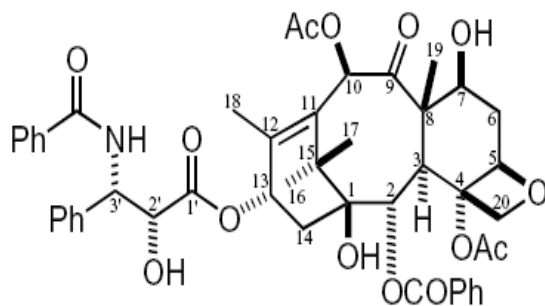


Figura 2. Estructura del Paclitaxel (Paclitaxel®). Ph: grupo fenilo, PhNH: grupo N-acilo, AcO: Grupo Acetil o Acetoxi, OCOPh: grupo Benzoiloxi, anillo Oxetano 5-20.

1.1.2. Modo de acción del paclitaxel.

Durante su ciclo de vida, las células eucariotas se reproducen mediante un proceso llamado mitosis, en el que se lleva a cabo la división celular. En la mitosis, las células pasan a través de cuatro periodos secuenciales: profase, metafase, anafase y telofase. Durante estos periodos, se efectúa: la condensación de los cromosomas, la formación del huso mitótico, el movimiento de los cromosomas al centro del huso (profase); la unión de los cromosomas al huso (metafase); la separación de las cromátidas, y su movimiento hacia los polos opuestos del huso (anafase) y durante la telofase, se forman dos nuevos núcleos de las células hijas (Prescott L. M., *et al.*, 1999). El huso mitótico está formado principalmente de microtúbulos. Los microtúbulos son tubos huecos de aproximadamente 30 nm de diámetro, cuya longitud varía dependiendo del tipo de célula y de la especie (Yuan H., 1998). La pared de los microtúbulos está formada por 13 subunidades de una proteína heterodímera, llamada tubulina. Las subunidades polipeptídicas, de la tubulina: α tubulina y β tubulina, tienen, cada una, un peso molecular aproximado de 55 000 g/gmol (Baloglu E., 2001), (Figura 3).

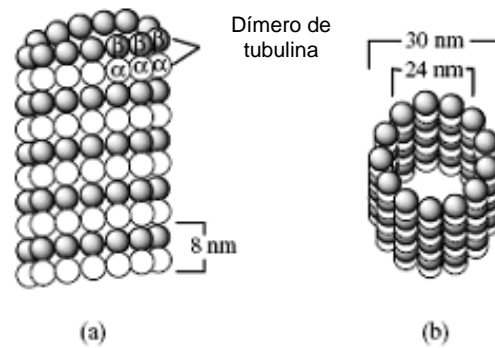


Figura 3. Vista longitudinal (a) y transversal (b) del microtúbulo. (Yuan H., 1998).

Los microtúbulos son polímeros intrínsecamente dinámicos, que se encuentran en equilibrio con sus monómeros α y β tubulinas, (Yvon A. M. C., 1999). En condiciones estacionarias, la velocidad de ensamble y desensamble se iguala, y la longitud de los microtúbulos permanece constante (Yuan H., 1998) (Figura 4). Los microtúbulos son estructuras que son sensibles a drogas antimitóticas, como es el caso del paclitaxel.

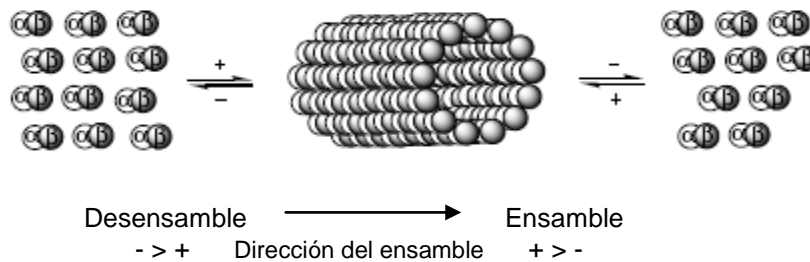


Figura 4. Equilibrio dinámico de la tubulina y sus monómeros α y β tubulinas (Yuan H., 1998).

En 1982, Horwitz, propuso que el paclitaxel promueve el ensamble de las proteínas α y β tubulinas en la formación de microtúbulos (Schiff P. B., *et al.*, 1979), así como la estabilización de los mismos (Schiff P. B., *et al.*, 1980), dando como resultado, un incremento de la masa y formación de agregados de microtúbulos (Kingston, D. G. I., 2001). Este incremento de masa y formación de agregados de microtúbulos bloquea la transición metafase/anafase de la mitosis, lo que conduce finalmente, a la muerte celular (Yvon A. M. C., *et al.*, 1999). La figura 5 muestra una representación esquemática del efecto del paclitaxel, sobre el proceso de polimerización de la tubulina (Kingston, D. G. I., 2001).

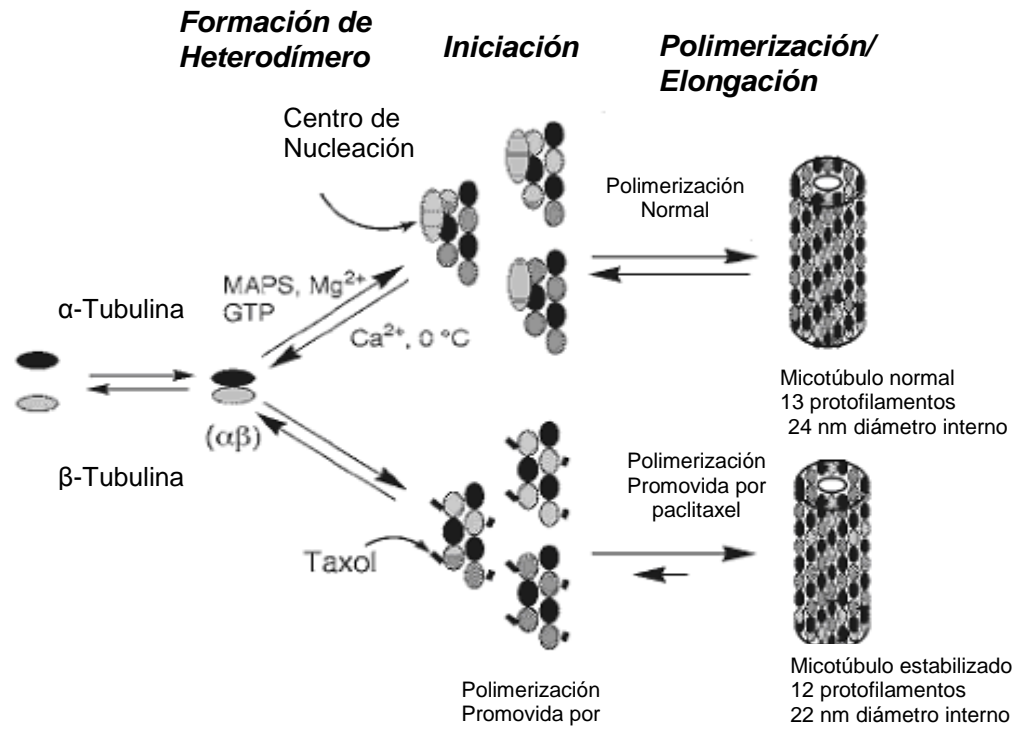


Figura 5. Representación esquemática de ensamble normal de los microtúbulos (A) y ensamble de los microtúbulos promovido por paclitaxel (B) (Kingston, D. G. I., 2001).

1.1.3. Árboles del género *Taxus* (árboles de tejo).

Los árboles del género *Taxus*, son árboles perenes, con 6 a 20 m de altura que se encuentran distribuidos esporádicamente en zonas templadas en el Hemisferio norte, con excepción de *AustroTaxus spicata*, que se localiza en el hemisferio sur (Guo B. H., *et al.*, 2006(a); Herrera R. M., 1998), abarcando Europa, Norteamérica, el norte de India, China y Japón (Parmar V. S., *et al.*, 1999). Las especies de *Taxus* se han agrupado en: *Taxus brevifolia* (Estados Unidos), *Taxus canadienses* (Canadá), *Taxus floridiana* (Florida), *Taxus globosa* (México), *Taxus baccata* (Europa), *Taxus chiniensis* (China), *Taxus wallachiana* (China y Filipinas), *Taxus yummanensis* (India), *Taxus cuspidata* (Japón y China), *Taxus marei* (Indonesia), *AustroTaxus spicata* (en el hemisferio sur) (Parmar V. S., *et al.*, 1999; Herrera R. M., 1998; Guo B. H., *et al.*, 2006(a)). Desde el descubrimiento del paclitaxel en *Taxus brevifolia*, el género *Taxus* ha atraído gran atención y numerosos grupos se han dedicado a su estudio.

De los árboles de tejo, el menos conocido es el tejo mexicano (*Taxus globosa*) (Soto M., *et al.*, 2000). A *Taxus globosa* se le encuentra, esporádicamente, desde la parte central de Tamaulipas, pasando por la Cuenca del Golfo y el eje Neovolcánico Transversal, hasta el sur de Honduras en Centroamérica (Soto M., *et al.*, 2000). Se han reportado diferentes sitios donde se localiza el tejo mexicano: siete sitios en Nuevo León, tres en Tamaulipas, uno en Veracruz, tres en Hidalgo, cinco en Oaxaca, cuatro en Guatemala, uno en El Salvador y cuatro en Honduras (Shemluck M. J., *et al.*, 2003); también se ha reportado que se encuentra localizado en Querétaro y Chiapas (Guerrero B., *et al.*, 2000). Su distribución es esporádica, y escasa en los diferentes sitios, comparada con *Taxus brevifolia* y *Taxus canadienses* (Shemluck M. J., *et al.*, 2003). En México, está incluida en el listado de especies raras y protegidas (NOM-059-SEMARNAT-2001; NOM-ECOL-059-1994). Las altitudes donde se localiza *Taxus globosa*, varían desde 3333 m en Guatemala, hasta 1050 m en un sitio de Tamaulipas, con una altitud promedio de 2396 m (Shemluck M. J., *et al.*, 2003) y crece, preferentemente, en zonas húmedas y con sombra de las cadenas montañosas. Existen solamente 2 estudios sobre el tejo mexicano referentes a su contenido de paclitaxel (Shemluck M. J., *et al.*, 2003; Soto M., *et al.*, 2000) y dos sobre su contenido de taxoides (Guerrero B., *et al.*, 2000; Herrera R. M., 1998). Shemluck reporta, que el

% de rendimiento de paclitaxel encontrado en las hojas del tejo mexicano (0.121 % del peso seco), es mayor, comparado al encontrado en las hojas de otras especies de tejos (0.0056 – 0.0088 %).

Debido a que *Taxus globosa* ha crecido en ambientes diferentes a las otras especies de tejos, ofrece un conjunto único de características genéticas, con aplicaciones en: cultivo de árboles, la obtención de líneas celulares (Shemluck M. J., *et al.*, 2003) y la obtención de microorganismos asociados a él, con el fin de encontrar otra fuente de suministro del anticancerígeno paclitaxel. Uno de los sitios donde se localiza *Taxus globosa* en el estado de Hidalgo, es el parque Nacional “El Chico”. El Parque Nacional “El Chico”, decretado el 6 de julio de 1982, tiene una superficie de 2,739-02-63 hectáreas, se ubica al centro sureste del estado de Hidalgo, e incluye parte de los municipios de Mineral del Chico, Mineral del Monte y Pachuca de Soto. En varias visitas al parque Nacional “El Chico”, se han ubicado alrededor de 20 árboles (2 a 8 m de altura) de tejo mexicano, distribuidos dentro del parque, en zonas húmedas y con sombra. Este es el sitio que se eligió para la realización de este proyecto. La Tabla 2, muestra algunos porcentajes de recuperación de paclitaxel (% de peso seco del material utilizado) en diferentes especies de árboles del género *Taxus*.

Tabla 2. Paclitaxel en *Taxus*

Especie de <i>Taxus</i>	Nombre Trivial	Parte del árbol	paclitaxel (% del peso seco)	Referencia
<i>T. brevifolia</i>	Tejo del Pacífico	corteza	0.0075 – 0.01	Wong, C. H. O., <i>et al.</i> , (1986)
<i>T. brevifolia</i>	Tejo del Pacífico	hojas	0.0081	Wheeler, <i>et al.</i> ,(1992)
<i>T. wallaichiana</i>	Tejo del Himalaya	corteza	0.0108	Miller R. W., <i>et al.</i> (1981)
<i>T. baccata</i>	Tejo Europeo	corteza	0.0165	Senilh, V. <i>et al.</i> , (1984)
<i>T. baccata</i>	Tejo Europeo	hojas	0.0088	Wheeler, <i>et al.</i> ,(1992)
<i>T. cuspidata.</i>	Tejo Japonés	hojas	0.0077	Wheeler, <i>et al.</i> ,(1992)
<i>T. media</i>	Tejo de Sumatra	hojas	0.0056	Wheeler, <i>et al.</i> ,(1992)
<i>T. floridiana</i>	Tejo de Florida	hojas	0.0060	Wheeler, <i>et al.</i> ,(1992)
<i>T. globosa</i>	Tejo Mexicano	corteza	0.0085	Soto, M., <i>et al.</i> (2000)
<i>T. globosa</i>	Tejo Mexicano	hoja	0.013	Soto, M., <i>et al.</i> (2000)
<i>T. globosa</i>	Tejo Mexicano	tallo	0.0064	Soto, M., <i>et al.</i> (2000)
<i>T. globosa</i>	Tejo Mexicano	hoja	0.0121	Shemluck M. J., <i>et al.</i> , (2003)

1.1.4. Fuentes de obtención de paclitaxel.

Las fuentes de obtención de paclitaxel, son básicamente: de árboles del género *Taxus* (tejos) (Wani M. E., *et al.*, 1971); por semisíntesis, a partir de 10-Deacetilbacatina III obtenida de las hojas de *Taxus* (Patel, R. N., 1998); por síntesis total (Holton R. A., *et al.*, 1994; Nicolaou K. C., *et al.*, 1994); de cultivos de células vegetales de *Taxus* (Christen *et al.*, 1989) y de cultivos de microorganismos como: hongos (Stierle A., *et al.*, 1993) y bacterias (Page M., *et al.*, 1996), aisladas generalmente de *Taxus*.

Originalmente el paclitaxel fue aislado de la corteza de *Taxus brevifolia* (tejo del Pacífico), obteniéndose en promedio, 3 Kg de corteza y entre 300 a 400 mg de paclitaxel por árbol. La principal desventaja de éste método es que, el descortezamiento acaba con la vida del árbol y la gran demanda del fármaco acabaría con la especie en poco tiempo.

El método semisintético es actualmente una de las rutas comercialmente viables de producción de Paclitaxel (Jennewein y Croteau, 2001; Frense, 2006). Sin embargo, este método se ve limitado por la extracción de los precursores (10-diacetilbacatina III) del material vegetal que: dependen de la variación significativa en su contenido de taxanos debido a los factores epigenéticos y ambientales; es limitado por el crecimiento lento de los tejos; implica la purificación difícil y costosa de los precursores a partir del tejido vegetal dado las abundantes resinas fenólicas y lípidos que se encuentran en planta.

La síntesis total de Paclitaxel se reportó en 1994 por dos grupos de investigación distintos Holton *et al.*, 1994 y Nicolaou *et al.*, 1994, con rendimientos de producción de 2.7% y 0.07%, respectivamente y que además requieren de más de treinta pasos de reacción, lo cual los hace complejos y costosos. Por lo que, aunque la síntesis total sea un gran logro científico, no es una estrategia viable comercialmente, al menos en el futuro próximo.

En la obtención de cultivo de células de tejo, se han reportado productividades de hasta 23.4 mg/L-día tras la elicitación de un cultivo con metil jasmonato (Ketchum *et al.*, 1999) y porcentajes de paclitaxel de 13-20% en referencia al total del taxanos. En la actualidad la producción comercial de paclitaxel con células vegetales ha sido escalada en biorreactores hasta de 75,000 L (ESCAgenetic en CA, USA; Phyton en NY, USA; Samyang Gebex en Taejon, Korea; y Phyton Biotech en Alemania); (Zhong, 2002; Wink

et al., 2005). Sin embargo, los cultivos de células vegetales, requieren de técnicas complejas y especializadas, además de largos tiempos de incubación y separación (Bringi V., *et al.*, 1993; Cragg G. M., *et al.*, 1991; Ketchum R. E. B., *et al.*, 1999).

1.1.6. Paclitaxel por microorganismos.

En la búsqueda de nuevas fuentes de producción de paclitaxel, Stierle A. y Strobel G., en 1993, aislaron el hongo *Taxomyces andreanae* de la corteza del tejo *Taxus brevifolia*, que producía 24-25 ng/L de paclitaxel (Stierle A., *et al.*, 1993; Stierle A., *et al.*, 1995). Desde esa fecha se han identificado decenas de hongos productores de paclitaxel alrededor del mundo (Strobel G. A., *et al.*, 1996(a); Strobel G. A., *et al.*, 1997; Li J. Y., *et al.*, 1996; Li J. Y., *et al.*, 1998; Wang J., *et al.*, 2000; Ma Y. C., *et al.*, 2003; Guo B. H., *et al.*, 2006(a); Yuan J., *et al.*, 2006), (Tabla 3) y la mayoría de estos hongos han sido aislados de árboles del género *Taxus*, perteneciendo a los ascomicetos o a los hongos imperfectos (Ma Y. C., *et al.*, 2003), y cuyas producciones van de 0.024-0.025 a 60-70 µg/L de medio de cultivo; producidas por *Taxomyces andreanae* y *Pestalotiopsis microspora*, respectivamente (Stierle A., *et al.*, 1993; Strobel G. A., *et al.*, 1996(a)). *Pestalotiopsis microspora* produce más de 1500 veces, y cepas mutadas de *N. silvyforme* aproximadamente 15 000 veces, la concentración de paclitaxel, comparadas con el primer hongo aislado. Se han reportado también, bacterias aisladas de árboles del género *Taxus* con capacidad de producir paclitaxel, en el rango de 0.20 a 2.4 µg/L de medio de cultivo, (Tabla 4) (Page M., *et al.*, 1996; Page M., *et al.*, 2000). Cabe remarcar que, estas dos patentes de Page y colaboradores, son los únicos reportes sobre bacterias hasta la fecha. El paclitaxel producido por estos microorganismos es idéntico química y biológicamente a los producidos por el género *Taxus* (Stierle A., *et al.*, 1993; Page M., *et al.*, 1996). Este hecho es muy importante, ya que abre campos de estudio, tanto en la investigación básica, como en la investigación aplicada. Dentro de la investigación básica, se pueden estudiar las rutas biosintéticas de paclitaxel en hongos y bacterias, las enzimas involucradas en ellas, así como los genes que las codifican (Yuan J., *et al.*, 2006). En la investigación aplicada, existen retos como: el aumento en el rendimiento de paclitaxel producido en los caldos de fermentación, atendiendo, tanto el mejoramiento del proceso (Li J. Y., *et al.*, 1998),

como el mejoramiento de las cepas (Zhao K., *et al.*, 2004; Zhou D., *et al.*, 2005; Page M., *et al.*, 2000), ya que hasta el momento se han obtenido rendimientos del orden de microgramos, lo cual no hace rentable al proceso. Cuando se inicia un proyecto, los niveles de producción del compuesto deseado son generalmente limitados, y para poder llevarlo a niveles comerciales, la productividad de dicho compuesto se debe incrementar en varias órdenes de magnitud, para lo cual se necesitan aplicar simultáneamente diversas estrategias que actúen sinérgicamente para lograr el objetivo. La producción de paclitaxel utilizando microorganismos está en sus inicios, por lo que aún falta investigación para que este proceso llegue a ser rentable. Sin embargo, la producción de paclitaxel por microorganismos, tiene gran potencial debido a que: no se utilizan los árboles de tejo (Stierle A., *et al.*, 1993); las velocidades de crecimiento son mayores, con respecto a células vegetales; los procesos de fermentación de microorganismos están más desarrollados y en el caso de bacterias, se pueden crecer a concentraciones celulares altas (high cell density); los medios de cultivo son simples (Stierle A., *et al.*, 1995; Page M., *et al.*, 1996) y existen más herramientas moleculares para el mejoramiento de cepas, comparando con los cultivos de células vegetales (Long D. A., *et al.*, 1998; Zhao K., *et al.*, 2004; Zhou D., *et al.*, 2005). Esto hace que la producción de paclitaxel por microorganismos, sea una alternativa potencial para cubrir la demanda insatisfecha de paclitaxel, debido al aumento en sus aplicaciones (Young D. H., 1992) y al incremento estable de su demanda en el mercado (Yuan J., *et al.*, 2006).

Tabla 3. Hongos con capacidad de producción de paclitaxel.

Fuente de aislamiento	Hongo	Concentración (µg/L)	Referencia
<i>T. brevifolia</i>	<i>T. andeanae</i>	0.024–0.025	Stierle A., <i>et al.</i> , (1993)
<i>T. wallachiana</i>	<i>Pestalotiopsis. microspora</i>	60–70	Strobel G. A., <i>et al.</i> , (1996)(a)
<i>T. baccata</i>	<i>Monochaetia sp</i>	0.102 (1)	Strobel G.A., <i>et al.</i> , (1996)(b)
<i>T. baccata</i>	<i>Fusarium lateritium</i>	0.130 (1)	Strobel G.A., <i>et al.</i> , (1996)(b)
<i>T. cuspidata</i>	<i>Alternaria sp</i>	0.157 (1)	Strobel G.A., <i>et al.</i> , (1996)(b)
<i>T. cuspidata</i>	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	0.268 (1)	Strobel G.A., <i>et al.</i> , (1996)(b)
<i>T. wallachiana</i>	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	0.500 (1)	Strobel G.A., <i>et al.</i> , (1996)(b)
<i>T. sumatrana</i>	<i>Phitomyces sp</i>	0.095 (1)	Strobel G.A., <i>et al.</i> , (1996)(b)
<i>T. baccata</i>	<i>Pestalotia bicilia</i>	1.081 (1)	Strobel G.A., <i>et al.</i> , (1996)(b)
<i>Wollemia nobilis</i>	<i>P. guepinii</i>	0.481	Strobel G. A. <i>et al.</i> , (1997)
	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	1. 487	Li J. Y., <i>et al.</i> , (1998)
Suelo de bosque de tejos	<i>Pestalotia heterocornis</i>	0.031	Noh, M.J. <i>et al.</i> , (1999)
<i>T. marei</i>	<i>Tubercularia sp.</i>	0.228	Nang, J., <i>et al.</i> , (2000)
<i>T. wallachiana</i>	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	0.025-0.203	Shrestha, K., <i>et al.</i> , (2001)
<i>T. wallachiana</i>	<i>Sporormia minima</i>	0.0157	Shrestha, K., <i>et al.</i> , (2001)
<i>T. wallachiana</i>	<i>Trichothesium sp.</i>	0.165	Shrestha, K., <i>et al.</i> , (2001)
<i>T. cuspidate</i>	<i>Nodulisporium sylviforme,</i>	0.051-0.1257	Zhou D., <i>et al.</i> , (2001).
<i>T. cuspidate</i>	<i>Nodulisporium sylviforme,</i>	418 (2)	Zhou D., <i>et al.</i> , (2005).
<i>T. chiniensis var. marei</i>	BT2	4-7	Guo B. H., <i>et al.</i> , (2006)(b)
<i>T. chiniensis var. marei</i>	<i>Fusarium marei</i>	20 (2)	Xu F., <i>et al.</i> , (2006)

(1) Paclitaxel analizado por inmunoensayo; (2) Cepa mutada. Paclitaxel analizado por HPLC.

Tabla 4. Bacterias con capacidad de producir paclitaxel.

Fuente de aislamiento	Bacteria	Concentración (µ/L)	Referencia
<i>T. canadiensis</i>	<i>Sphingomona taxi</i>	0.20-1.0	US Pat., 5, 561, 055 , 1996
<i>T. canadiensis</i>	<i>Bacillus cereus taxi</i>	0.40-20.0	US Pat., 6, 030, 818, 2000
<i>T. canadiensis</i>	<i>Bacillus megaterium taxi</i>	2.0-24.0	US Pat., 6, 030, 818, 2000

1.1.7. Análisis de paclitaxel.

1.1.7.1. Inmunoensayo.

El inmunoensayo de paclitaxel de inhibición competitiva, utiliza anticuerpos monoclonales antipaclitaxel. El inmunoensayo detecta: arriba de 3.5 ng/mL, es insensible a cefalomanina por debajo de 60 ng/mL e insensible a bacatina III y 10-diacetilbacatina III por debajo de 1000 ng/mL. En este análisis el paclitaxel de la muestra se detecta por la inhibición competitiva que éste ejerce sobre la reacción entre el antígeno, paclitaxel-proteína conjugada de la fase sólida y el anticuerpo anti-paclitaxel. El grado de inhibición, comparado con los controles desinhibidos, se observa por la intensidad de color que resulta de la adición de anti-anti-paclitaxel-fosfatasa alcalina conjugada y su sustrato. Los factores que pueden afectar la reacción inmunoquímica en cada pozo de reacción, son: condiciones físicas externas, principalmente la temperatura, variación en procedimientos experimentales, diferencias en las adsorptividades de diferentes placas y en diferentes pozos de la misma placa, así como variaciones entre los reactivos estándar entre lote y lote de reactivos (Grothaus P.G., *et al.*, 1993).

1.1.7.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplado a espectrometría de masas (MS) (HPLC/MS).

1.1.7.2.1. Extracción en fase sólida.

Para la identificación de paclitaxel en extractos crudos, se necesita aislarlo y purificarlo. Sin embargo, este proceso es frecuentemente largo y laborioso, ya que dichos extractos crudos contienen, generalmente, un gran número de análogos estructurales (Lee M. S., 2001). Una de las técnicas de purificación del extracto, recomendada antes de su análisis es la extracción en fase sólida.

Los extractos crudos de taxoides, obtenidos de árboles de tejo o de cultivos celulares, constituyen una mezcla compleja de componentes en adición al paclitaxel u otros taxoides

(Mattina, M. J. I., *et al.*, 1994). Aunque la selectividad de detección del cromatógrafo de masas permite un pretratamiento de la muestra y una separación cromatográfica menos elaborada, comparada con HPLC-UV, los diferentes constituyentes de la muestra, diferentes a los taxoides, pueden interferir por supresión de iones y es necesario pretratar la muestra, antes de realizar el análisis (Stokvis E., 1997). La extracción en fase sólida (SPE), ofrece alta selectividad y recuperación, con menor consumo de solventes y en tiempos cortos, con lo que se logran mejores costos financieros y ambientales. Theodoridis G., *et al.*, 1998(b), reportó el uso de diferentes empaques comerciales, para el pretratamiento de extractos de cultivos de células vegetales de *Taxus*, realizando esquemas de eluciones selectivas con gradientes de polaridad, en fase reversa; encontrando que los cartuchos C18 (sílica con un grupo octadecil unido) y C8 (sílica con un grupo octal unido), utilizados para extraer compuestos polares o medianamente polares, dieron un porcentaje alto de recuperación de paclitaxel, cuando se eluía con gradientes de polaridad, basados en mezclas de metanol-agua.

1.1.7.2.2. HPLC/MS.

Para la detección de paclitaxel se recomienda un método de análisis rápido, confiable y con alta sensibilidad, ya que este compuesto se encuentra en concentraciones muy bajas en algunos extractos crudos. Se ha utilizado tradicionalmente, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con detector de luz UV (UV) para analizar mezclas de taxanos en extractos de árboles de tejo y cultivos celulares (Dong H. R., *et al.*, 2005, Nguyen T., *et al.*, 2001; Theodoridis G., *et al.*, 1996). Sin embargo, el método de HPLC acoplado a Espectrometría de masas (LC/MS), ha permitido el análisis de muestras con multicomponentes, sin una purificación extensiva (mayor selectividad) y requiriéndose menor cantidad de muestra (mayor sensibilidad), en el análisis de paclitaxel y de taxanos en extractos de árboles de tejo y cultivos celulares (Kerns, E. H., *et al.*, 1994; Kerns, E. H., *et al.*, 1995; Stokvis E., 1997; Theodoridis G., *et al.*, 1998(a), Madhusudanan K. P., *et al.*, 1995, 2002(a) y (b)). Stokvis E., 1997, reporta un patrón de fragmentación propuesto del ión molecular del paclitaxel (Figura 6); las masas del ión molecular del paclitaxel (m/z : 854), el ión molecular sin una molécula de agua (m/z :836), así como los iones de sus aductos de amonio (m/z : 871), sodio (m/z : 876) y potasio (m/z : 892) (Figura 7) y los iones producto de la fragmentación inducida del ión molecular en la celda de colisión (Figura 8). La fragmentación del ión molecular, da como resultado: el ión de la cadena lateral en el C-13 (m/z = 286); el ión producto m/z 569, del esqueleto normal del paclitaxel, así como los iones producidos de la eliminación de agua, ácido acético y ácido benzoico del ión producto m/z 569, principalmente.

Actualmente, el método HPLC/MS, es de primera selección para el análisis cuantitativo de muchos agentes anticancerígenos en muestras biológicas, lo cual ha adicionado la información de masa y patrones de fragmentación, a las mediciones de absorbancia y tiempos de retención obtenidos de HPLC. El ensayo de paclitaxel es sensible a niveles de nanogramos por mL.

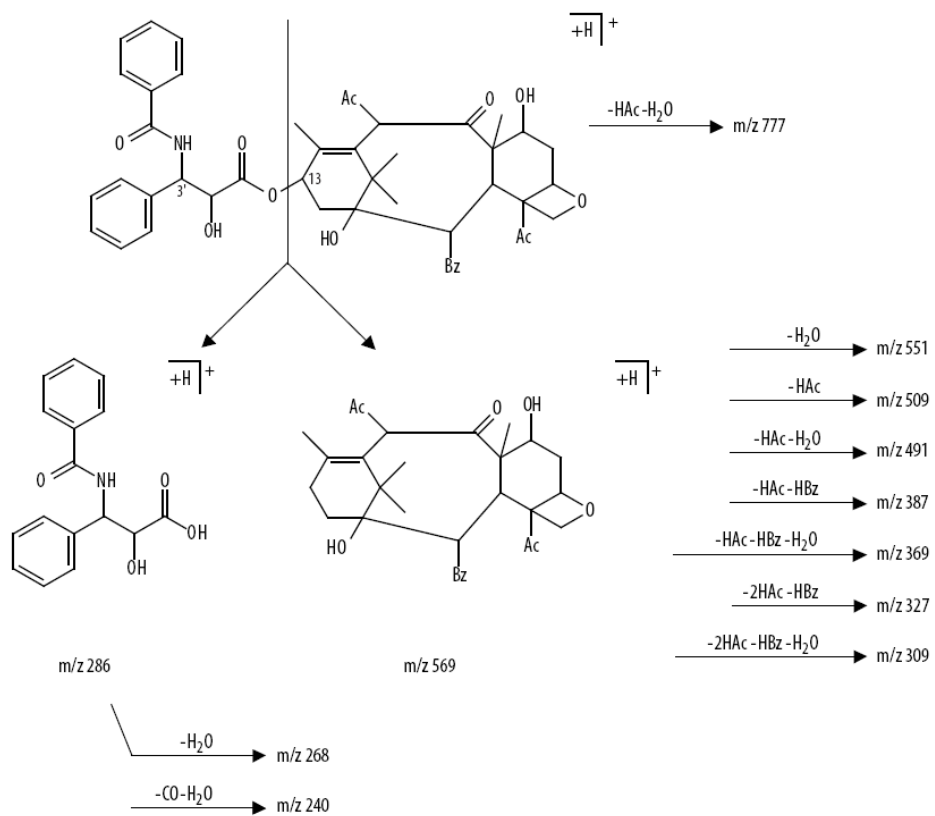


Figura 6. Esquema propuesto de fragmentación de paclitaxel. Ac: Acetato, Bz: Benzoato (Stokvis E., 1997).

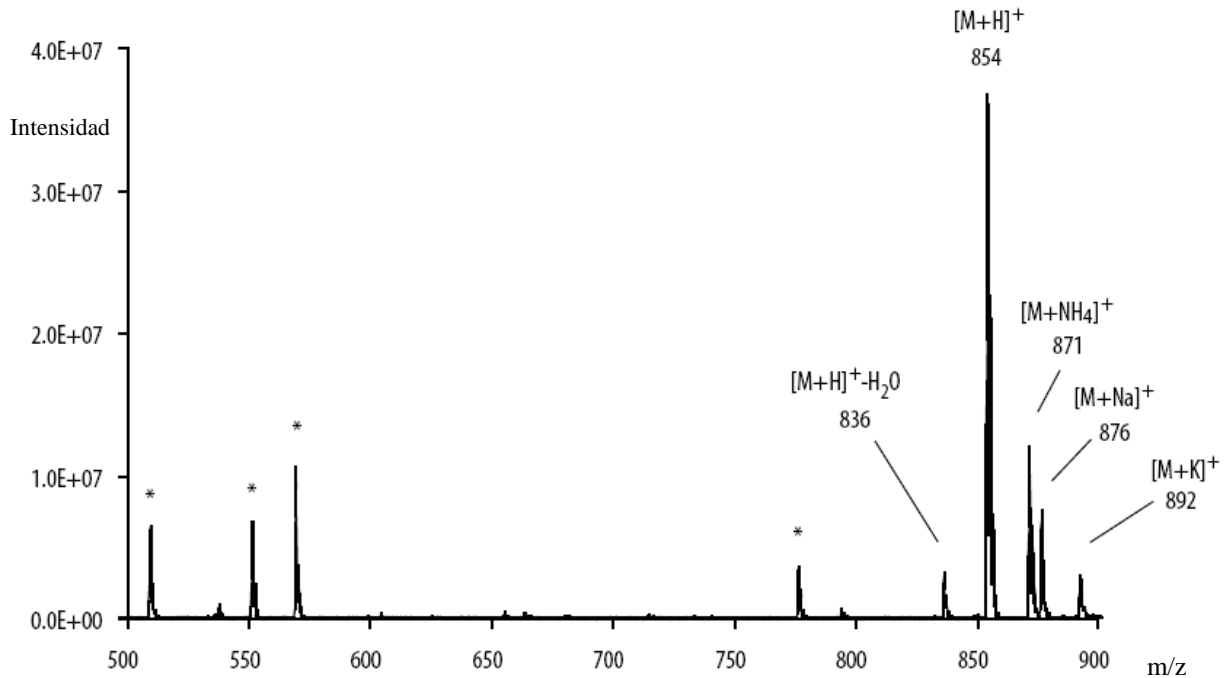


Figura 7. Espectro de masas de paclitaxel por barrido. Los asteriscos representan los iones fragmentados (Stokvis E., 1997).

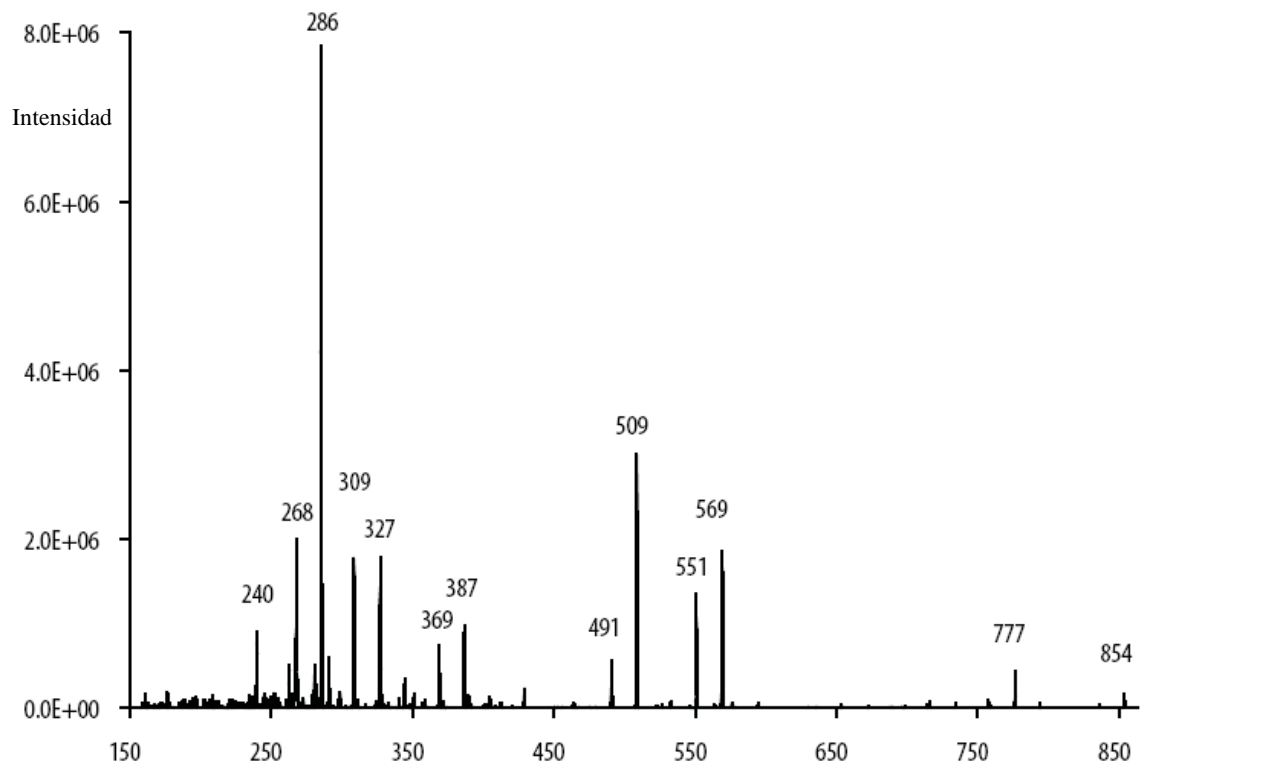


Figura 8. Espectro de masas de iones producto del fraccionamiento de paclitaxel (MS/MS), a partir del ion molecular protonado m/z 854 (Stokvis E., 1997).

1.1.7.3. Genes *dbat* y *bapt* involucrados en la biosíntesis de paclitaxel.

Los genes que codifican para las enzimas 10-diacetilbacatina III 10-O-acetil transferasa (DBAT) y *O*-(3-amino-3-fenilpropanoil) transferasa (BAPT), de la biosíntesis de paclitaxel en *Taxus*, han sido usados como marcadores moleculares para la búsqueda de hongos productores de paclitaxel (Zhang, P., *et al.*, 2008; Zhang, P., *et al.*, 2009). DBAT cataliza la acetilación de 10-diacetilbacatina III a bacatina III, (Walker and Croteau, 2000), el cual es un precursor del paclitaxel y BAPT cataliza la acilación selectiva de la 13-O-acilación de bacatina III con β -fenilalanoil-CoA, como el donador del grupo acilo, para formar N-dibenzoil-20-deoxipaclitaxel (Walker, *et al.*, 2002) (Figura 9).

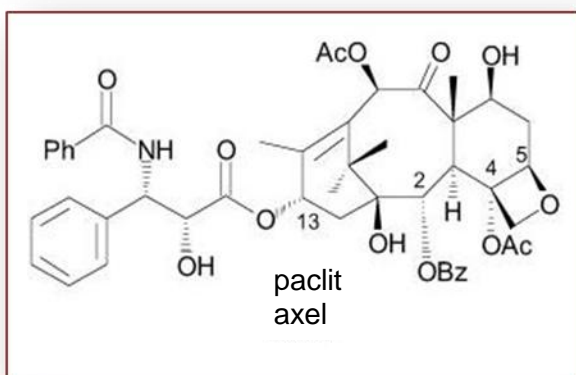
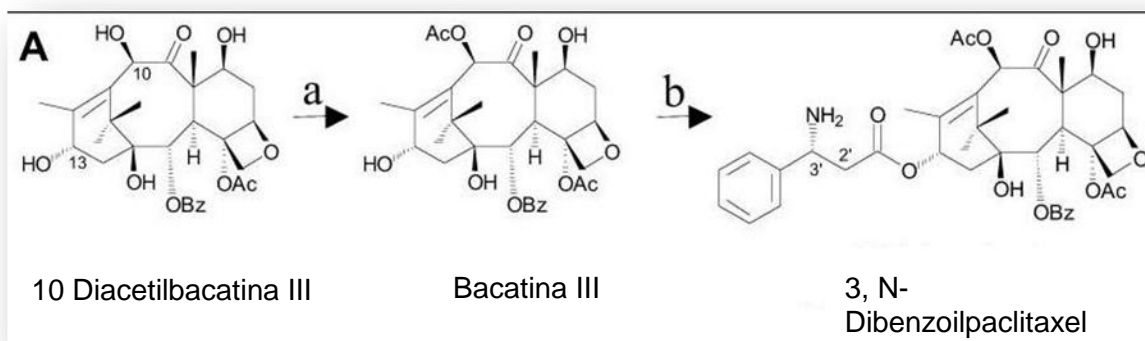


Figura 9. Biosíntesis de paclitaxel ; ilustrando la acetilación de 10-diacetilbacatina III a bacatina III por la enzima 10-diacetilbacatina III O-acetiltransferasa (DBAT) a) y la tranferencia de un grupo aminofenilpropanoil al C-13 de bacatina III por una O-(3-amino-3-fenilpropanoil) transferasa (BAPT) b).

En su trabajo de 2008, Zhang obtuvo 3 de 90 hongos, aislados de *Taxus x media* y *Taxus yunnanensis*, que contenían fragmentos de los genes *dbat* y *bapt* (Zhang, P., *et al.*, 2008). En el 2009, Zhang y colaboradores reportaron la identificación del hongo *Aspergillus candidus* MD3, aislado de *Taxus X media*, el cual contiene el gen *dbat* (Zhang, P., *et al.*, 2009).

1.1.8. Identificación molecular de hongos y bacterias.

Las técnicas que involucran el análisis de los genes ribosomales (rDNA) han revolucionado la taxonomía de los organismos. Estos genes son altamente conservados debido a que: desempeñan un papel fundamental en la síntesis de proteínas, son moléculas universales presentes en todos los organismos celulares, no codifican para proteínas, se establecieron en una etapa temprana de la evolución y no son afectados por los cambios del ambiente de los organismos (Rosello-Mora *et al.*, 2001; Guarro, *et al.*, 1999). El análisis de las secuencias del 16S rDNA y del 26S rDNA, genera valores de similitud que pueden ser usados en la determinación de los límites de un taxa, por ejemplo, un género puede ser definido por especies con un 95 % de similitud en su secuencia del gen 16S rDNA, mientras que microorganismos de una misma especie presentan valores de similitud en su secuencia del gen 16S rDNA mayores al 97%. (Rosello-Mora *et al.*, 2001; Guarro, *et al.*, 1999). Para los casos en los que el poder de resolución del gen 16 rDNA es insuficiente y no delimita correctamente las diferentes especies sería conveniente considerar ampliar el análisis con la secuencia del gen 23S rDNA.

Para el caso de levaduras, el gen 18S rDNA no está recomendado para la identificación de las cepas. Sin embargo el gen 26-28S rDNA e incluso, los espacios intergénicos ribosomales han resultado mucho más fiables (Morales, J.I., 2005). La herramienta “Local Alignment Search Tool” (BLAST), emplea un algoritmo optimizado de búsqueda rápida de secuencias de nucleótidos y proteínas en bases de datos, para alineamientos locales.

JUSTIFICACIÓN

Aún cuando la producción de paclitaxel por vía fermentativa no se ha estudiado detalladamente, esta tecnología potencialmente podría ofrecer importantes ventajas comparada con el cultivo de células vegetales entre las que se pueden citar; los hongos y bacterias crecen rápidamente en medios de cultivo simples, se pueden crecer a concentraciones celulares altas (bacterias), la producción no dependería de material vegetal que puede ser variable en su composición. Adicionalmente, las herramientas moleculares se pueden aplicar fácilmente al mejoramiento de cepas microbianas.

Por otro lado, el tejo mexicano, *Taxus globosa*, es un árbol listado entre las especies raras y protegidas de México, pero además es el menos estudiado de los tejos del mundo. Se han realizado pocos estudios sobre el tejo mexicano, referentes a su contenido de paclitaxel. Tampoco se han reportado estudios de microorganismos con capacidad de producir paclitaxel aislados de éste árbol. Por ello, este trabajo plantea llevar a cabo el aislamiento de hongos y bacterias asociados a *Taxus globosa* del Parque Nacional “El Chico”, en el estado de Hidalgo. En los microorganismos aislados se evaluará su capacidad para producir paclitaxel y los aislados positivos serán identificados taxonómicamente.

Por lo que el propósito de esta investigación es el aislamiento de microorganismos asociados al árbol de Tejo mexicano (*Taxus globosa*), la evaluación de su capacidad de producción de paclitaxel y la identificación molecular de las cepas positivas. Con estos nuevos conocimientos se pretende contribuir al estudio de los microorganismos asociados a *Taxus globosa* con capacidad de producir paclitaxel, como paso inicial en el desarrollo de su producción por vía fermentativa.

Objetivos

Aislar bacterias y hongos asociados al tejo mexicano (*Taxus globosa*), determinar su capacidad de producción de paclitaxel e identificar taxonómicamente los aislados positivos.

- Obtener aislados puros de bacterias y hongos asociados al tejo mexicano del Parque Nacional “El Chico”, Hidalgo, México.
- Determinar mediante inmunoensayo de inhibición competitiva (CIEIA) la capacidad de producción de paclitaxel de las bacterias y hongos aislados.
- Mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), determinar la presencia de paclitaxel en el extracto de cultivo de al menos un aislado positivo al inmunoensayo.
- Mediante la secuenciación y el análisis del gen 16S ribosomal para bacterias y del gen 26S ribosomal para hongos, identificar taxonómicamente las bacterias y hongos positivos a inmunoensayo,

Estrategia experimental

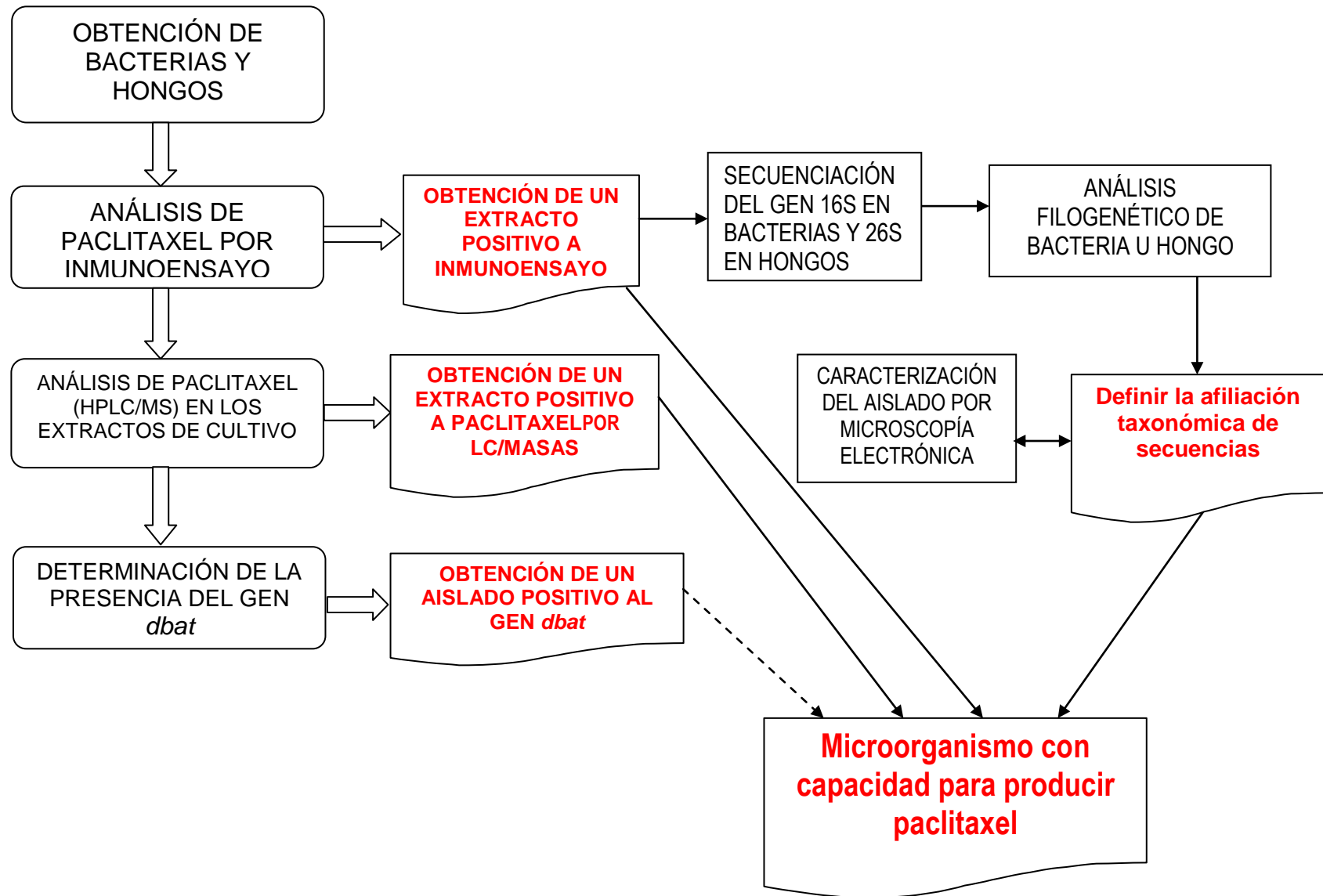


Fig 10. Diagrama general de bloques de la estrategia experimental.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Aislamiento de bacterias y hongos asociados al tejo mexicano.

3.2.1.1. Recolección de muestras de tejo mexicano.

Se localizó un sitio con presencia de tejos, en el Parque Nacional “El Chico”, en el estado de Hidalgo, México. Se recolectaron muestras de diferentes partes de árboles (3) incluyendo hojas (acículas), duramen (tejido interno del tronco), rama, corteza y fruto. Las muestras se colocan en bolsas de polipropileno previamente esterilizadas, que a su vez se colocaron en bolsas negras de plástico ligeramente humedecidas con agua. Las muestras se transportaron inmediatamente al laboratorio, se mantuvieron en refrigeración a 2-5 °C y se procesaron dentro de los tres días siguientes a su recolección.

3.2.1.2. Lavado de las muestras.

Muestras de 10 gramos de diferentes tejidos se lavan con detergente y agua de la llave con la ayuda de un cepillo de cerdas suaves. Las muestras de rama y corteza se rasparon con una espátula afilada hasta eliminar el tejido de células muertas, lo que permitió la aparición del tejido vivo.

3.2.1.3. Aislamiento de hongos.

Las muestras lavadas se introdujeron en una solución de hipoclorito de sodio al 3% o alternativamente en una solución de etanol al 96%, durante 1, 5, 15 o 25 minutos. Posteriormente, se lavaron con agua destilada estéril, y se cortaron en pedazos pequeños con una navaja estéril. Las muestras se colocaron sobre agar-papa-dextrosa (PDA marca Difco) contenido en cajas Petri, y se incuban a 25 °C (Figura 11). Los hongos que crecen sobre o en la periferia de las muestras, se resiembran sucesivamente en PDA, hasta obtener cepas puras. La pureza de cada cepa aislada se comprobó por morfología colonial y microscópica.

3.2.1.4. Aislamiento de bacterias.

Las muestras lavadas se sometieron a alguno de los tratamientos que se describen en seguida (Figura 12).

Tratamiento I. Muestras de aproximadamente 10 g se introdujeron en una solución de hipoclorito de sodio al 3% o alternativamente en una solución de etanol al 70%, en cada caso por 1, 5 o 15 minutos. Las muestras se lavaron con agua destilada estéril, se cortaron en pedazos pequeños (1 cm), se sembraron sobre agar nutritivo (AN), agar R2A (R2A) o agar-cerebro-corazón (BHA, marca Difco) y se incubaron a 25 °C (Page, *et al.*, 2000).

Tratamiento II. Muestras de aproximadamente 5 g se limpiaron superficialmente con etanol al 95%, se cortaron en pedazos pequeños y se homogenizaron en una licuadora con 95 mL de agua destilada estéril. La suspensión se dejó reposar por una o 24 horas antes de utilizar el sobrenadante como inóculo. Se distribuyó 0.1 mL de la suspensión sobre la superficie de AN, R2A y BHA con la ayuda de una varilla de vidrio flameada y se incubó a 25 °C.

Tratamiento III. Muestras de duramen, sin lavar o lavadas con agua destilada estéril, se colocaron sobre la superficie de AN, R2A y BHA, y se incuban a 25 °C.

Las bacterias que crecen sobre o en la periferia de las muestras se resembraron sucesivamente en los mismos medios hasta obtener cepas puras. La pureza de cada cepa aislada se comprobó por morfología colonial y microscópica.

3.2.1.5. Conservación de hongos en agua estéril a 2-5 °C.

Cada hongo se creció a 25 °C en cajas Petri conteniendo PDA, hasta obtener un crecimiento de 3-5 cm de diámetro. Se cortaron cilindros de la periferia del crecimiento, utilizando el extremo romo de una pipeta Pasteur estéril. Cinco cilindros se depositaron dentro de un vial con 2 mL de agua destilada estéril. Después de cerrar y sellar los viales con Parafilm, se almacenaron en refrigeración a 2-5 °C (Burdsall, H. *et al.*, 1994).

3.2.1.6. Conservación de bacterias en glicerol al 10 %.

A 25 mL de caldo nutritivo (CN, marca Difco) contenidos en un matraz Erlenmeyer de 125 mL se le adicionó una asada del crecimiento de la bacteria. Se incubó a 25 °C y 120 revoluciones por minuto (rpm) en una incubadora Innova 4330 marca New Brunswick scientific, hasta observar crecimiento. Todo el caldo de cultivo se centrifugó por 15 minutos a 6000 rpm. El paquete celular se resuspendió agitando en vortex por 30 segundos en 2.5 mL de glicerol estéril al 10%, después se centrifugó por 15 minutos a 6000 rpm. El procedimiento anterior se repitió dos veces, el paquete celular, se resuspendió finalmente en 2.5 mL de glicerol estéril al 10% y se colocan alícuotas de 0.8 mL de la suspensión bacteriana en cada uno de 3 tubos para criogénesis. Los tubos se introdujeron en nitrógeno líquido, hasta que el contenido se congeló y se almacenaron a -70 °C. Nota: Mantener las células a 4 °C, después de eliminar el medio de cultivo y hasta antes de congelar.

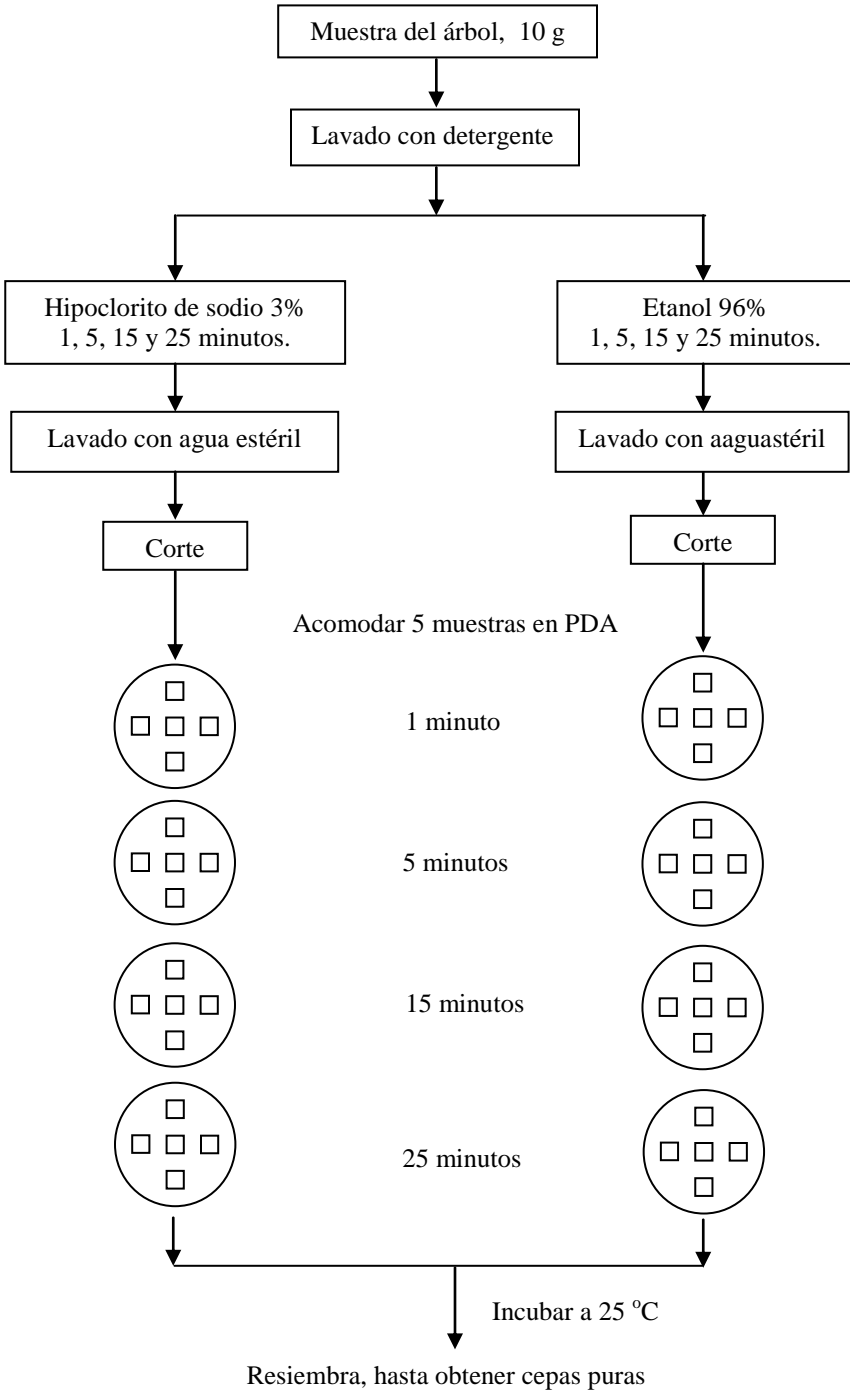


Figura 11. Aislamiento de hongos

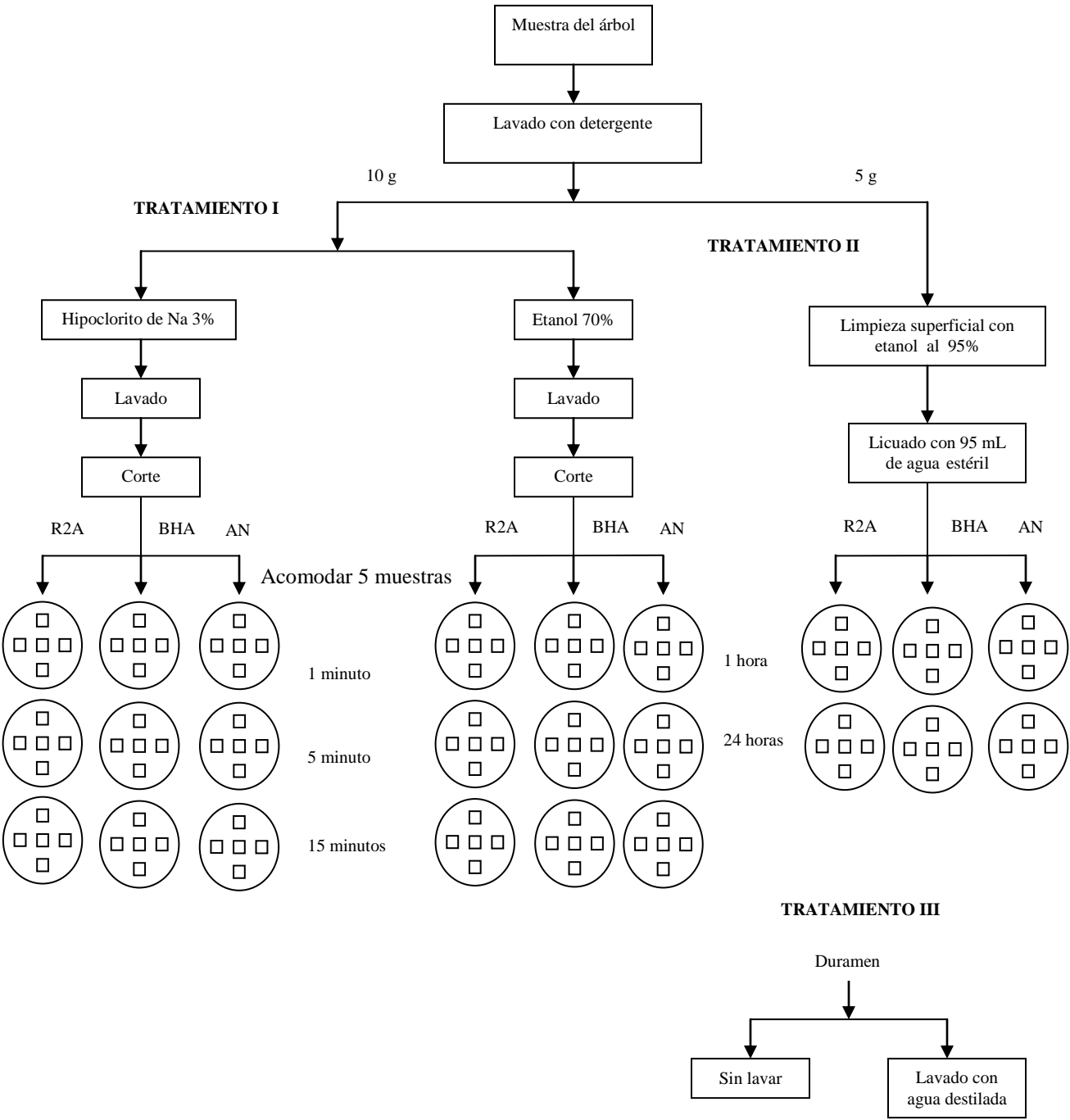


Figura 12. Aislamiento de bacterias

3.2.2. Cultivo de hongos.

Matraces Erlenmeyer de 250mL conteniendo 100 mL de medio líquido M1D, se inocularon con un trozo de agar PDA de 0.5 x 0.5 cm con el crecimiento del hongo (Strobel, *et al.*, 1996; Strobel, *et al.*, 2001). El medio M1D contenía en (g/l): glucosa 1.0, fructosa 3.0, sacarosa 6.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.36, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.65, extracto de levadura 0.5, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0025, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.0005, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.002, fenilalanina 0.005, acetato de sodio 1.0 y benzoato de sodio 0.050, así como solución amortiguadora de fosfatos (pH 6.8) 1 mL/L. La incubación se llevó a cabo a 25 °C y 40 rpm por 20 días en una incubadora Water-bath shaker, Eberbach Corporation USA.

3.2.3 Cultivo de bacterias.

Matraces Erlenmeyer de 125 mL conteniendo 5 mL de caldo nutritivo, se inocularon con una asada de la suspensión bacteriana congelada a -70 °C y se incubaron a 25 °C y 120 rpm por 24 h. Medio mL de este cultivo se usó para inocular matraces Erlenmeyer de 25mL con 100 mL de medio líquido S-7. Los matraces se incubaron a 25 °C y 120 rpm por 2-4 días, en una incubadora Innova 4330, New Bruswick Scientific. El medio S-7 contiene en (g/L): Glucosa 1.0, fructosa 3.0, sacarosa 6.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0036, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.0065, extracto de levadura 0.5, peptona de soya 1.0, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0025, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.005, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.002, fenilalanina 0.005, acetato de sodio 1.0 y benzoato de sodio 0.1, así como solución amortiguadora de fosfatos (pH 6.8) 1 mL/L, (Page, Michael, *et al.*, 2000).

3.2.4 Preparación de extractos de hongos.

Los extractos se obtuvieron a partir de 300 mL de caldo de cultivo de cada hongo aislado, que se homogenizaron con 180 mL de una mezcla cloroformo/metanol (10:1, v/v, J.T.Baker) en una licuadora Osterizer por 5 minutos. La mezcla se centrifugó a 6000 rpm por 15 minutos. La fase clorofórmica se recuperó y se evaporó hasta sequedad, en un rotavapor Büchi R-200/20 con temperatura del baño de 40°C, temperatura de vapor 30°C y presión de vacío 390 mbar. El extracto se disolvió en 3 mL de mezcla cloroformo-metanol 10:1 v/v y se transfirió a un vial ambar de 7 mL. El vial se colocó en baño María a 35 °C y el solvente se evaporó en atmósfera de nitrógeno. El vial una vez cerrado y sellado con Parafilm, se guardó en refrigeración a 4-7 °C hasta su análisis.

3.2.5 Preparación de extractos de bacterias.

Los extractos bacterianos se obtuvieron a partir de 500 mL de caldo de cultivo que se homogenizaron con 300 mL de mezcla cloroformo-metanol 10:1 v/v. Después se siguió el mismo procedimiento que se describió en el caso de los extractos de hongos.

3.2.6 Inmunoensayo para paclitaxel.

El extracto orgánico del cultivo de cada hongo y bacteria, se disolvió en 0.5 mL de solución amortiguadora PBS-T-M que contiene: albúmina de suero bovino (BSA) 0.25 %, tween 20 0.05% (v/v), metanol 20% (v/v) y azida de sodio 0.02%. La solución se analizó mediante inmunoensayo enzimático de inhibición competitiva (CIEIA), para detectar la presencia de paclitaxel. Se usó el kit TA02 de la compañía Cardax Pharmaceuticals de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La absorbancia se midió en un lector de placas modelo 680-Biorad (USA).

3.2.7. Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (LC-MS).

Extractos de cada bacteria u hongo positivo a inmunoensayo, se analizaron por LC-MS, para detectar la presencia de paclitaxel. En este caso, los extractos se obtuvieron de cultivos de 2 a 4 L, siguiendo el mismo procedimiento que se describió anteriormente para los extractos analizados por inmunoensayo.

4 Cromatografía por extracción en fase sólida (SPE).

Previo a los análisis LC-MS, cada extracto se limpió mediante cromatografía por extracción en fase sólida (SPE) utilizando el método reportado por Theodoridis *et. al.*, 1998. Brevemente, una minicolumna C18 (500 mg/4 mL, Alltech), se acondicionó haciéndole pasar sucesivamente 2.5 mL de metanol grado HPLC (Burdick & Jackson) y 2.5 ml de agua inyectable (marca Pisa). En cada caso, se cuidó mantener una capa de 5 mm de solvente remanente sobre la superficie del empaque. Por otro lado, el extracto se reconstituyó en 1 mL de metanol grado HPLC (Burdick & Jackson), agitando con vortex por 2 minutos y sonicando por 3 minutos. De la solución resultante se tomó 0.5 mL y se mezclaron con 4.5 mL de agua, para obtener una mezcla del extracto en 10% de metanol. Los 5 mL de la mezcla anterior se pasan a través de la minicolumna para adsorber los taxanos. En seguida se pasaron 1.5 mL de agua (2 veces) y la columna se secó al vacío por 20 minutos (15 Psi). Los taxanos se eluyeron adicionando 2.5 mL de metanol, dos veces, teniendo cuidado de dejar 5 mm de líquido remanente sobre la superficie del empaque. Los extractos purificados se recolectaron en un vial ámbar de 7 mL, y se secaron en baño María a 35 °C y en atmósfera de nitrógeno. El vial, bien cerrado y sellado con Parafilm, se guarda en refrigeración a 4-7 °C, hasta su análisis por LC-MS.

5 LC-MS.

Para este análisis, se utilizó un equipo Agilent 1100 Series LC/MSD, con el Software: ChemStation (G2710BA).

La columna usada fue una Discovery HS F5 (15 cm x 2.1 mm diámetro interno, con partículas de 3 µm de sílica gel con grupos pentafluorofenilpropil (marca SUPELCO). La fase móvil usada fue una mezcla: A) acetato de amonio grado reactivo 10 mM (pH 6.8, sin ajustar, Sigma Aldrich), en agua desionizada y B) acetonitrilo grado HPLC

(Burdick & Jackson). El flujo de la fase móvil fue de 0.2 mL/min y se utilizó el siguiente gradiente:

Tiempo (min)	% A	% B
0	65	35
26	50	50
30	50	50
32	65	35

Donde: A) Acetato de amonio 10 mM y B) Acetonitrilo.

Se usó un detector de arreglo de diodos UV a 227 nm.

Para el análisis MS se utilizó ionización por Electro spray (ESI) en modo positivo (+).

Se utilizó una mezcla estándar de 13 taxanos (13-Taxane HPLC Mixture, Hauser Pharmaceutical Services), para establecer las condiciones de la separación de la mezcla. El estándar es una mezcla de 10- deacetilbacatina III, bacatina III, 10-deacetil-7-xilosilpaclitaxel B, taxinina M, 10-deacetil-7-xylosilpaclitaxel, 10-deacetil-7-xilosilpaclitaxel C, cefalomanina, paclitaxel, paclitaxel C, 10-deacetilpaclitaxel, 7-xilosilpaclitaxel, 10-deacetil-7-epipaclitaxel, 7-epi-paclitaxel, a una concentración de 50 µg/mL de cada taxano, en metanol con 0.1% de ácido acético. La concentración del estándar de los 13 taxanos, se ajusta a 2.5 ng/µL usando una mezcla acetato de amonio 10 mM: acetonitrilo (50:50). En cada inyección del estándar se aplicaron 25 ng de cada taxano, en un volumen de 10 µL.

Los extractos de hongos y bacterias, se resuspenden en 200 µL de mezcla acetato de amonio 10 mM : acetonitrilo (50:50, v/v). Los extractos se filtran a través de membranas de teflón de 0.25 µm de diámetro de poro y se analizan por HPLC-MS, para determinar la presencia de paclitaxel.

3.2.3. Identificación taxonómica de las bacterias y hongos positivos al inmunoensayo.

3.2.3.1. Análisis morfológico.

Bacterias.

Los aislados bacterianos se sembraron en agar nutritivo, por estría cruzada, se incubaron a 25 °C por 24-48 horas y se realizó la descripción morfológica colonial. La morfología microscópica se determinó utilizando tinciones de Gram.

Hongos.

Para a descripción morfológica colonial, los aislados fúngicos se cultivaron a 25 °C por 5-10 días en medio PDA. La morfología microscópica se realizó mediante la observación de microcultivos en PDA preparados por la técnica de Ridell, R. W., 1950.

Extracción de DNA de bacterias.

Las bacterias se cultivaron durante 48 a 72 hrs en 25 mL de medio líquido S-7 a 22 °C y 120 rpm. Se colocó 1 mL del cultivo en tubos Eppendorff y se centrifugaron a 10000 rpm por 3 minutos para obtener el paquete celular. La extracción del DNA se realizó mediante el kit DNAeasy Blood & Tissue (Qiagen No. 69506), siguiendo el protocolo del fabricante. Para determinar la calidad del DNA, las bandas obtenidas en un gel de agarosa al 1%, se tiñeron con bromuro de etidio y se observaron bajo luz ultravioleta (UV) empleando un transiluminador marca Biorad (USA).

Amplificación del gen 16S rDNA.

La región del 16S rDNA se amplificó con los oligonucleótidos universales 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) y 1492 (TACGGYTACCTTGTTACGACTT) (Edwards *et al.*, 1989). La mezcla de reacción se preparó a un volumen final de 25 µL, utilizando 12 µL de la mezcla de reacción Taq PCR Master Mix (Qiagen No. 201443), 1.0 µL por c/Iniciador (10 µM), y 1.0 µL DNA molde (50-100 ng). Las condiciones de amplificación

fueron: 5 minutos a 94 °C; 35 ciclos (1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 57 °C, 1 minuto a 72°C); 5 minutos a 72 °C.

Los amplicones se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.0 %, a 110 V durante 20 min y se tiñeron con bromuro de etidio 0.5 µg/mL para su visualización con luz UV utilizando un transiluminador Biorad.

Purificación del DNA.

Los amplicones, se purificaron mediante el QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen No. 28706) siguiendo el protocolo del fabricante.

Cuantificación del DNA.

Se leyó la absorbencia a 260 nm, de una muestra purificada de DNA, diluyendo 1:61 con agua. Una unidad de Absorbencia a 260 nm, equivale a una concentración de 50 µg/mL.

Secuenciación del DNA.

Los productos de PCR purificados se secuenciaron en el Cinvestav (Unidad de Irapuato).

6 Aislados fúngicos.

Extracción del DNA.

Los hongos se cultivaron en caldo papa dextrosa a 25 °C. El micelio se recuperó por centrifugación y el DNA total se extrajo con el DNeasy Plant Minikit, de Qiagen (USA).

Amplificación de la región D1/D2 del 26S rDNA.

Se amplificaron por PCR 500-600 pb de la región D1/D2 del 26S rDNA usando los iniciadores: FEPJL (5'-CAT ATC AAT AAG CGG AGC AAA AG-3') y REPJL (5'-GCT CCG TGT TTC AAG ACG-3'), (Fell, J. W., 1993). La PCR se realizó en un volumen de 25 µL: 1 µL (5 ng) de DNA molde, 12.5 µL de HotStar Taq Master Mix y 1 µL de cada iniciador (0.4 pM). Las condiciones de la amplificación fueron: 15 minutos a 95 °C; 35 ciclos (1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 58 °C, 1 minuto a 72 °C) y 10 minutos a 72 °C.

Los amplicones se separaron por electroforesis, en geles de agarosa al 1.0 %, que se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 µg/mL), para su visualización en un transiluminador Biorad (USA).

Amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2.

Fragmentos de entre 500 y 600 pb de la región ITS1-5.8S-ITS2 se amplificaron con los iniciadores ITS5F (TCCTCCGCTTATTGATATGC) e ITS4R (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAG) (White, *et al.*, 1990). La PCR se realizó en un volumen de 25 µL: 1 µL (5 ng) de DNA molde, 12.5 µL de HotStar Taq Master Mix marca Qiagen, 9.5 µL de agua destilada inyectable estéril de ampollitas (Pfizer) y 1 µL de cada iniciador (10 mM). Las condiciones de la amplificación fueron: 15 min a 95 °C; 35 ciclos (1 min a 94 °C, 1 min a 57 °C, 1 min a 72 °C) y 10 min a 72°C. Los amplicones se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.0 %, a 110 V durante 20 min y se tiñeron con bromuro de etidio 0.5 µg/mL como ya se describió.

Purificación del DNA.

Los amplicones se purificaron mediante el QIAquick gel extraction kit de Qiagen (USA), siguiendo el protocolo del fabricante.

Cuantificación del DNA y secuenciación.

Se llevó a cabo como ya se describió arriba para bacterias

Las secuencias de hongos fueron alineadas, con secuencias depositadas en la base de datos del NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information) con las que presentaron la mayor similitud. Por separado, las secuencias de bacterias fueron alineadas con secuencias de la base de datos The Ribosomal Database Project (RDP) y con secuencias de la base de datos del NCBI. Los parámetros de alineamiento utilizados, después de haber ensayado varias alternativas, fueron: apertura del hueco 15.00, apertura de extensión 6.66, divergencia de la secuencia 30% y peso de transición del DNA 0.50. Los ejercicios de alineamiento se llevaron a cabo con el programa Clustal X (versión 1.8) (Thompson y col., 1997).

Una vez obtenidos los alineamientos finales, las secuencias fueron analizadas visualmente para localizar posiciones nucleotídicas ambiguas. Ya editadas, se realizó un segundo alineamiento a partir del cual se cortaron los extremos para dejar a las secuencias de una misma longitud con el programa Seaview (Galtier y col., 1996).

Posteriormente, se estimó el modelo de sustitución nucleotídica mediante el programa jModeltest (Posada, 2008), para cada uno de los grupos (hongos y bacterias) por separado. El análisis de máxima verosimilitud fue realizado empleando el programa PhyML [<http://atgc.lirmm.fr/phyml/>] Guindon and Gascuel, 2003). La robustez del árbol fue valorada por medio de la prueba del Bootstrap mediante 1000 replicas. Como grupo externo del phylum Ascomycota fue utilizado *Capronia mansoni*, para el phylum Basidiomycota fue *Auricularia polytricha* y para las bacterias *Desulfurobacterium thermolithotrophum*.

Finalmente, se estimó la similitud pareada de los aislados contra las secuencias de referencia con las cuales se asociaron en el árbol filogenético, para definir la afiliación taxonómica de las secuencias problema. La matriz de similitud se estimó mediante un alineamiento dinámico óptimo por el método de Myers y Miller (Myers and

Miller, 1981) implementado en el programa MatGat versión 2.1 (Campanella y col., 2003).

ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Las secuencias obtenidas se editaron con el programa FinchTV versión 1.4, y se compararon con las secuencias depositadas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information, GENBANK), empleando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Zheng y col., 2000). Las secuencias se alinearon con las secuencias del Genbank de mayor similitud, usando el programa CLUSTALX versión 2 (Larkin, M.A y col., 2007). Los alineamientos se editaron manualmente con el programa SeaView (Galtier y col.,1996). El modelo de sustitución nucleotídica se determinó mediante el programa jModel Test 0.1.1 (Posada, 2008). La reconstrucción filogenética se realizó mediante un análisis de máxima verosimilitud empleando el programa PHYML versión 3.0 (Guindon y col., 2003). La robustez de los árboles obtenidos fue valorada por medio de la prueba del Bootstrap, realizando 1000 permutaciones. El porcentaje de similitud nucleotídica se obtuvo mediante el programa MatGAT versión 2.0 (Myers y Miller,CABIOS, 1989).

3.2.3.2. Identificación taxónomica.

Se obtuvieron y analizaron las secuencias de aproximadamente 1500 pb del 16S rDNA de los aislados bacterianos, así como las 500-600 pb de las regiones D1/D2 del 26 rDNA y ITS1-5.8S-ITS2 de los aislados fúngicos.

Resultados

4.1.1 Aislamiento de bacterias y hongos asociados a árboles de tejo mexicano.

4.1.1.1. Recolección de muestras de árboles de tejo (*Taxus globosa*).

La recolección se llevó a cabo el 18 de Octubre de 2005, en el paraje “Dos Aguas”, del Parque Nacional “El Chico”, ubicado en el municipio de Mineral del Chico en Pachuca, Hidalgo, México, a una altitud de 2700 m. En este lugar se encuentran cañadas sombreadas, frías y húmedas, condiciones en las que crece el árbol de tejo. Se seleccionaron 3 árboles, (marcados como T-11, T-27 y T-29), cuyos diámetros, medidos a una distancia de un metro de su base, fueron mayores a 120 cm. El diámetro de los árboles, fueron: T11: 226 cm, T27: 133 cm y T29: 154 cm. De cada árbol se recolectaron muestras de hoja, rama, corteza y raíz. Las muestras se trasladaron al laboratorio y se guardaron en refrigeración a 2-5 °C, y se utilizaron en los días siguientes a su recolección.

4.1.1.2. Aislamiento de bacterias.

Un total de 297 aislados bacterianos se obtuvieron con los 3 tratamientos: 154 (51.9%), 135 (45.4%) y 8 (2.7%) con los tratamientos I, II y III respectivamente. Los resultados del aislamiento de bacterias se muestran en las tablas 5, 6 y 7.

Tratamiento I. Ciento cincuenta y cuatro aislados de bacterias se obtuvieron siguiendo el tratamiento I (Tabla 1). Ciento treinta y cinco de estos aislados (87.66%), resultaron de muestras tratadas con etanol al 70% y 19 (12.33%) de muestras tratadas con cloro al 3%. Este resultado indica que el aislamiento de bacterias se favoreció con el tratamiento con etanol al 70% comparado con el de hipoclorito de sodio al 3%. Por otro lado, 49 (31.8%), 70 (45.6%) y 35 (22.6%) de los aislados, se obtuvieron a tiempos de tratamiento de: 1, 5 y 15 minutos, lo cual indica que no hay relación entre el número de aislados y el tiempo de tratamiento. En cuanto al tipo de tejido vegetal, cincuenta y cinco (35.7%), 42 (27.3%) y 57 (37%) aislados, fueron de hoja, corteza y rama respectivamente, y

tampoco se observó una relación entre el número de aislados y el tipo de tejido vegetal.

Tabla 5. Aislados bacterianos de muestras del árbol *Taxus Globosa* No. 27, utilizando el tratamiento I: (cloro al 3% ó etanol al 70% durante: 1, 5 ó 15 minutos. Medios de cultivo: M1= R2A, M2=BHA y M3=AN).

TRATAMIENTO I																				
Tiempo de tratamiento	1 minuto			5 minutos			15 minutos			Subtotales						Totales				
Medio de cultivo	M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3	1 min	5 min	15 min	Hipoclorito 3%	Etanol 70%			
Tejido / Tratamiento																				
Hoja / Cloro 3%	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	(5.3%)			
Hoja / Etanol 70%	4	6	5	7	5	8	7	6	6	18	17	19	15	20	19		54	(40%)		
Subtotales/Hoja										18	18	19	16	20	19			55	(35.7%)	
Corteza / Cloro 3%	0	1	2	1	0	2	1	0	0	2	1	4	3	3	1	7	(36.8%)			
Corteza / Etanol 70%	2	5	4	7	4	9	0	3	1	9	12	14	11	20	4		35	(26%)		
Subtotales/Corteza										11	13	18	14	23	5			42	(27.3%)	
Rama / Cloro 3%	0	3	1	0	3	0	0	2	2	0	8	3	4	3	4	11	(57.9%)			
Rama / Etanol 70%	5	6	4	8	6	10	3	1	3	16	13	17	15	24	7		46	(34%)		
Subtotales/Rama										16	21	20	19	27	11			57	(37%)	
Subtotales/Medio										45	52	57								
										(29.2%)	(33.8%)	(37%)								
Subtotales/minutos													49	70	35					
													(31.8%)	(45.6%)	(22.7%)					
Subtotales/desinfectante																19	135			
																(100%/12.3%)	(100%/87.7%)			
																			154	(100%)

Tratamiento II. Ciento treinta y cinco aislados bacterianos se obtuvieron cuando se utilizó el tratamiento II (Tabla 2). Ochenta y cuatro (61.4%) y 51 (38.6%) de estos aislados, resultaron cuando las muestras se incubaron por 1 y 24 horas respectivamente. Estos resultados indican que la población bacteriana cultivable,

fue mayor cuando las muestras se incubaron por una hora, comparada con la obtenida cuando se incubaron por 24 horas. Particularmente, el número de aislados obtenidos de diferentes tejidos de tejo, después de 1 y 24 horas de incubación fueron: de hoja: 37 (63.8%) y 21 (36.2%); de corteza: 17 (81%) y 4 (19%); de rama: 24 (49%) y 25 (51%); y de duramen: 6 (85.7%) y 1 (14.3%). El número de aislados obtenido de rama fue prácticamente del 50% después de incubar por 1 y 24 horas, mientras que el obtenido de los tejidos restantes, fue mayor después de incubar por una hora, respecto a 24 horas de incubación.

De los 135 aislados totales, 58 (43%), 49 (36.3%), 21 (15.6%) y 7 (5.1%) se obtuvieron de hoja, rama, corteza y duramen respectivamente. El menor número de aislados se obtuvo de duramen, el cual, es un tejido interno que no está expuesto directamente al medio ambiente. El mayor número de aislados se obtuvo de hoja, seguido del obtenido de rama y tronco. Una explicación posible de este resultado, es que las hojas únicamente se limpiaron con etanol al 95%, mientras que la rama y la corteza, además de limpiarse con etanol al 95%, se rasparon hasta eliminar el tejido de células muertas y se permitió la aparición de tejido vivo, en el cual se espera un menor número de microorganismos.

En cuanto al medio de cultivo, se obtuvieron: 37 (27.4%), 54 (40%) y 44 (32.6%) aislados en los medios R2A, BHA y AN respectivamente. La diferencia entre el número de aislados obtenidos en los 3 medios es de ± 8.5 . No se observó una relación entre el medio de cultivo empleado y el número de aislados obtenidos.

Tabla 6. Aislados bacterianos de muestras del árbol *Taxus Globosa* No. 27, utilizando el tratamiento II, (limpieza con etanol al 95%, homogenización con agua e incubación por 1 ó 24 horas a temperatura ambiente. Medios de cultivo: M1= R2A, M2=BHA y M3=AN).

Tratamiento II												
Tiempo de incubación	1 hora			24 horas						1 hora	24 horas	Total
	M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3			
Hoja	16	8	13	5	13	3	21	21	16	37 (63.8%)	21 (36.2%)	58 (100%/ 43%)
Corteza	5	7	5	1	1	2	6	8	7	17 (81%)	4 (19%)	21 (100%/ 15.6%)
Rama	3	14	7	6	6	13	9	20	20	24 (49%)	25 (51%)	49 (100%/ 36.3%)
Duramen	1	4	1	0	1	0	1	5	1	6 (85.7%)	1 (14.3%)	7 (100%/ 5.1%)
	25	33	26	12	21	18						

Subtotales/Medio						37 (27.4%)	54 (40%)	44 (32.6%)			
Subtotales/horas									84 (61.4%)	51 (68.6%)	
Aislados Totales:											135 (100%)

Tratamiento III.

Se obtuvieron 8 aislados de duramen con el tratamiento III (Tabla 3). Cuatro (50%) de estos aislados fueron de muestra de duramen sin enjuague y 4 con enjuague con agua destilada estéril. De los 8 aislados, 2 (25%), 2(25%) y 4 (50%) se obtuvieron en los medios M1, M2 y M3 respectivamente. El número de aislados en el medio M3 es el doble respecto al obtenido en los medios M2 y M3.

El número de aislados: total, en cada medio de cultivo y en duramen con enjuague y sin enjuague, no son suficientes para afirmar que el medio M3 favoreció a la obtención de aislados o que el enjuague de la muestra no tuvo efecto en el número de aislados obtenidos de duramen, es necesario realizar repeticiones del aislamiento, para llegar a alguna conclusión.

Tabla 7. Aislados bacterianos de muestras del árbol *Taxus Globosa* No. 27 utilizando el tratamiento III (Duramen sin lavar y lavado con agua destilada estéril. Medios de cultivo: M1= R2A, M2=BHA y M3=AN).

Tratamiento III				
Tejido / Medio	M1	M2	M3	Aislados
Duramen con Enjuague	1	1	2	4 (50%)
Duramen sin Enjuague	1	1	2	4 (50%)
Subtotales/Medio	2 (25%)	2 (25%)	4 (50%)	
Aislados totales:				8 (100%)

4.1.1.3. Aislamiento de hongos

Se obtuvo un total de 119 aislados de hongos de las muestras de los árboles T-11 y T-29 (Tabla 4). Ciento quince (96.5%) de estos aislados resultaron de muestras tratadas con alguno de los dos desinfectantes; y 4 (3.4%) de fruto enjuagado con agua destilada. El número de aislados / muestra / tratamiento estuvo en el rango de 2 a 11, y el número de aislados (4) obtenidos de fruto (1 muestra / 1 tratamiento) estuvo dentro de este rango. De los 115 aislados de muestras tratadas con alguno de los dos desinfectantes, setenta y seis (66%) se obtuvieron de muestras tratadas con hipoclorito de sodio al 3% y 39 (34%) de muestras tratadas con etanol al 70%. Particularmente, el número de aislados obtenido de diferentes tejidos vegetales, después del tratamiento con hipoclorito de sodio al 3% y etanol al 70% fue: de rama: 25 (64.1%) y 14 (35.9%); de hoja: 20 (62.5%) y 12 (37.5%); de corteza: 31 (70.5%) y 13 (29.5%) respectivamente. Estos resultados indican, que el número de aislados de hongos se favoreció con el tratamiento de los tejidos vegetales con hipoclorito de sodio al 3%. En cuanto al tiempo de tratamiento con los desinfectantes, el número de aislados fue: 31 (25%), 34 (23.5%), 28 (23.5%) y 22 (18.5%) a 5, 10, 15 y 25 minutos. No se observó relación entre el número de aislados y el tiempo de tratamiento. En lo que se refiere al tejido vegetal, el número de aislados con los dos desinfectantes fué: de rama: 39 (33.9%); de hoja: 32 (27.8%) y de corteza: 44 (38.2%). Tampoco se observó relación entre el número de aislados y el tipo de tejido vegetal.

Tabla 8. Hongos aislados de las muestras de los árboles de *Taxus Globosa* No. 11 y No. 29, tratadas con cloro al 3% o etanol al 96% a los: 1, 5, 15 y 25 minutos. El fruto únicamente se enjuagó con agua destilada. El medio para aislamiento fué PDA.

Tiempo de tratamiento	Subtotales				Subtotales/Tejido	
	1 minuto	5 minutos	15 minutos	25 minutos	Hipoclorito 3%	Etanol 70%
Tratamiento						
Tejido /Tratamiento						
Rama / Hipoclorito 3%	8	6	6	5	25 (64.1%)	
Rama / Etanol 70%	4	4	4	2		14 (35.9%)
Subtotales/Rama	12	10	10	7		39 (100% / 33.9%)
Hojas / Hipoclorito 3%	6	7	4	3	20 (62.5%)	
Hojas / Etanol 70%	3	4	3	2		12 (37.5%)
Subtotales/Hojas	9	11	7	5		32 (100% / 27.8%)
Corteza / Hipoclorito 3%	7	9	8	7	31 (70.5%)	
Corteza / Etanol 70%	3	4	3	3		13 (29.5%)
Subtotales/Corteza	10	13	11	10		44 (100% / 38.2%)
Subtotales / minutos de tratamiento	31 (26%)	34 (2.5%)	28 (23.5%)	22 (18.5%)		
Subtotales / desinfectante					76 (66%)	39 (34%)
Subtotales/Tejido tratado						115 (100% / 96.6%)
Fruto / enjuague Agua						4 (3.4%)
Aislados Totales						119 (100%)

4.1.1.4. Crecimiento de aislados bacterianos y fúngicos en medios de producción S-7 y M1D.

4.1.1.4.1. Crecimiento de aislados en medio S-7.

De los 297 aislados bacterianos, 83 crecieron en el medio S-7, el cual se utilizó como medio de producción de paclitaxel para bacterias. A estos 83 aislados bacterianos, se les asignaron las claves: BCHCNZ-246 a BCHCNZ-328 (Tabla 9).

4.1.1.4.2. Crecimiento de aislados fúngicos en medio M1D.

Los 119 aislados fúngicos crecieron en el medio M1D, el cual se utilizó como medio de producción de paclitaxel para hongos. A estos 119 aislados fúngicos, se les asignaron las claves: CHTAF1 - CHTAF10 y CHTAM1 - CHTAM109 (Tabla 10).

Tabla 10. Aislados fúngicos con capacidad de crecer en medio M1D. Cultivo en 25 mL a 25 °C y 40 rpm.

AISLADO	AISLADO	AISLADO	AISLADO
CHTAF1	CHTAM21	CHTAM51	CHTAM81
CHTAF2	CHTAM22	CHTAM52	CHTAM82
CHTAF3	CHTAM23	CHTAM53	CHTAM83
CHTAF4	CHTAM24	CHTAM54	CHTAM84
CHTAF5	CHTAM25	CHTAM55	CHTAM85
CHTAF6	CHTAM26	CHTAM56	CHTAM86
CHTAF7	CHTAM27	CHTAM57	CHTAM87
CHTAF8	CHTAM28	CHTAM58	CHTAM88
CHTAF9	CHTAM29	CHTAM59	CHTAM89
CHTAF10	CHTAM30	CHTAM60	CHTAM90
CHTAM1	CHTAM31	CHTAM61	CHTAM91

CHTAM2	CHTAM32	CHTAM62	CHTAM92
CHTAM3	CHTAM33	CHTAM63	CHTAM93
CHTAM4	CHTAM34	CHTAM64	CHTAM94
CHTAM5	CHTAM35	CHTAM65	CHTAM95
CHTAM6	CHTAM36	CHTAM66	CHTAM96
CHTAM7	CHTAM37	CHTAM67	CHTAM97
CHTAM8	CHTAM38	CHTAM68	CHTAM98
CHTAM9	CHTAM39	CHTAM69	CHTAM99
CHTAM10	CHTAM40	CHTAM70	CHTAM100
CHTAM11	CHTAM41	CHTAM71	CHTAM101
CHTAM12	CHTAM42	CHTAM72	CHTAM102
CHTAM13	CHTAM43	CHTAM73	CHTAM103
CHTAM14	CHTAM44	CHTAM74	CHTAM104
CHTAM15	CHTAM45	CHTAM75	CHTAM105
CHTAM16	CHTAM46	CHTAM76	CHTAM106
CHTAM17	CHTAM47	CHTAM77	CHTAM107
CHTAM18	CHTAM48	CHTAM78	CHTAM108
CHTAM19	CHTAM49	CHTAM79	CHTAM109
CHTAM20	CHTAM50	CHTAM80	

Los 119 aislados fúngicos crecieron en el medio M1D y 83 de 297 aislados bacterianos crecieron en medio S-7. Las bacterias se aislaron en los medios complejos: AN, BHI y R2A. El medio S-7 es un medio semisintético, que pudiera no contener algún nutriente esencial para el crecimiento de los aislados bacterianos que no tuvieron la capacidad de crecer en él.

4.1.2. Conservación de los aislados bacterianos y fúngicos.

4.1.2.1. Aislados bacterianos.

Se conservaron 72 de los 83 aislados bacterianos iniciales. Los aislados BCHCNZ247, BCHCNZ250, BCHCNZ261, BCHCNZ274, BCHCNZ278, BCHCNZ300, BCHCNZ305, BCHCNZ313, BCHCNZ315, BCHCNZ325, BCHCNZ328, no crecieron en caldo nutritivo, ni en medio S-7, aún después de nuevas resiembras y 72 horas de incubación. Los 73 aislados bacterianos que se conservaron son los que aparecen en la tabla 11.

4.1.2.2. Aislados fúngicos.

Setenta y tres aislados fúngicos, de los 119 iniciales, crecieron en medio Agar-PDA y se conservaron en agua estéril a 2-5 °C. Los 73 aislados fúngicos que se conservaron son los que aparecen en la tabla 14.

4.1.3. Determinación de la capacidad de producción de paclitaxel de los aislados bacterianos y fúngicos.

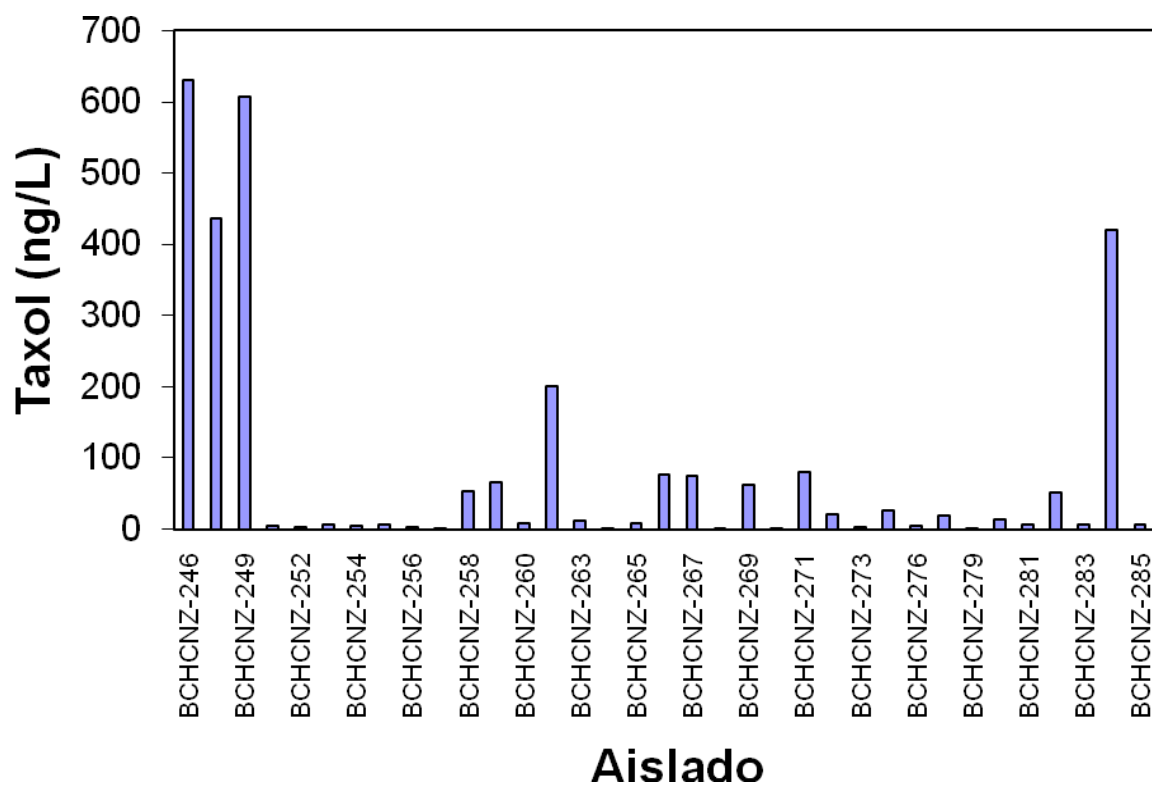
4.1.3.1. Inmunoensayo de inhibición competitiva CIEIA.

Los extractos clorofórmicos de cultivos de 72 aislados bacterianos y de 73 aislados fúngicos, se analizaron por inmunoensayo de inhibición competitiva (CIEIA) para determinar la presencia de paclitaxel.

4.1.3.1.1. Inmunoensayo de paclitaxel en extractos de cultivos de bacterias.

Los resultados del inmunoensayo de los 72 aislados bacterianos se muestran en la tabla 11 y en la figura 13.

Los aislados BCHCNZ-246, BCHCNZ-248, BCHCNZ-249, BCHCNZ-258, BCHCNZ-259, BCHCNZ-262, BCHCNZ-266, BCHCNZ-267, BCHCNZ-269, BCHCNZ-271, BCHCNZ-282, BCHCNZ-284, BCHCNZ-294, BCHCNZ-298, BCHCNZ-299 y BCHCNZ-321 mostraron las concentraciones más altas de paclitaxel en el primer inmunoensayo y fueron sometidos a un segundo y tercer inmunoensayo, partiendo de extractos nuevos. Los resultados de los 3 inmunoensayos y su promedio se muestran en la tabla 12 y figuras 14,15 y 16.



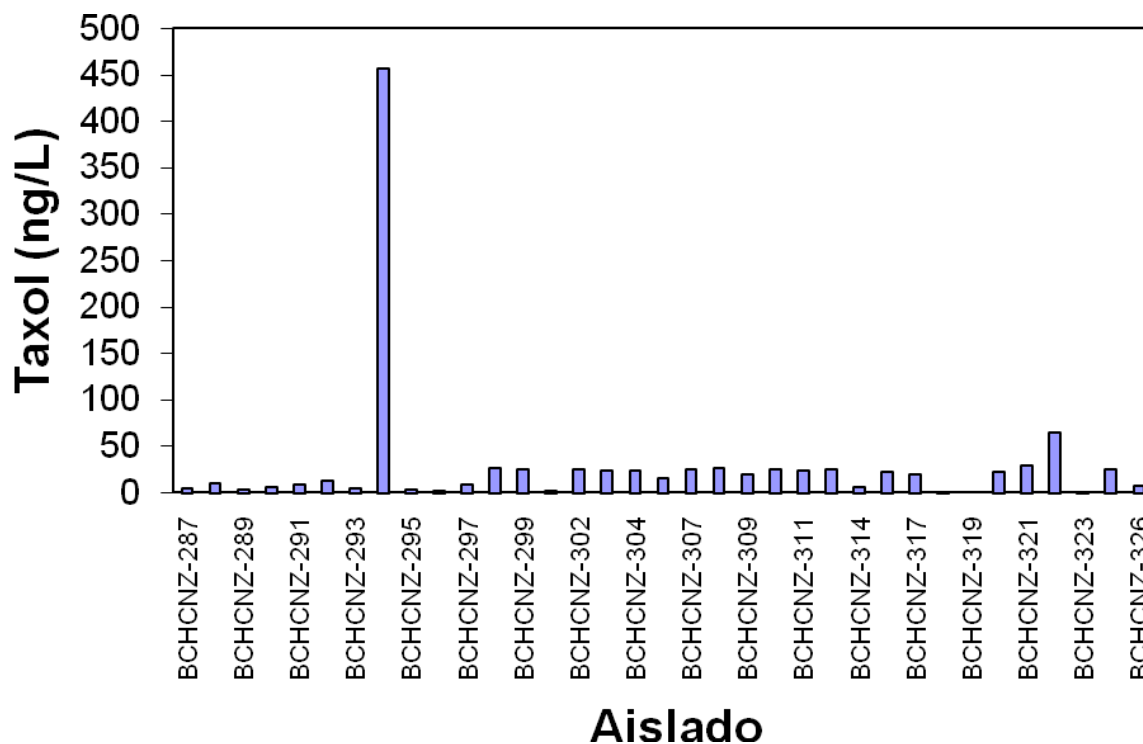


Figura 13. Inmunoensayo de paclitaxel de 72 aislados bacterianos de *Taxus globosa*.
 Tabla 12. Segundo y tercer inmunoensayo de aislados bacterianos de *Taxus globosa*.

	Inmunoensayo		
	1er	2do	3ro
BCHCNZ-246	629.04	404.98	231.02
BCHCNZ-248	436.56	375.22	375.82
BCHCNZ-249	606.56	260	449.53
BCHCNZ-258	53.86	6.59	
BCHCNZ-259	66.40	0.96	15.96
BCHCNZ-262	199.95	2.93	6.37
BCHCNZ-266	76.09	19.39	15.50
BCHCNZ-267	74.37	8.07	6.85
BCHCNZ-269	62.17	21.73	
BCHCNZ-271	80.08	2.11	17.57
BCHCNZ-282	51.16	9.22	4.62
BCHCNZ-284	420.00	288.05	284.34
BCHCNZ-294	456.50	236.78	478.51
BCHCNZ-298	27.49	24.97	
BCHCNZ-299	26.05	26.24	
BCHCNZ-321	29.02	16.65	

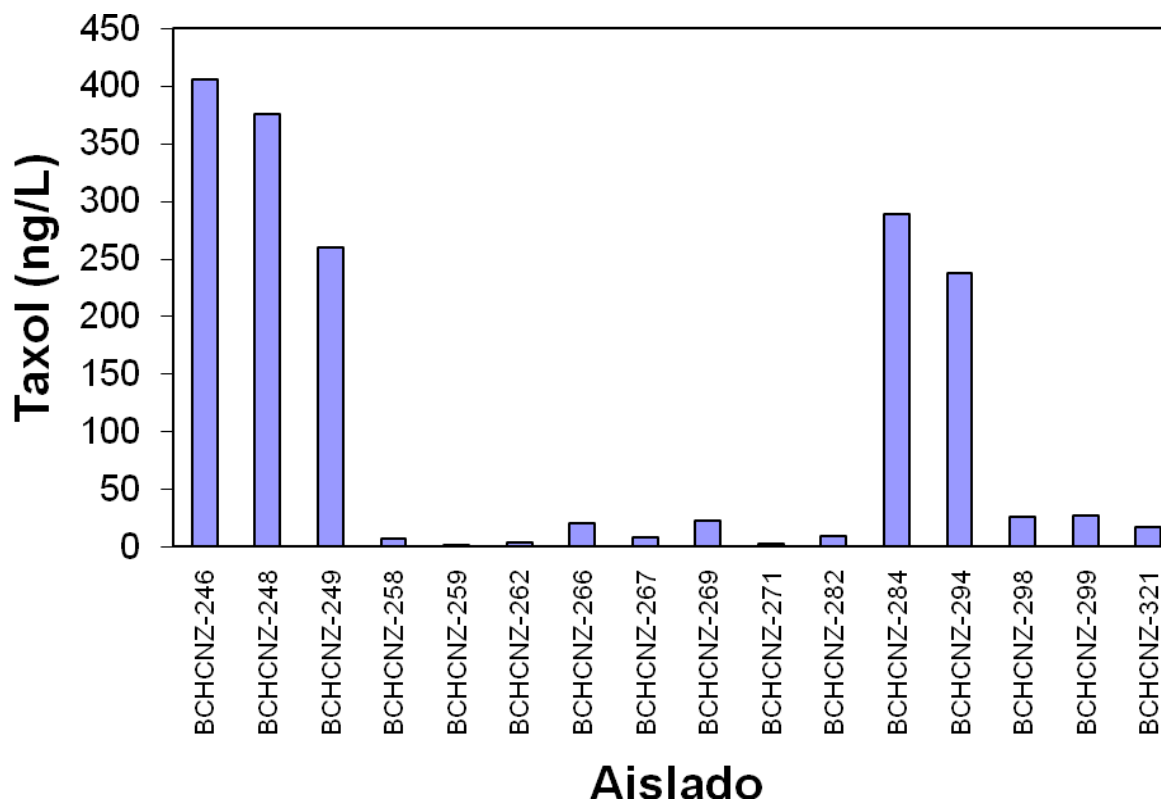


Figura 14. Segundo inmunoensayo de paclitaxel de aislados bacterianos.

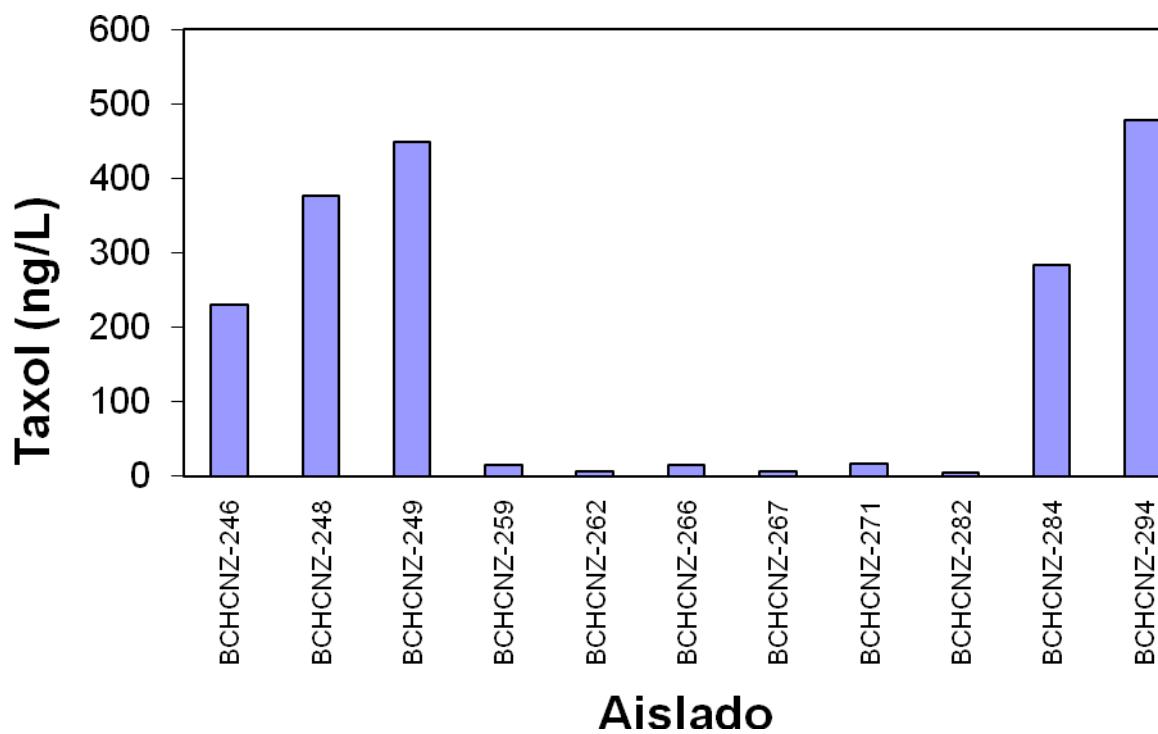


Figura 15. Tercer inmunoensayo de paclitaxel de aislados bacterianos.

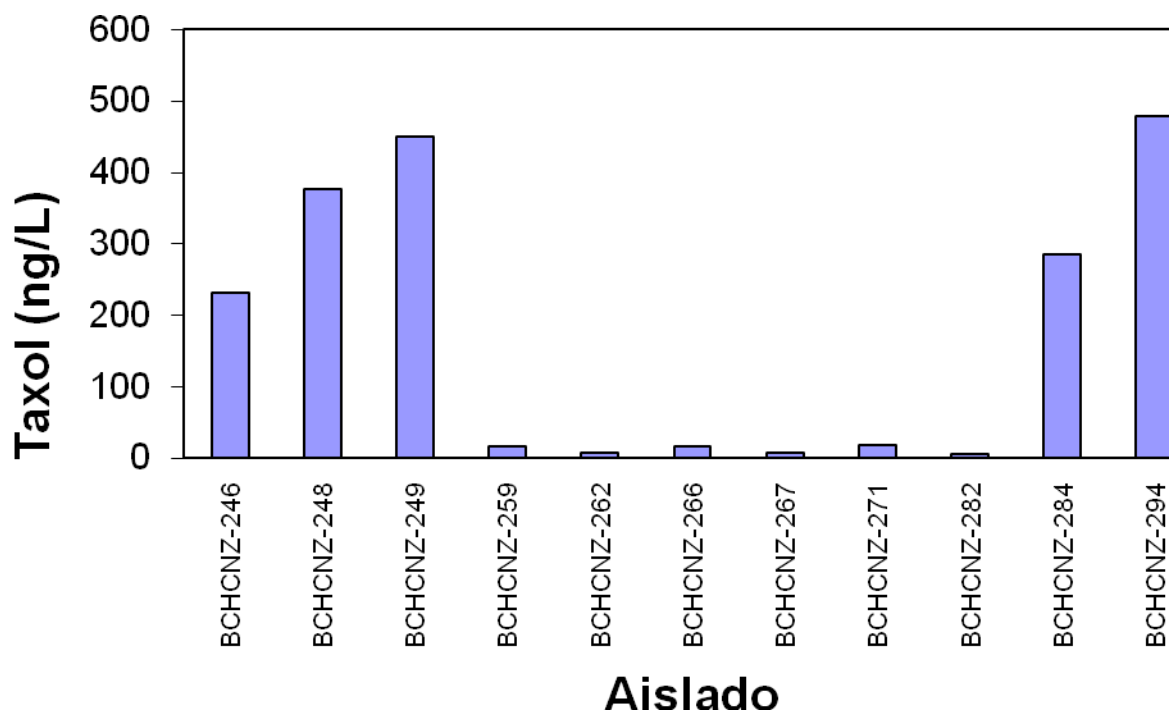


Figura 16. Promedio del segundo y Tercer inmunoensayo de paclitaxel de aislados bacterianos.

Los aislados bacterianos que presentaron las concentraciones más altas en las 3 réplicas de inmunoensayo, así como en su promedio, fueron: BCHCNZ-246, BCHCNZ-248, BCHCNZ-249, BCHCNZ-284, BCHCNZ-294, y fueron los que se seleccionaron para su posterior análisis (Tabla 13).

Tabla 13. Aislados bacterianos positivos a paclitaxel por inmunoensayo.

Aislado	Paclitaxel (ng/L)	Paclitaxel (ng/L)	Paclitaxel (ng/L)	Paclitaxel (ng/L) Promedio
BCHCNZ-246	629	405	231	421
BCHCNZ-248	437	375	376	396
BCHCNZ-249	607	260	450	439

BCHCNZ-284	421	288	284	331
BCHCNZ-294	456	237	479	390

4.1.3.1.2. Inmunoensayo de paclitaxel en extractos de cultivos de hongos.

Los resultados del inmunoensayo de los 73 aislados fúngicos se muestran en la tabla 14 y en la figura 17.

Los 21 aislados que mostraron las concentraciones más altas de paclitaxel en el primer inmunoensayo fueron sometidos a un segundo inmunoensayo, partiendo de extractos nuevos. Los resultados del primer y segundo inmunoensayo, así como su promedio se muestran en las tabla 15 y 16 y en las figuras 18 y 19.

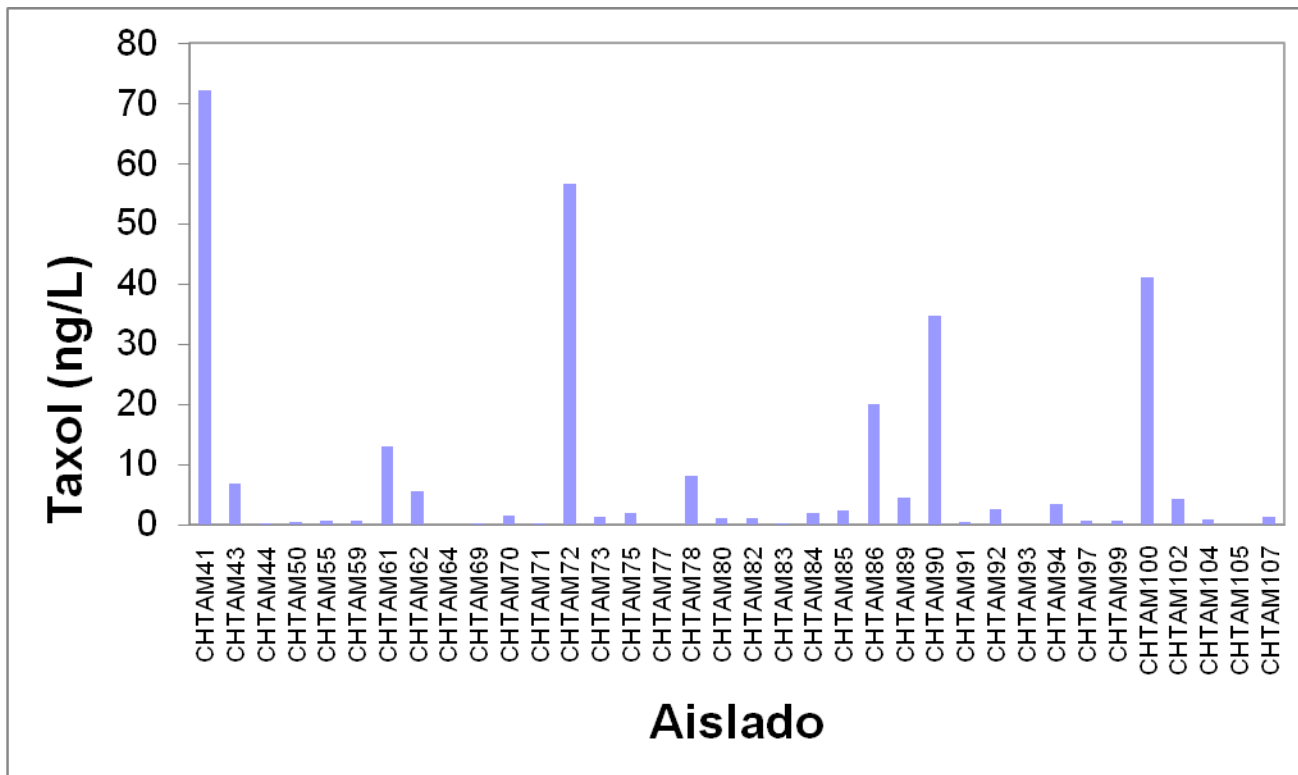
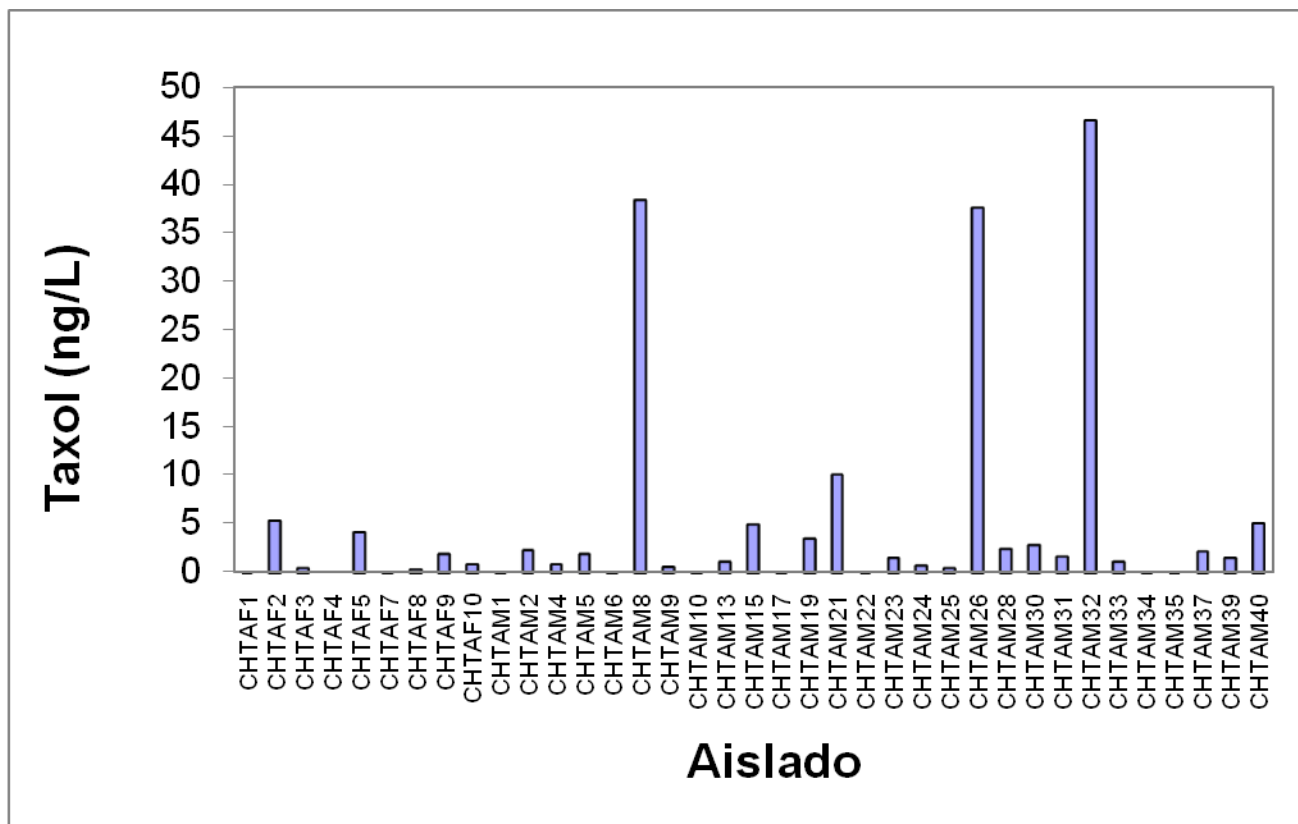


Figura 17. Inmunoensayo de paclitaxel de 73 aislados fúngicos de *Taxus globosa*.

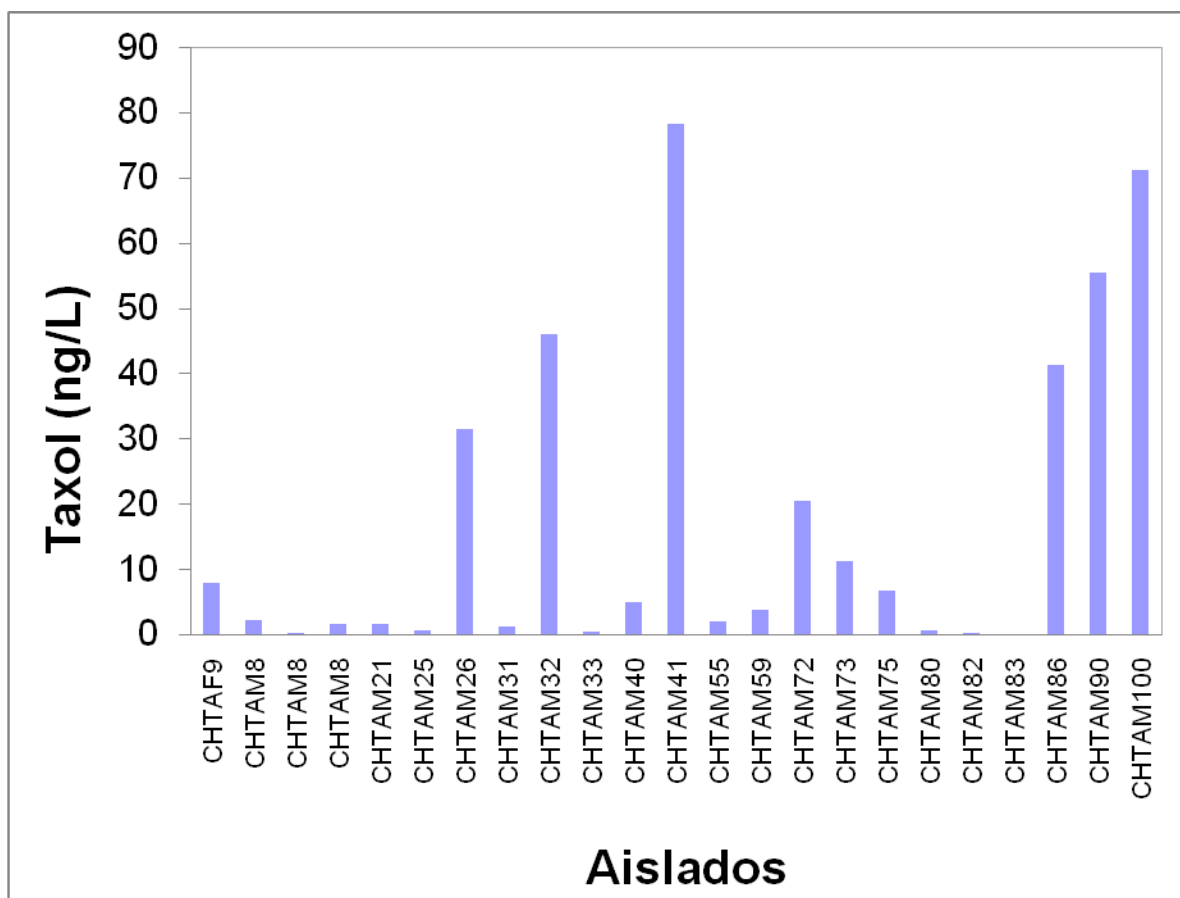


Figura 18. Segundo inmunoensayo de paclitaxel de aislados fúngicos de *Taxus globosa*.

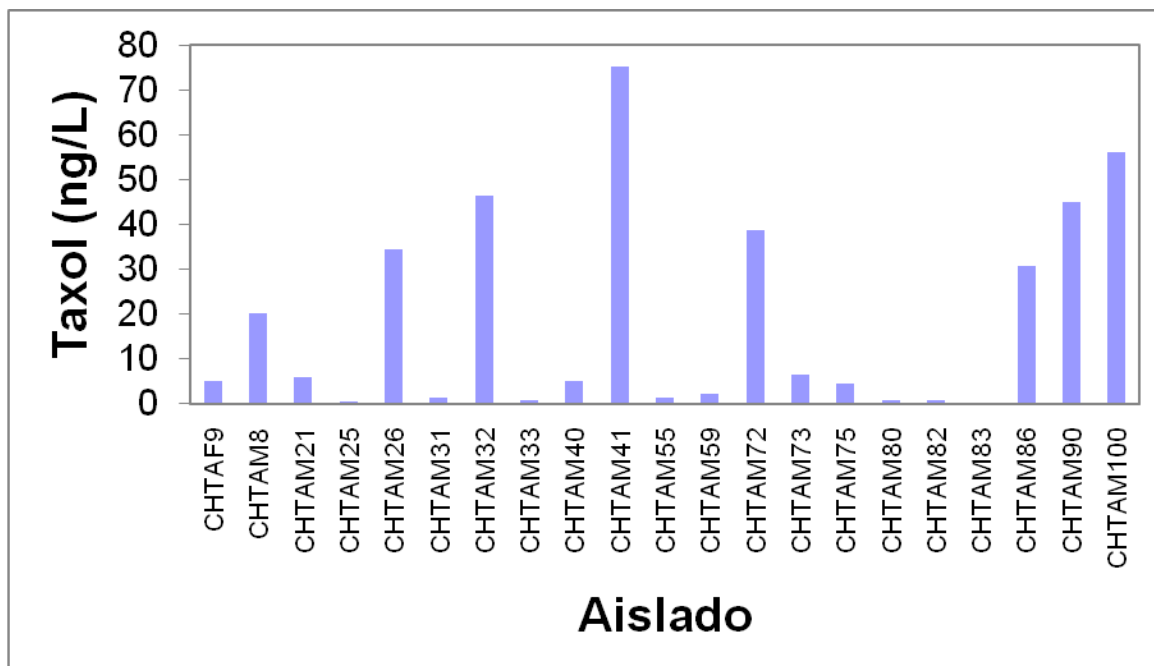


Figura 19. Promedio del primer y segundo inmunoensayo de paclitaxel de aislados fúngicos de *Taxus globosa*.

Los 7 aislados: CHTAM26 CHTAM32, CHTAM41, CHTAM72, CHTAM86, CHTAM90 y CHTAM100, fueron los que presentaron las concentraciones más altas en las dos réplicas, así como en su promedio.

Los extractos del cultivo en medio M1D-2X de estos 7 aislados, se analizaron en un tercer inmunoensayo. El resultado de este tercer inmunoensayo se presentan en la tabla 17. La figura 20 muestra el promedio de los dos primeros inmunoensayos en medio M1D-1X y el tercer inmunoensayo en medio M1D-2X para estos 7 aislados. Se observa que la concentración de paclitaxel aumenta en los extractos cultivados en medio M1-2X para los 7 aislados.

Tabla 17. Inmunoensayo de extractos de cultivo en medio M1D-2X de 7 aislados de *Taxus globosa*.

			PACLITAXEL
AISLADO	PACLITAXEL	PACLITAXEL	ng/ L
	ng/ L	ng/ L	PROMEDIO
CHTAM8-2x	19.80	20.48	20.14
CHTAM26-2x	119.39	128.29	123.84

CHTAM32-2x	387.70	269.39	328.54
CHTAM41-2x	109.15	104.60	106.87
CHTAM72-2x	126.74	136.34	131.54
CHTAM86-2x	179.17	167.36	173.26
CHTAM90-2x	102.16	106.47	104.31
CHTAM100-2x	263.72	261.53	262.62

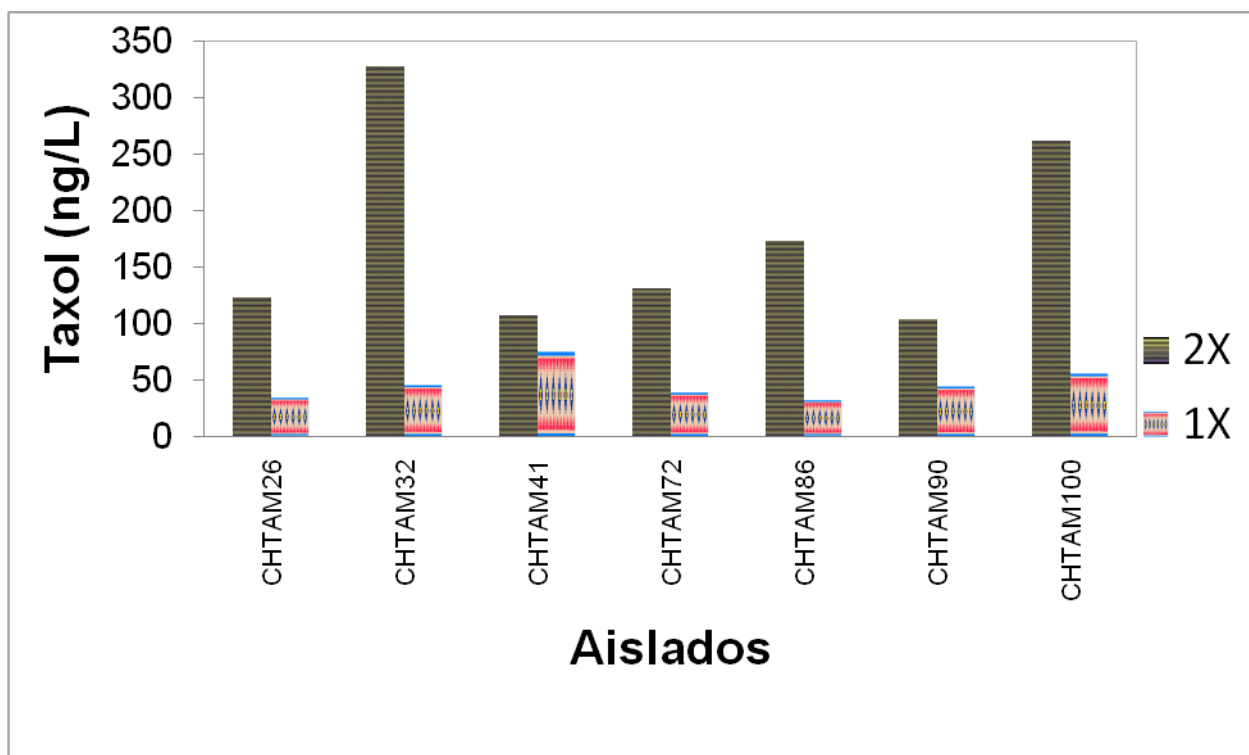


Figura 20. Tercer inmunoensayo (M1D-2X) y promedio de 1er y 2º inmunoensayos de 7 aislados fúngicos de *Taxus globosa*.

Los 7 aislados: CHTAM26, CHTAM32, CHTAM41, CHTAM72, CHTAM86, CHTAM90 y CHTAM100 fueron los que se seleccionaron para su posterior análisis

4.1.3.2. HPLC acoplado a MASAS (LCMS).

4.1.3.2.1. LCMS del estándar de 13 taxanos en el equipo agilento 1100 series.

Después de realizar varias pruebas con gradientes de Acetato de amonio 10 mM : Acetonitrilo, se logró separar los 13 picos, correspondientes a los taxanos del estándar, siendo el onceavo el correspondiente a paclitaxel (figura 21).

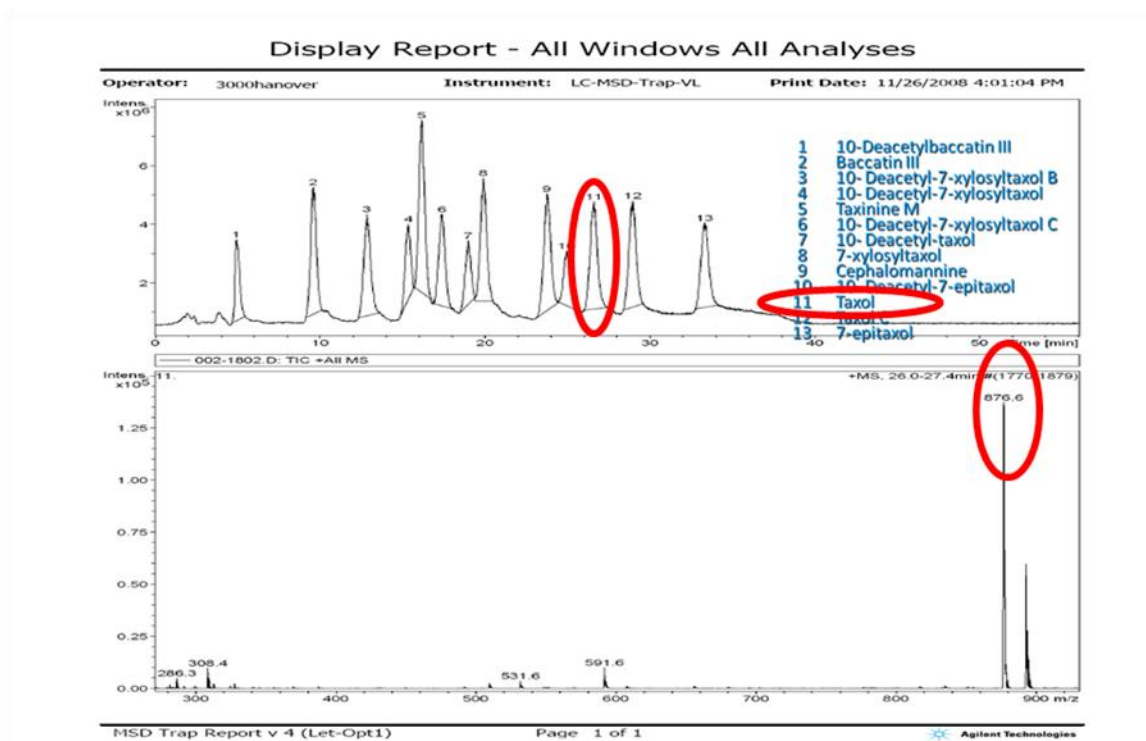


Figura 21. Espectrograma del estándar de 13 taxanos en el equipo Agilent 1100 Series LC/MSD.

4.1.3.2.2. LCMS de extractos de cultivos de aislados bacterianos.

4.1.3.2.2.1. LCMS en el equipo Agilent 1100 Series LC/MSD.

El extracto clorofórmico del cultivo de 4L de los aislados bacterianos (BCHCNZ-246, BCHCNZ-248, BCHCNZ-249, BCHCNZ-284, BCHCNZ-294), positivos a paclitaxel por inmunoensayo, se analizaron por LCMS en el equipo Agilent 1100 Series LC/MSD, bajo las mismas condiciones de corrida del estándar de 13 taxanos.

Los espectrogramas y del estándar de 13 taxanos y del extracto del cultivo de BCHCNZ-249, se muestran en las figura 22. El onceavo pico corresponde al estándar de paclitaxel.

Las figuras 23 y 24 muestran los espectros de masas del estándar y del extracto de BCHCNZ-249 al tiempo de retención 26.4 minutos. Este tiempo se encuentra dentro del rango de tiempo de retención del paclitaxel. El valor de la relación masa/carga 876 (m/z), característica del aducto de sodio del paclitaxel se observó, tanto en el estándar como en la muestra.

En los aislados bacterianos: BCHCNZ-246, BCHCNZ-248, BCHCNZ-284 y BCHCNZ-294 no se observaron los valores de masa/carga característicos de paclitaxel. Probablemente los extractos de los cultivos de estos aislados no produzcan paclitaxel, o lo produzcan en cantidades no detectables, o que exista supresión iónica de los iones característicos de paclitaxel, por interacciones con otros compuestos del extracto bacteriano.

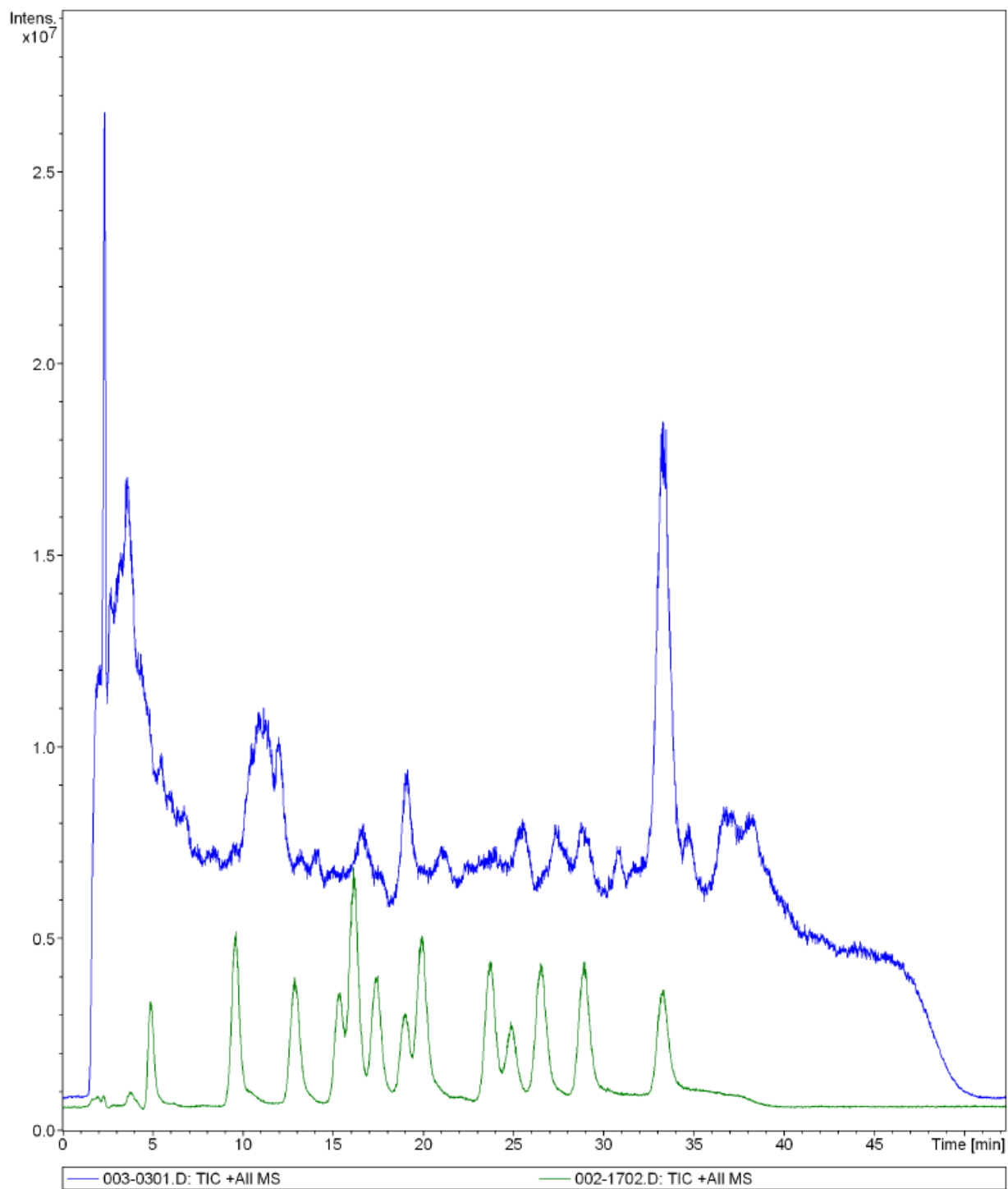


Figura 22. Espectrogramas del extracto del cultivo del aislado BHCNZ-249 y del estándar de 13 taxanos.

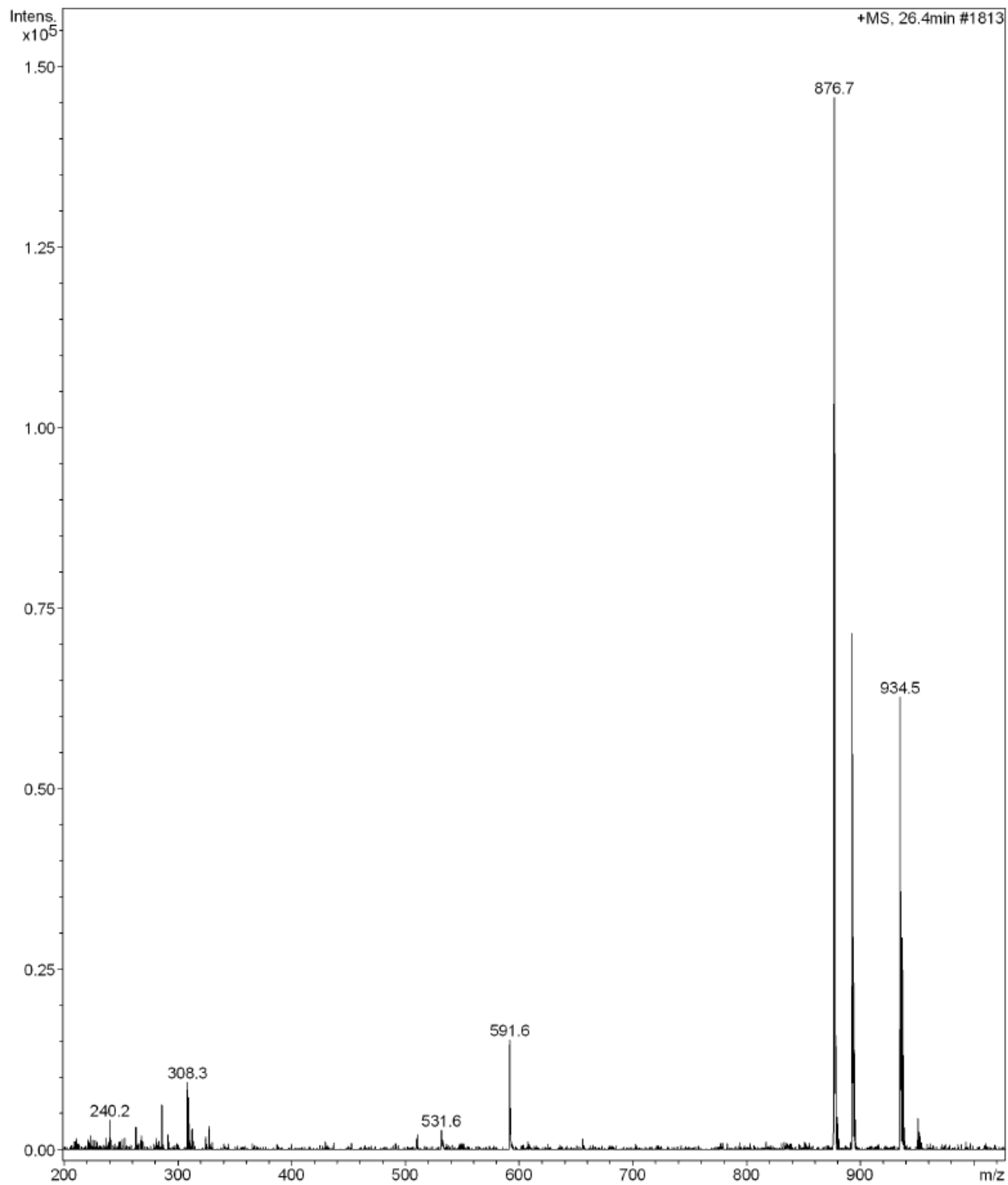


Figura 23. Espectro de masas del estándar de 13 taxanos al tiempo de retención 26.4 minutos.

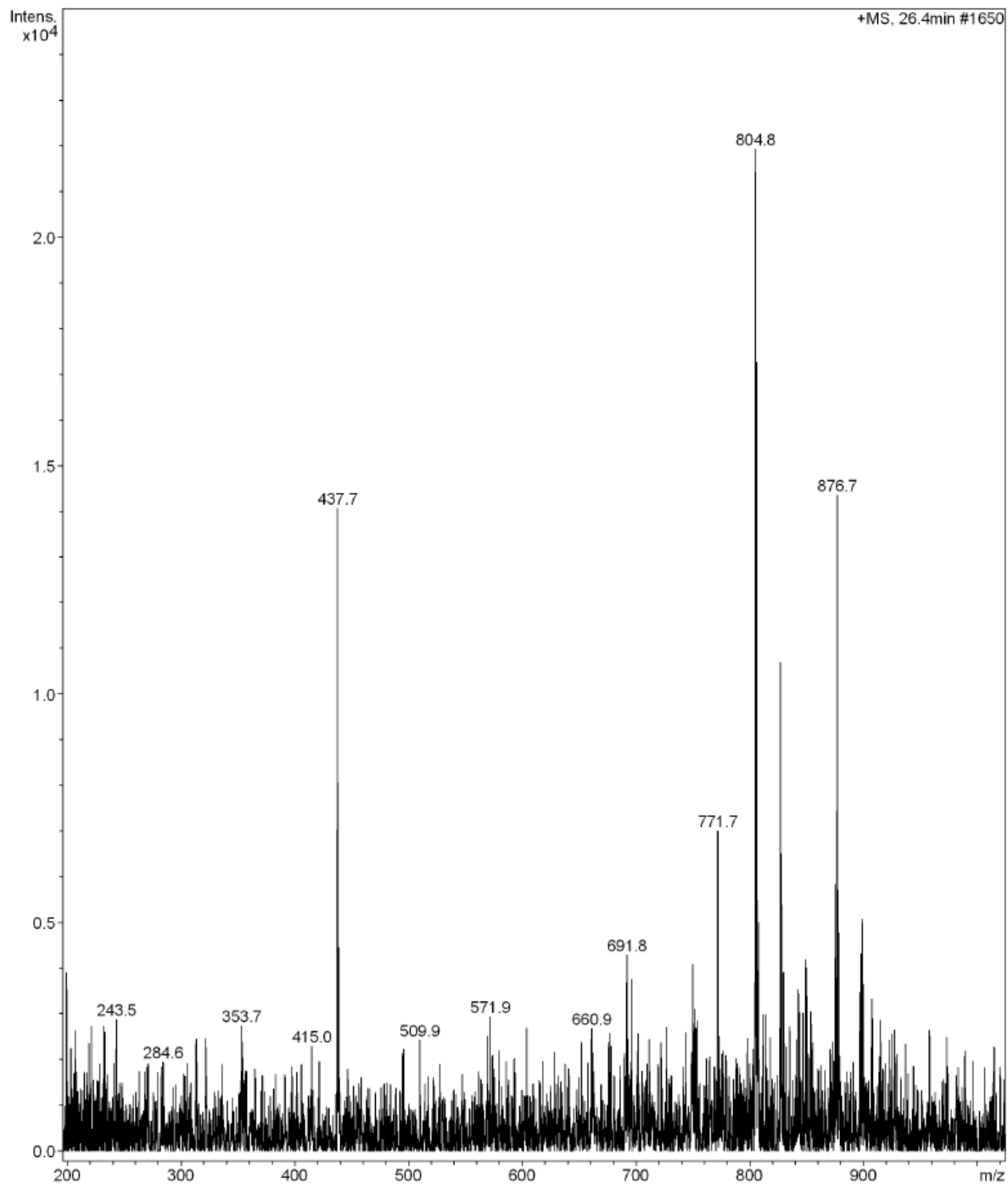


Figura 24. Espectro de masas del extracto del cultivo del aislado BCHCNZ-249 al tiempo de retención 26.4 minutos.

3.2.3.3. Análisis de LCMS en extractos de aislados de hongos.

En los aislados fúngicos: CHTAM26 CHTAM32, CHTAM41, CHTAM72, CHTAM86, CHTAM90 y CHTAM100, no se observaron los valores de masa/carga característicos de paclitaxel. Probablemente los extractos de los cultivos de estos aislados no produzcan paclitaxel, o lo produzcan en cantidades no detectables, o que exista supresión iónica de los iones característicos de paclitaxel, por interacciones con otros compuestos del extracto fúngico, como se mencionó en el caso de los extractos de los aislados bacterianos.

4.1.3.2.2. LCMS en el equipo 3200 QTRAP LC-MS-MS de Applied Biosystems.

El estándar de paclitaxel, así como un nuevo extracto del cultivo de 4 L del aislado bacteriano BCHCNZ-249, se analizaron por infusión directa al equipo de masas 3200 QTRAP LC-MS-MS de Applied Biosystems, buscando las transiciones 854 → 286 y 876→308, características del paclitaxel. Las dos transiciones se encontraron en el estándar de paclitaxel (figura 25), mientras que en la muestra se encontró únicamente la transición 854 → 286 (Figura 26).

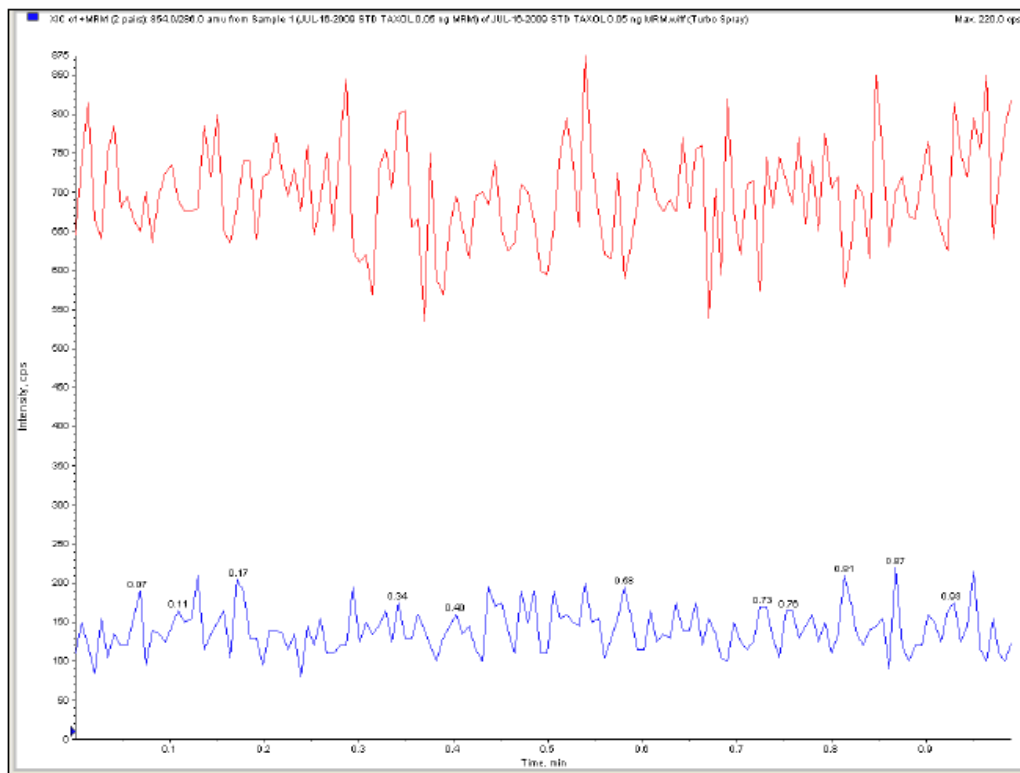


Figura 25. Espectrogramas de las transiciones 854 → 286 y 876→308 del estándar de paclitaxel. Infusión directa en el equipo 3200 QTRAP LC-MS-MS de Applied Biosystems.

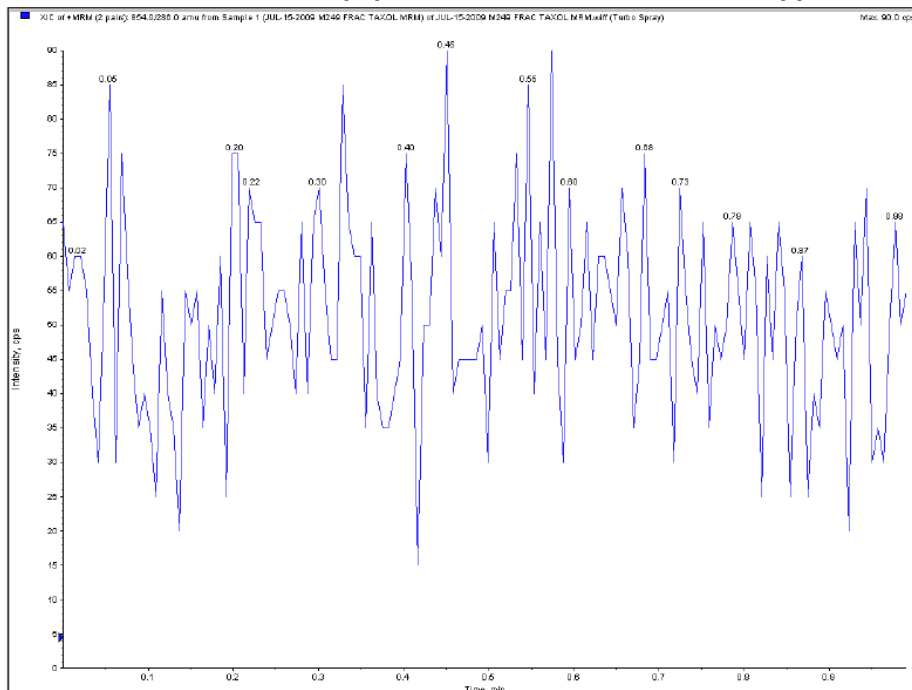


Figura 26. Espectrogramas de las transiciones 854 → 286 del extracto del cultivo del aislado BCHCNZ-249. Infusión directa en el equipo 3200 QTRAP LC-MS-MS de Applied Biosystems.

4.1.3.2.3. LCMS de extractos de cultivos de aislados fúngicos.

Para los extractos del cultivo de los aislados fúngicos CHTAM26, CHTAM32, CHTAM41, CHTAM72, CHTAM86, CHTAM90 y CHTAM100, considerados positivos a paclitaxel por inmunoensayo, se realizó la búsqueda de las transiciones 854 → 286 y 876 → 308, por infusión directa al equipo de MASAS y por LCMS, sin que se encontraran dichas transiciones.

4.1.3.3. Presencia del gen *dbat* en el aislado bacteriano BCHCNZ-249.

Se logró amplificar un fragmento de 200 bp que probablemente corresponde al gen *dbat*, en el aislado bacteriano BCHCNZ-249. El gel de agarosa con el producto de amplificación del fragmento de 200 pb se muestra en la Figura 27.

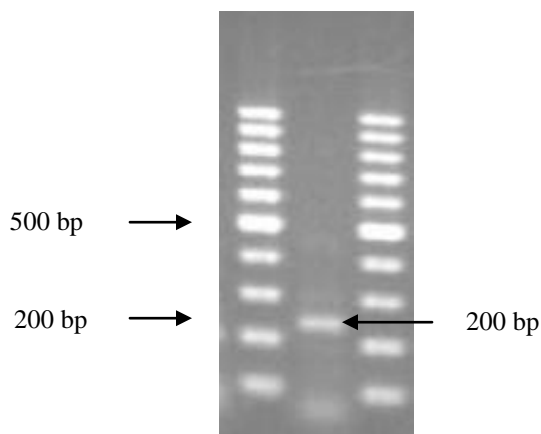


Figura 27. Gel de agarosa al 1.5% que muestra el fragmento amplificado de 200 pb del gen *dbat* del aislado bacteriano BCHCNZ-249. Carril 1 y 3: marcador 100bp DNA Ladder, Fermentas, carril 2: BCHCNZ-249

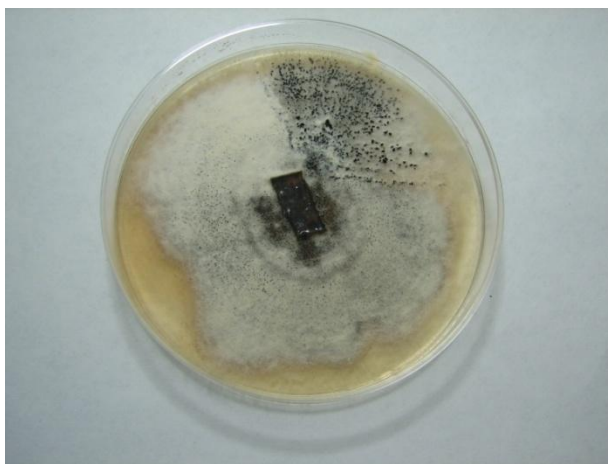
4.1.4. Identificación de aislados de hongos y bacterias positivos a paclitaxel por inmunoensayo.

4.1.4.1. Identificación de aislados fúngicos.

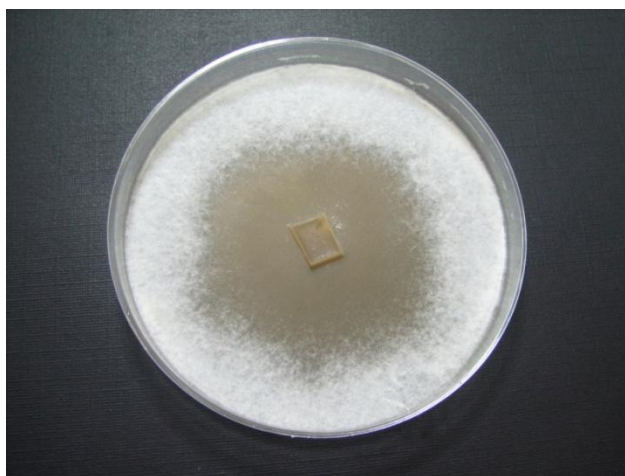
➤ Análisis morfológico de aislados fúngicos.

La morfología colonial de los aislados CHTAM26, CHTAM32, CHTAM41, CHTAM72, CHTAM86, CHTAM90 y CHTAM100 se reporta en la tabla 18 y las fotografías de estos aislados en la figura 28.

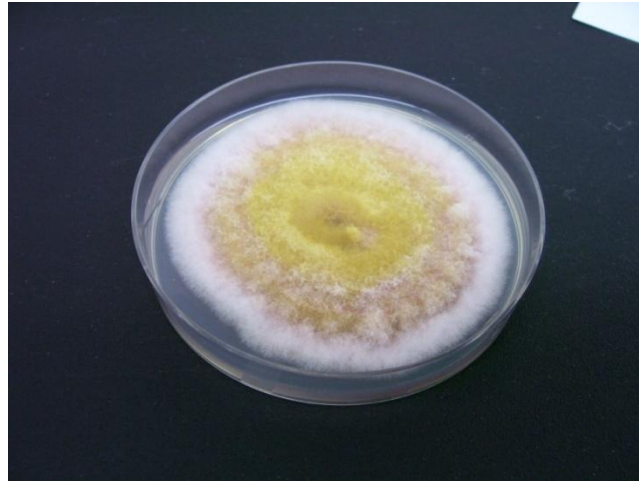
CHTAM26



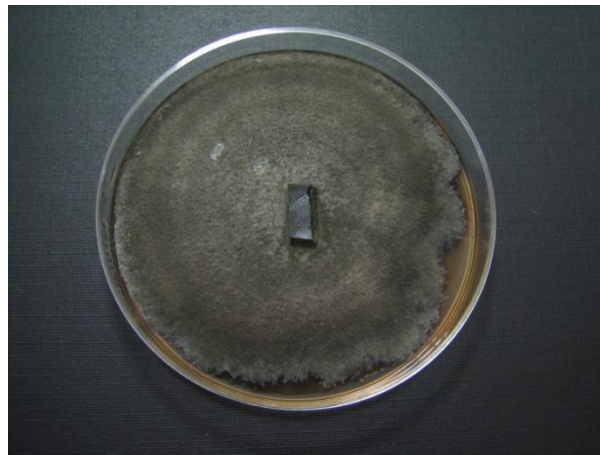
CHTAM41



CHTAM41



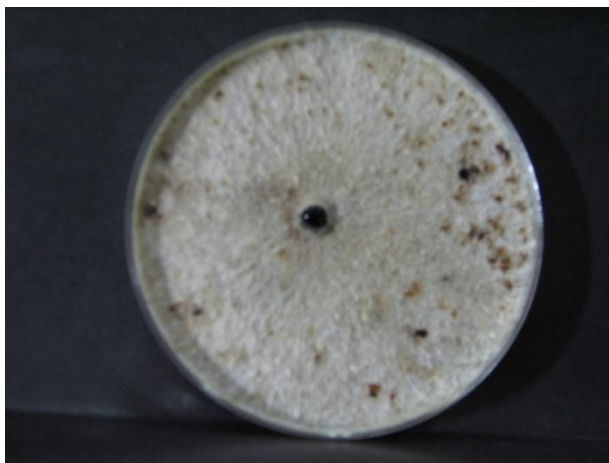
CHTAM72



CHTAM86



CHTAM90



CHTAM100

Figura 28. Fotografías de los aislados fúngicos: CHTAM26, CHTAM32, CHTAM41, CHTAM72, CHTAM86, CHTAM90 y CHTAM100, crecidas en PDA a 25 °C y 8 días de incubación.

➤ **Identificación molecular de aislados fúngicos.**

El alineamiento de la región D1/D2 del gen 26S rDNA, se realizó con las 7 secuencias de los aislados fúngicos: CHTAM26, CHTAM32, CHTAM41, CHTAM72, CHTAM86, CHTAM90 y CHTAM100 y 23 secuencias de cepas referencia. La relación filogenética de los aislados fúngicos y las cepas de referencia, se muestran en los árboles filogenéticos de la figura 29. La figura 30, muestra la relación filogenética de los mismos aislados fúngicos y las 23 secuencias de cepas de referencia, cuando el alineamiento se realizó utilizando las secuencias de la región ITS1-5.8 S-ITS2.

Se definió la afiliación taxonómica de los aislados (Tabla 19), como sigue: CHTAM26 (*Diatrypella* sp); CHTAM32 (*Pestalotiopsis maculiformans*); CHTAM41 (*Trichoderma viride*); CHTAM72 (*Fusarium tricinctum*); CHTAM86 (*Daldinia* sp.); CHTAM90 (*Clonostachys rosea*) y CHTAM100 (*Biscogniauxia* sp.). El % de similitud de las secuencias de los aislados y las cepas de referencia, se muestran en la tabla 19.

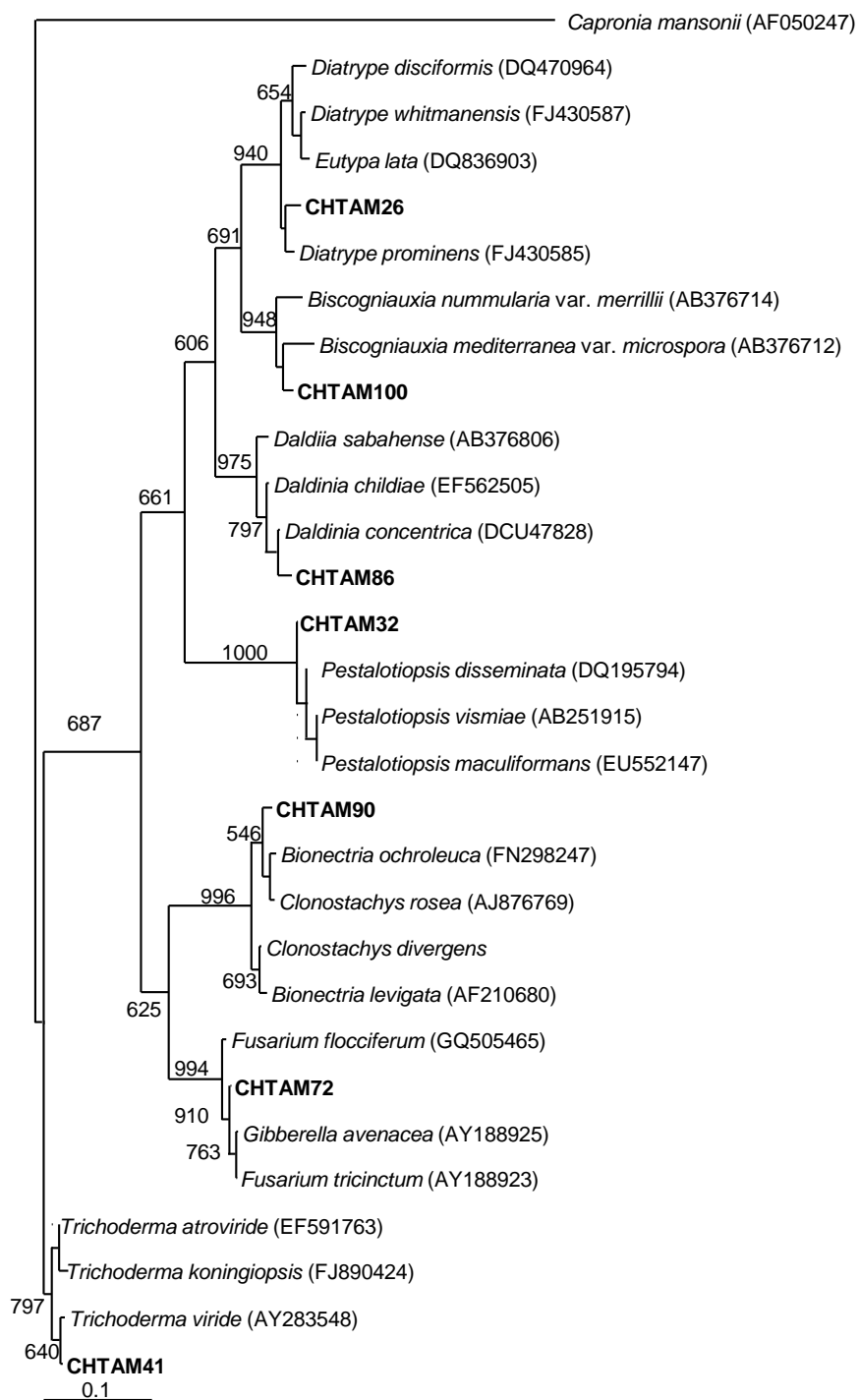


Figura 29. Árbol filogenético de las relaciones entre los aislados CHTAM26, CHTAM32, CHTAM41, CHTAM72, CHTAM86, CHTAM90 y CHTAM100 y las especies de referencia; a partir de las secuencias D1/D2 del gen 26S rDNA. El árbol fue construido por el método de máxima verosimilitud con 1000 réplicas.

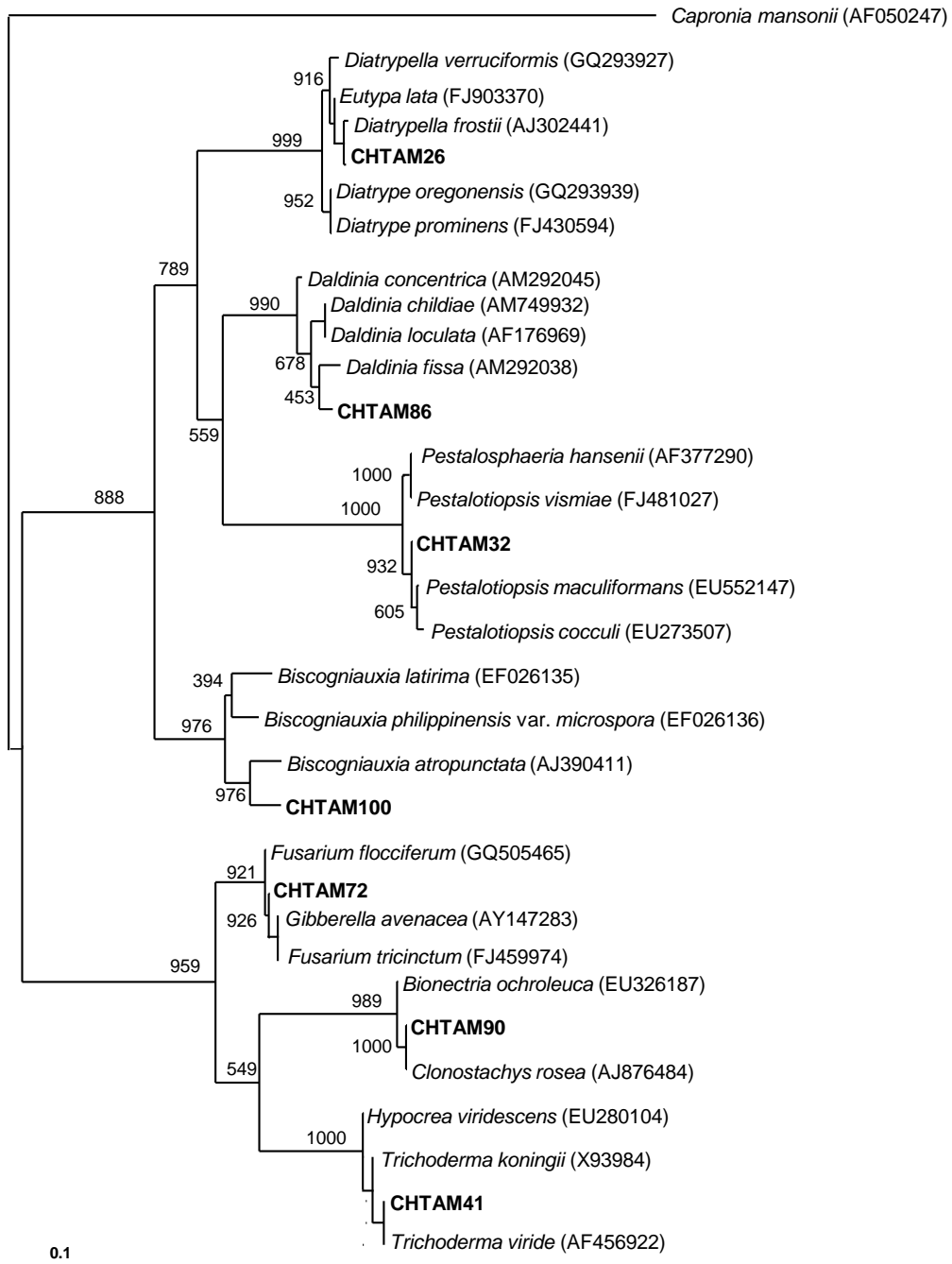


Figura 30. Figura 29. Árbol filogenético de las relaciones entre los aislados CHTAM26, CHTAM32, CHTAM41, CHTAM72, CHTAM86, CHTAM90 y CHTAM100 y las especies de referencia; a partir de las secuencias ITS1-5.8S-ITS2. El árbol fue construido por el método de máxima verosimilitud con 1000 réplicas.

Tabla 19. Afiliación taxonómica de los aislados fúngicos de *T. globosa* mediante los marcadores genéticos: ITS1-5.8S-ITS2 y D1/D2 28S del rDNA.

Aislado	Especie relacionada en el GenBank (Núm. de acceso) del D1/D2 28S rDNA	Similitud (%)*	Especie relacionada en el GenBank (Núm. de acceso) del ITS1-5.8 S-ITS2	Similitud (%)*	Afiliación taxonómica
CHTAM26	<i>Diatrypella frostii</i> (AJ302441)	98.9	<i>Diatrypella prominens</i>	97.7	<i>Diatrypella</i> sp.
	<i>Diatrype oregonensis</i> (GQ293939)				
CHTAM32	<i>Pestalotiopsis maculiformans</i> (EU552147)	99.4	<i>Pestalotiopsis disseminate</i> (DQ195794)	100	<i>Pestalotiopsis maculiformans</i>
			<i>Pestalotiopsis maculiformans</i> (EU552147)		
CHTAM41	<i>Trichoderma viride</i> (AF456922)	100	<i>Trichoderma viride</i> (AY283548)	99.4	<i>Trichoderma viride</i>
	<i>Trichoderma koningii</i> (X93984)				
CHTAM72	<i>Fusarium tricinctum</i> (FJ459974)	99.4	<i>Fusarium tricinctum</i> (AY188923)	99.6	<i>Fusarium tricinctum</i>
CHTAM86	<i>Daldinia fissa</i> (AM292038)	96.3	<i>Daldinia childiae</i> (EF562505)	98.5	<i>Daldinia</i> sp.
	<i>Daldinia childiae</i> (AM749932)	92.8			
CHTAM90	<i>Clonostachys rosea</i> (AJ876484)	100	<i>Clonostachys rosea</i> (AJ876769)	98.0	<i>Clonostachys rosea</i>
CHTAM100	<i>Biscogniauxia atropunctata</i> (AJ390411)	93.0	<i>Biscogniauxia mediterranea</i> (AB376712)	96.6	<i>Biscogniauxia</i> sp.

4.1.4.2. Identificación de aislados de bacterias.

4.1.4.2.1. Morfología colonial y microscópica de los aislados bacterianos se reportan en la tabla 20.

Tabla 20. Morfología colonial de los aislados bacterianos: BHCNZ-246, BHCNZ-248, BHCNZ-249, BHCNZ-284 y BHCNZ-294.

	Aislado	BHCNZ-246	BHCNZ-248	BHCNZ-249	BHCNZ-284	BHCNZ-294
Morfología microscópica	Gram	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
	Forma	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo
	Movilidad	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
	Esporulación	Sí	Sí	Sí	Sí	No
	Tiempo Esporulación	48 hrs	45 hrs	40 hrs	60 hrs	-----
Morfología Macroscópica	Color	Blanca	Transparente	Blanca	Beige	Crema
	Borde	Regular	Irregular	Regular	Irregular	Irregular
	Consistencia	Friable	Cremosa	Viscosa	Cremosa	Cremosa
	Luz Transmitida	Opaca	Opaca	Translúcida	Opaca	Opaca
	Luz Reflejada	Mate	Mate	Brillosa	Brillosa	Brillosa

➤ Identificación molecular de aislados bacterianos.

Se encontraron dos colonias diferentes al realizar diluciones seriales del aislado BHCNZ-248, y se definieron como: BHCNZ-248L y BHCNZ-248R.

El DNA de los aislados bacterianos: BHCNZ-246, BHCNZ-248L, BHCNZ-248R BHCNZ-249, BHCNZ-284 y BHCNZ-294, se extrajo utilizando el procedimiento descrito en materiales y métodos. Se obtuvieron los productos de amplificación por PCR, del gen 16S rDNA, con los iniciadores MVZ1 y MVZ2 (1500 pares de bases) de cada uno de los aislados. La concentración de los fragmentos purificados del gen 16S rDNA, de los aislados, estuvo en el rango de 140 a 176 µg/µL.

El alineamiento de la región del gen 16S rDNA, se realizó con las 6 secuencias de los aislados bacterianos: BHCNZ-246, BHCNZ-248L, BHCNZ-248R

BCHCNZ-249, BCHCNZ-284 y BCHCNZ-294 y 25 secuencias de cepas referencia. La relación filogenética de los aislados bacterianos y las cepas de referencia, se muestran en los árboles filogenéticos de la figura 31.

Se definió la afiliación taxonómica de los aislados, como sigue: BCHCNZ-246 (*Bacillus megaterium*); BCHCNZ-248L (*Bacillus simplex*); BCHCNZ-248R (*Bacillus macroide*); BCHCNZ-249 (*Paenibacillus polymyxa*); BCHCNZ-284 (*Paenibacillus chondroitinus*.) y BCHCNZ-294 (*Paenibacillus tundrae*). El % de similitud de las secuencias de los aislados y las cepas de referencia, se muestran en la tabla 20.

Tabla 20. Afiliación taxonómica de los aislados de *T. globosa*, mediante el gen 16S rDNA.

Aislado	Especie relacionada en el GenBank (Núm. de acceso)	Similitud (%)*	Afiliación taxonómica
246	<i>Bacillus megaterium</i> (FJ823003)	99.9	<i>Bacillus megaterium</i>
248L	<i>Bacillus simplex</i> (FJ455076)	100	<i>Bacillus simplex</i>
248R	<i>Bacillus macroide</i> (AF157696)	99.8	<i>Bacillus macroide</i>
249	<i>Paenibacillus polymyxa</i> (EF634024)	99.9	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
284	<i>Paenibacillus chondroitinus</i> (EU290158)	99.6	<i>Paenibacillus chondroitinus</i>
294	<i>Paenibacillus tundrae</i> (EU558284)	99.3	<i>Paenibacillus tundrae</i>

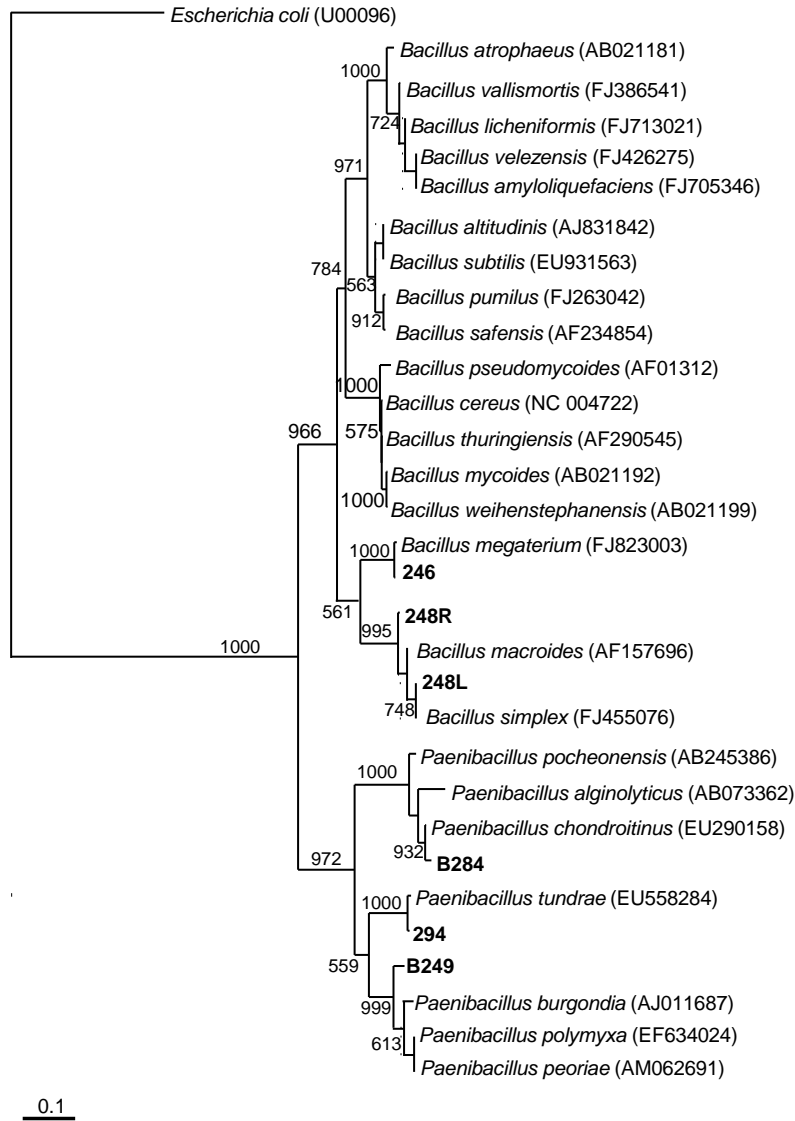


Figura 31. Árbol filogenético de las relaciones entre los aislados BHCNZ-246, BHCNZ-248L, BHCNZ-248R BHCNZ-249, BHCNZ-284 y BHCNZ-294, y las especies de referencia; a partir de las secuencias del 16S rDNA. El árbol fue construido por el método de máxima verosimilitud con 1000 réplicas.

4.1.5. Microscopía electrónica del aislado BCHCNZ-249.

Las fotografías microscópicas a 12 (a), 24(b), 48(c) y 72(d) horas de cultivo en medio S-7, del aislado BCHCNZ-249, se muestran en la figura 29.

Las esporas características de bacterias del género *Paenibacillus* se observan en las microfotografías del aislado BCHCNZ-249 a las 72 horas de incubación, este resultado contribuye a la asignación de este aislado como perteneciente al género *Paenibacillus*.

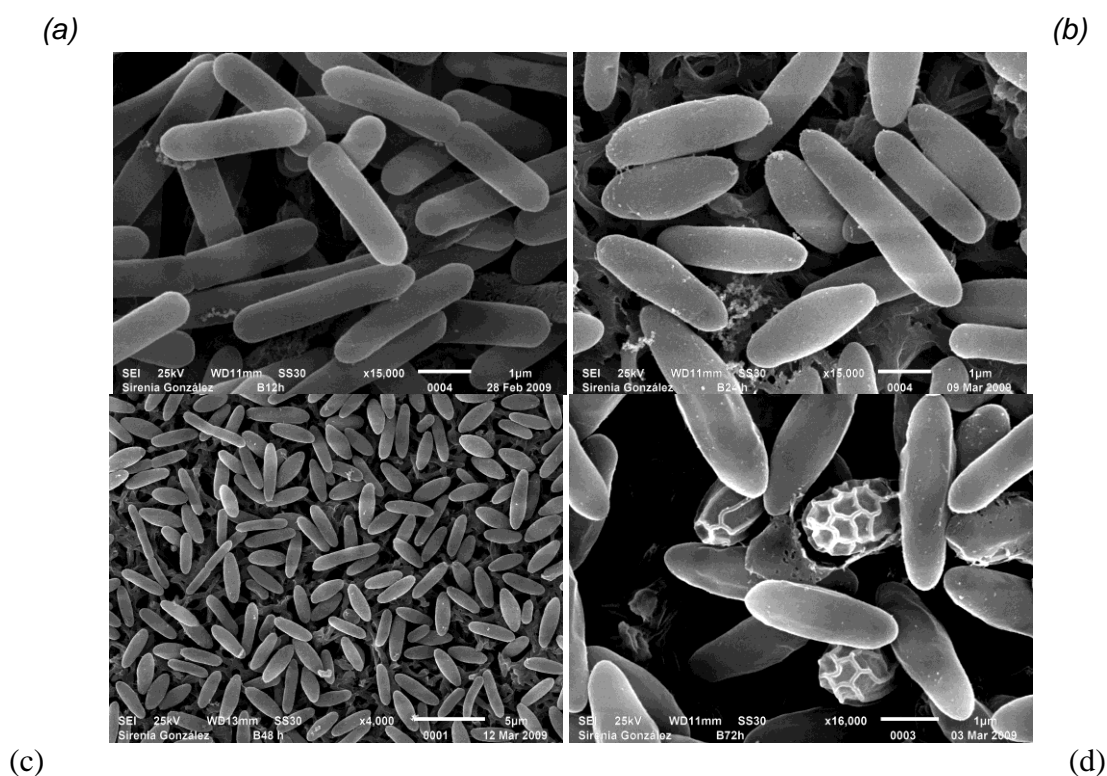


Figura 29. Microscopía electrónica de barrido del aislado BCHCNZ-249

Discusión

El análisis filogenético de los aislados fúngicos CHTAM32 y CHTAM72, reveló que pertenecen a las especies *Pestalotiopsis maculiformans* y *Fusarium tricinctum* respectivamente. Hongos de estos géneros ya han sido aislados de árboles de *Taxus* y se han reportados como productores de paclitaxel (Strobel G. A., *et al.*, 1996 (a y b); Strobel G. A., *et al.*, 1997; Li J. Y., *et al.*, 1998; Shrestha, K., *et al.*, 2001; Xu F., *et al.*, 2006).

Por otro lado, el análisis filogenético de los aislados: CHTAM41 y CHTAM90, reveló que pertenecen a las especies: *Trichoderma viride* y *Clonostachys rosea* respectivamente; mientras que CHTAM26, CHTAM86 y CHTAM100 pertenecen a los géneros: *Diatrypella sp.*, *Daldinia sp.* y *Biscogniauxia sp.* Hongos de estos géneros no se han aislado de *Taxus*, y tampoco se han reportado como productores de paclitaxel. Hongos del género *Trichoderma* se han utilizado como agentes de control biológico contra hongos fitopatógenos y algunas especies promueven el crecimiento de las plantas que colonizan (Vinale, F., 2008; Avis, T. J., 2008). Hoyos-Carvajal, L., *et al.*, 2009, reportaron, que el crecimiento de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) fué mejorado por la presencia de cepas específicas de *Trichoderma*.

El género *Biscogniauxia* está presente como endófito en árboles saludables, llega a ser invasivo bajo condiciones de estrés hídrico y causa la enfermedad de cancro de carbón vegetal (Nugent, L.K., 2005). Mazaglia, A., 2001, reportó la presencia de *Biscogniauxia mediterránea*, en su fase latente en árboles de roble (*Quercus*) y Nugent, L.K., 2005 reportó la habilidad de *B. nummularia*, *B. nothofagi* y *B. uniapiculata* de causar cancro de carbón vegetal en árboles de *Fagus*, *Nothofagus* y *Eucalyptus*, respectivamente.

Se ha reportado que *Daldinia concentrica* produce concentricol, un triterpenoide, que puede estar involucrado en la morfogénesis del estado sexual de *Daldinia concentrica* (Stadler, M., *et al.*, 2001; Quang, D.N., *et al.*, 2002). Qin, X.D., 2006 reportó que el concentricol presentó actividad anti-HIV y es considerado como un marcador del género *Daldinia*.

Con respecto al género *Clonostachys*, Cota, L.E., 2008 reportó al hongo *Clonostachys rosea* como antagonista del hongo *Botrytis cinérea*, causante de la enfermedad del hongo gris en plantas de fresa. También se ha reportado a *Clonostachys rosea* como antagonista del hongo *Botrytis cinérea*, causante de la enfermedad “*Botrytis blight*” en plantas de rosas (Morandi, M., *et al.*, 2003).

Como se mencionó anteriormente, los aislados fúngicos CHTAM26, CHTAM41, CHTAM86, CHTAM90 y CHTAM100, pertenecientes a los géneros: *Diatrypella*, *Trichoderma*, *Daldinia*, *Clonostachys* y *Biscogniauxia* no se han aislado de *Taxus*, y tampoco se han reportado como productores de paclitaxel. En este trabajo, estos aislados resultaron positivos a paclitaxel por inmunoensayo, sin embargo no se encontraron iones característicos de paclitaxel en análisis por LCMS de extractos orgánicos del cultivo de dichos aislados. Es necesaria una mejor separación de los componentes de estos extractos, antes de realizar nuevos análisis de paclitaxel por LCMS. La presencia de genes de la biosíntesis de paclitaxel, en el DNA de estos hongos, aportaría más datos de su capacidad para producir paclitaxel.

La identificación molecular de los aislados bacterianos: BCHCNZ-246 y BCHCNZ-248, reveló que pertenecen al género *Bacillus*. Bacterias de este género ya han sido reportadas como productoras de paclitaxel (Page, US Pat., 6, 030, 818, 2000).

El análisis filogenético de los aislados BCHCNZ-249, BCHCNZ-284 y BCHCNZ-294, reveló que pertenecen al género *Paenibacillus*. En particular, el aislado BCHCNZ-249 pertenece a la especie *Paenibacillus polymyxa*. Además, este aislado es un bacilo Gram positivo con la habilidad de formar endoesporas. Las endoesporas se observaron después de 72 horas de incubación y la presencia de crestas longitudinales paralelas en la superficie de la espora, (Como se describe en Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) es un criterio conclusivo de la verificación de las esporas de *P. polymyxa*.

P. polymyxa se encuentra naturalmente en suelo, en la rizosfera y coloniza las raíces de sus hospederos. Timmusk, S., *et al.*, 2005, reportó que *P. polymyxa* forma biopelículas en las puntas de las raíces de *Arabidopsis thaliana* y entra en

los espacios intercelulares, pero no invade la planta. Estas rizobacterias son fijadoras de nitrógeno, promotoras del crecimiento de plantas, productoras de fitohormonas, de exopolisacáridos, de enzimas hidrolíticas, de péptidos cíclicos bioactivos como heptadepsin, el cual interactúa con lipopolisacáridos de bacterias Gram negativas (Ohno O., *et al.*, 2004); así como de antibióticos con actividad antifúngica y antibacteriana (Beatty P.H. & Jensen S.E., 2002; Selim S., *et al.*, 2005; Haggags, W.M., *et al.*, 2007; He Z., *et al.*, 2007; Oliveira T., *et al.*, 2008). En 2007, Senthilkumar M., *et al.*, reportaron que *Paenibacillus sp.* HKA-15, inhibió el crecimiento de *Rhizoctonia bataticola*, hongo causante de la enfermedad “charcoal rot” en las plantas de frijol de soya. *P. polymyxa* se ha aislado de la rizosfera de trigo, cebada, White clover, pasto, pino lodgepole, frijol blanco, ajo, entre otros.

Por otro lado, Zhang P. *et al.*, 2008 realizaron la búsqueda del fragmento de 200 pb del gen *dbat* en hongos aislados de *Taxus media* como primer marcador de la capacidad para producir paclitaxel, reportando únicamente la presencia o ausencia del producto de PCR del fragmento en geles de agarosa. El producto de PCR del fragmento de 200 pb del gen *dbat* del aislado BCHCNZ-249, se detectó en geles de agarosa. Sin embargo, falta mandar a secuenciar el producto de PCR obtenido, y compararlo con la secuencia de genes característicos *dbat*, para asegurar que el producto de PCR observado es parte de dicho gen.

A la fecha, no se han reportado bacterias del género *Paenibacillus* aisladas de árboles de *Taxus* en general, ni de *Taxus globosa* en particular. Como en el caso de los aislados fúngicos, encontrados positivos a paclitaxel, es necesaria una mejor separación de los componentes de los extractos del cultivo de estos aislados bacterianos, antes de realizar nuevos análisis de paclitaxel por LCMS y además, la presencia de genes de la biosíntesis de paclitaxel, en el DNA de esta bacteria, aportaría más datos de su capacidad para producir paclitaxel.

Conclusiones

Se aislaron, conservaron y analizaron por inmunoensayo, 73 bacterias y 72 hongos asociados a *Taxus globosa* del Parque Nacional “El Chico”, Hidalgo, México.

Por medio del análisis de inmunoensayo se detectaron 5 aislados bacterianos (BCHCNZ-246, BCHCNZ-248, BCHCNZ-249, BCHCNZ-284, BCHCNZ-294), y 7 aislados fúngicos (CHTAM26, CHTAM32, CHTAM41, CHTAM72, CHTAM86, CHTAM90 y CHTAM100), con capacidad de producir paclitaxel.

La fracción del extracto bacteriano del aislado BCHCNZ-249, que eluye a los 26.4 minutos, muestra el valor de masa/carga 876, característico del aducto de sodio del paclitaxel.

Los aislados bacterianos con potencial para producir paclitaxel y que no han sido reportados son: BCHCNZ-249, BCHCNZ-284 y BCHCNZ-294 y pertenecen al género *Paenibacillus*.

Los aislados fúngicos con potencial para producir paclitaxel y que no han sido reportados son: CHTAM26, (*Diatrypella*); CHTAM41, (*Trichoderma*); CHTAM86, (*Daldinia*); CHTAM90, (*Clonostachys*) y CHTAM100, (*Biscogniauxia*).

Los resultados de inmunoensayo, LCMS y la presencia del producto de la amplificación por PCR de un fragmento característico del gen *dbat*, sugiere que el aislado BCHCNZ-249 *Paenibacillus polymyxa*, tiene la capacidad de producir paclitaxel.

Prospectivas

Se recomienda que los componentes de los extractos tanto de los cultivos de los aislados bacterianos: BCHCNZ-246, BCHCNZ-248, BCHCNZ-284 y BCHCNZ-294; como fúngicos: CHTAM26, CHTAM32, CHTAM41, CHTAM72, CHTAM86, CHTAM90 y CHTAM100, se fraccionen y separen más, antes de ser sometidos a LCMS, para evitar la posible supresión iónica de los iones característicos de paclitaxel, por interacciones con otros compuestos de los extractos bacterianos o fúngicos.

Se recomienda mandar a secuenciar el producto de PCR del fragmento de 200 pb del gen *dbat* del aislado BCHCNZ-249, para comprobar que este fragmento es parte de dicho gen. Además se recomienda, que se busque el gen *dbat* completo, así como otros genes reportados de la biosíntesis de paclitaxel en todos los aislados positivos a inmunoensayo. Estos resultados aportarían más evidencias de que los aislados positivos a paclitaxel, tienen la capacidad de producir paclitaxel.

LITERATURA CITADA

Baloglu E. and Kingston D. G. I. (1999). The taxane diterpenoids. *J. Nat. Prod.* 62:1448-1472.

Baloglu E. (2001). Synthesis and Biological Evaluation of Paclitaxel Analogs. PhD Thesis. Virginia Polytechnic Institute and State University. USA.

Bringi V, Kadkade PG, Prince CL, Schubmehl BF, Kane EJ, Roach B. (1993). Enhanced production of Paclitaxel and taxanes by cell cultures of *Taxus* species. US Patent 5,407,816

Burdsall H. and Dorworth E. (1994). Preserving cultures of woos-decaying Basidiomycotina using sterile distilled water in cryovials. *Mycologia.* 86 (2), pp. 275-280.

Chauviere G., Guenard D., Picot F., Senilh V., Potier P. (1981). Structural analysis and biochemical study of isolated products of the yew *Taxus baccata*. *C. R. Acad. Sci. (Paris).* 293:501-503.

Christen A.A., Bland J., Gibson D. M. (1989). Cell cultures as a means to produce paclitaxel. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 30:556

Christen A. A. *et al.*, (1991), US Patent 50 19504.

Cragg G.M. and K.M. Snader. (1991). Paclitaxel: the supply issue. *Cancer Cells* 3(6): 233-235.

Cragg G.M., Scheparz S. A., Suffness M. (1993). The Paclitaxel supply crisis New NCI policies for handling the large scale production of novel natural product anticancer and anti-HIV agents. *J. Nat. Prod.* 56(10):1657-1668.

Cragg G.M. (1998). Paclitaxel (Paclitaxel®): A success story with valuable lessons for natural product drug discovery and development. *Med. Res. Rev.* 18(5): 315-331.

Croteau R. B., Ketchum R. E. B., Long R., Kaspera R., Wildung M. (2006). Paclitaxel biosynthesis and molecular genetics. *Phytochemistry Reviews.* 5:75-79.

Cusido R.M., J. Palazon, M. Bonfill, A. Navia-Osorio, C. Morales, M. T. Piñol. (2002). Improved Paclitaxel and Baccatin III Production in Suspension Cultures of *Taxus media* *Biotechnol. Prog.* 18: 418-423.

Dong H. R., Luo L. N., Bi P. Y., Zheng Y., and Zhao J. C. (2005). Determination of Paclitaxel, cephalomannine and 7- epi-paclitaxel in *Taxus* by PRP-6 solid phase extraction and high performance liquid chromatography. *Analytical Letters.* 38 (6): 929-937

Edwards U., T. Rogall, H. Blocker, M. Emde, and E. Bottger. (1989). Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. Nucl. Acids Res. 17:7843-7853.

Eisner T. and E.A. Beiring. (1994). Biotic exploration fund- protecting biodiversity through chemical prospecting. BioScience. 44(2):95-98.

Engels F. K., Sparreboom A., Mathat R. A. A., and Verweij J. (2005). Potential for improvement of docetaxel-based chemotherapy: A pharmacological review. British Journal of Cancer. 93:173-177

Fell J. W. (1993). Rapid identification of yeast species using three primers in a polymerase chain reaction. Mol. Mar. Biol.. Biotechnol. 2(3): 174-180.

Fett-Neto AG, Melanson SJ, Sakata K, DiCosmo F. (1993). Improved growth and Paclitaxel yield in developing calli of *Taxus cuspidata* by medium composition modification. Bio/Technology. 11:731-734

Guarro J., *et al.* (1999). Developments in Fungal Taxonomy Clinical Microbiology Reviews. 12(3): 454-500.

Guerrero B., Castillo J., Aguilar M. I., and Delgado G. (2000). 5 α ,7 β ,9 α ,10 β ,13 α -Pentaacetoxy-4(20), 11-Taxadiene (7 β -Acetoxy-Taxusin) and Other Constituents from the Bark of the Mexican Yew, *Taxus globosa* (*Taxaceae*). Revista de la Sociedad Química de México. 44(2): 148-150

Grothaus P.G., Raybould T. J. G., Bignami G. S., Lazo C. B., Birnes J. B. (1993). An enzyme immunoassay for the determination of paclitaxel and taxanes in *Taxus sp.* tissues and human plasma. J. Immunol. Meth. 158: 5-15.

Guo B. H., Kai G. Y., Jin H. B., and Tan K. X. (2006)(a). Paclitaxel synthesis. African Journal of Biotechnology. 5(1):015-020

Guo B. H., Wang Y. C., Zhou X. W., Hu K., Tan F., Miao Z. Q. and Tang K. X. (2006)(b). An endophytic paclitaxel-producing fungus BT2 isolated from *Taxus chinensis var. mairei*. African Journal of Biotechnology. 5(10):875-877

HAWAII BIOTECH, INC. 99-193 Aiea Heights Drive, Room 200, Aiea, Hawaii, USA, 96701 Phone: (808) 486-5333 Fax: (808) 487-7341 E-mail: support@hibiotech.com
MONOCLONAL ANTIBODY-BASED IMMUNOASSAY SYSTEM FOR THE QUANTITATIVE DETECTION OF PACLITAXEL IN BIOLOGICAL MATRICES

Herrera R. M. (1998). Metabolitos secundarios del tejo mexicano (*T. globosa* Schlecht). Tesis de licenciatura. Facultad de Química de la UNAM, México

Hezari, M., Croteau, R. (1997). Paclitaxel biosynthesis: An update. *Planta Med.* 63:291-295.

Hezari M, Ketchum REB, Gibson DM, Croteau RB. (1999). Paclitaxel production and taxadiene synthase activity in *Taxus canadensis* cell suspension cultures. *Arch Biochem Biophys.* 337:185-190

Holton R. A., *et al.* (1994). "First Total Synthesis of Paclitaxel." *Journal of the American Chemical Society.* 23 February 1994: 1597-1598.

Horwitz S.B., Parness J., Schiff P. B., Manfredi J.J. (1982). Paclitaxel: a new probe for studying the structure and function of microtubules. *Cold spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 46: 219-226.

Horwitz S.B. (1994). How to make paclitaxel from scratch. *Nature.* 367: 593-594.

Kerns E. H., Volk K. J., and Hill S. E. (1994). Profiling taxanes in *Taxus* extracts using LC/MS and LC/MS/MS techniques. *Journal of Natural Products.* 57 (10): 1391-1403

Kerns E. H., Volk K. J., Hill S. E., and Lee M. S. (1995). Profiling new taxanes using LC/MS and LC/MS/MS substructural analysis techniques. *Rapid Communications in Mass Spectrometry.* 9 (15): 1539-1545.

Ketchum REB, Gibson DM, Croteau RB, Shuler ML. (1999). The kinetics of taxoid accumulation in cell suspension cultures of *Taxus* following elicitation with methyl jasmonate. *Biotechnol Bioeng.* 62:97-105

Kingston D.G.I. (2001). Paclitaxel, a molecule for all seasons. *Chem. Commun.* 867–880.

Lee M. S. (2001). Spectroscopy methods of analysis – Mass Spectrometry. ENCL. Job number: 100200012: 2545 - 2562

Li J. Y., Sidhu R. S., Bollon A., *et al.* (1998). Stimulation of paclitaxel production in liquid culture of *pestalotiopsis microspora*. *Mycology Research.* 102(4):461-464.

Li J. Y., Strobel G. A., Sidhu R., *et al.* (1996). Endophytic paclitaxel producing fungi from Bald Cypress *Taxodium distichum*. *Microbiology,* 142: 2223–2226.

Long D. A., Smidansky E. D. Archer A. J., *et al.* (1998). In vivo addition of telomeric repeats to foreign DNA generates fungus *pestalotiopsis microspora*. Fungal Genetics and Biology. 24:335-344.

Ma Y. C., Zhao K., Wang S.W., *et al.* (2003). Biological Diversity of Paclitaxel- producing endophytic Fungi. J. Fungal Res. 1(1):28-32.

Mc. Guire, W.P., Rowinsky E. K., Rosenshein N. B., Grumbine F. C., Ettinger D. S., Armstrong D. K. (1989). Paclitaxel: a unique antineoplastic agent significant activity in advanced ovarian epithelial neoplasm. Ann. Intern. Med. 111: 273-279

Madhusudanan K. P. (1995). Alkali metal cationization and its effect on the collision-induced decomposition of Paclitaxel. Journal of Mass Spectrometry 30: 703-707.

Madhusudanan K. P., S.K. Chattopadhyay and S. Srivastava. (2002)(a). Elimination of 118 Da: a characteristic fragmentation in the tandem mass spectra of 11(15 → 1) – *abeo* – taxanes. Journal of Mass Spectrometry 37: 91-98.

Madhusudanan K. P., Chattopadhyay S.K., Tripathi V., Sashidhara K. V. and Kumar S. (2002)(b). MS/MS Profiling of taxoids from the needles of *Taxus wallichiana*. Phytochemical Analysis. 13: 18-30.

Mattina M. J. I., and MacEachern G.J. (1994). Extraction, purification by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic analysis of taxanes from ornamental *Taxus* needles. Journal of Chromatography A. 679: 269-275.

Metz A. M., A. Haddad, J. Worapong, D. M. Long, E. J. Ford, W. M. Hess, G. A. Strobel. (2000). Induction of the sexual stage of *Pestalotiopsis microspora*, a paclitaxel-producing fungus. Microbiology. 146: 2079–2089

Miller R.W., Powell R. G., Smith Jr., Arnold C.R. and Clardy, J., (1981). Antileukemic alkaloids from *Taxus wallichiana*. J. Org. Chem. 46:1469-1474.

Morales J. (2005). Experiencias en la identificación molecular de microorganismos. Tesis de Licenciatura. ENCB, IPN, México.

Nicolaou K. C., Yang Z., Liu J.J, Ueno H., Nantermet P.B., Guy R.K., Claiborne C.F., Renaud J., Couladouros E.A., Paulvannin K., Sorensen E. J. (1994). Total Synthesis of paclitaxel. Nature. 367, 630-634.

Nims, E., Dubois C.P., Roberts S.C., Walker E. L. (2006). Expression profiling of genes involved in Paclitaxel biosynthesis for targeted metabolic engineering. *Metab. Eng.* 8: 385-394.

Nguyen T., Eshraghi J., Gonyea G., Ream R., and Smith R. (2001). Studies on factors influencing stability and recovery of paclitaxel from suspension media and cultures of *Taxus cuspidata* cv *Densiformis* by high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography A.* 911: 55-61.

Noh M.J., Yang J.G., Kim K.S., Yoon Y.M., Kang K.A., Han H.Y., Shim S.B., Park H.J. (1999). Isolation of a novel microorganism, *Pestalotia heterocornis*, producing paclitaxel. *Biotechnology and Bioengineering.* 64(5):620-623

NOM-059-SEMARNAT-2001

NOM-ECOL-059-1994

Norma Oficial Mexicana NOM-ECOL-059-1994

Page M., and Landry N. (1996). Bacterial mass production of taxanes with *Erwinia*, U.S. patent: 5,561,055.

Page Michael, *et al.* (2000). Bacterial mass production of taxanes and paclitaxel. US Patent: 6,030,818.

Parmar S. V., Jha A., Bisht K., Taneje P., Singh S. K., Kumar A., Poonam, Jain R., Olsen C. E. (1999). Constituents of the yew trees. *Phytochemistry.* 50: 1267-1304

Patel R.N. (1998). Tour de Paclitaxel. *Annu. Rev. Microbiol.* 98: 361-395

Prescott L. M. Harley J. P., and Klein, D. A. (1999), *Microbiology*, Mc Graw-Hill. USA.

Rath A. C., Carr C. J., and B. R. Graham. (1995). Characterization of *Metarrhizium anisopliae* strains by carbohydrate utilization (API 50 CH). *J. Invertebr. Pathol.* 65:152–161.

Relman D., (1993). Universal Bacterial 16S rDNA amplification and sequencing. In *American Society of Microbiology. Diagnostic molecular microbiology: principles and applications.* Nueva York. 489-495.

Ridell R. W. (1950). Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycology*. 42: 265-270.

Rossello-Mora R. and Amann R. (2001). *FEMS. Microbiology Reviews*. 25: 39-67

Schiff P.B., J. Fant and S.B. Horwitz. (1979). Promotion of microtubule assembly in vitro by paclitaxel. *Nature* 277:665-667.

Schiff P., Horwitz S. B. (1980). Paclitaxel stabilizes microtubule in mouse fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 77:1561-1565.

Senilh V., Blechert S., Picot F., Pother P., Varenne P. (1984). Mise en evidence de nouveaux analogues du paclitaxel extraits de *Taxus Baccata*. *J. Nat. Prod.* 47:131-137.

Shemluck M. J., Estrada E., Nicholson R., Brobst S. W. (2003). A preliminary study of the taxane chemistry and natural history of the Mexican yew, *Taxus globosa* Schtdl. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 72: 119-127

Shrestha K., Strobel G.A., Shrivastava S. P., Gewali M. B. Evidence for Paclitaxel from three new endophytic fungi of Himalayan Yew of Nepal. (2001), *Planta Med.* 67:374-376.

Soto M., Sanjurjo M., González M. T., Cruz D., Giral F. (2000). El tejo mexicano (*Taxus Globosa* SCH.). Potencial de su aprovechamiento en paclitaxel. *Ciencia ErgoSum*. 7(3):277-279.

Stierle A., G. Strobel, D. Stierle. (1993). Paclitaxel and Taxane Production by *Taxomyces andreanae*, an Endophytic Fungus of Pacific Yew. *Science*. 260: 214-216

Stierle A., G. Strobel and D. Stierle. (1995). The search for a paclitaxel-producing microorganism among the endophytic fungi of the pacific yew, *Taxus brevifolia*. *J. of Natural Prod.* 58(9): 1315- 1324.

Stierle *et al.* (1999). PACLITAXEL production by a microbe. United States Patent No. 5861320. January 1999

Stokvis E. (1977). Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry for the quantitative analysis of anticancer drugs in biological matrices. Ph.D Thesis. Amsterdam, The Netherlands. ISBN: 90-393-3653-9

Stokvis E., 2004. Liquid Chromatography with Tandem mass Spectroscopy for the quantitative análisis of anticancer drugs in biological matrices. Ph.D. Thesis, Ámsterdam. ISBN: 90-393-3653-9.

Strobel G. A., Yang X.S., Sears J., *et al.* (1996)(a). Paclitaxel from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallichiana*. *Microbiology*. 142:435-440.

Strobel G. A., Hess W.M., Ford E., Sidhu R.S., Yang X, (1996)(b). Paclitaxel from fungal endophytes and the issue of biodiversity. *Journal of Industrial Microbiology*. 17:417-423

Strobel G. A., Hess W.M., Li J. Y., Ford E., Sears J., Sidhu R. S., Summerell B. (1997). *Pestalotiopsis guepinii*, a Paclitaxel-producing endophyte of *Wollemia nobilis*.

Strobel G., *et al.* (2001). Paclitaxel production by a microbe. US Patent 6,329,193.

Suffness M. (1995). Overview of paclitaxel research: progress on many fronts. pgs 1-17 in G.I. Georg, T.T. Chen, I. Ojima and D.M. Vyas eds., *Taxane Anticancer Agents: basic science and current status*. ACS Symposium Series 583, Washington D.C.

Thayer A. M., (2003). *Chem. Eng. News*. Jan.13, p 6.

Theodoridis G. and R. Verpoorte (1996). Paclitaxel Analysis by High Performance Liquid Chromatography: A Review. *Phytochemical Analysis* 7: 169-184.

Theodoridis G., Laskaris G., de Jong C. F., Hofte A. J. P., and Verpoorte R. (1998)(a). Determination of paclitaxel and related diterpenoids in plant extracts by high-performance liquid chromatography with uv detection and high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 802: 297-305

Theodoridis G., de Jong C. F., Laskaris G. and R. Verpoorte. (1998)(b). Application of SPE for the HPLC Analysis of Taxanes from *Taxus* Cell Cultures. *Chromatography* 47 (12): 25-34

Walker K. and Croteau R. (2000). Molecular Cloning of 10-deacetylbaocatin III-10-O-acetyl transferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. *PNAS*. 97(2): 583-587.

Walker K., Fujisaki S., Long R., Croteau R. (2002). Molecular cloning and heterologous expression of the C-13 phenylpropanoid side chain-CoA acyltransferase that functions in Paclitaxel biosynthesis. *PNAS*. 99(20): 12715-12720.

Wall M.E. and M.C. Wani. (1995). Paclitaxel: from discovery to clinic. pgs 18-30 in G.I. Georg, T.T. Chen, I. Ojima and D.M. Vyas eds., *Taxane Anticancer Agents: basic science and current status*. ACS Symposium Series 583, Washington D.C.

Wall M. E. (1998). Camphothecin and Paclitaxel: discovery to clinic. *Med. Res. Rev.* 18(5): 299-314.

Wang J., G. Li, H. Lu, Z. Zheng, Y. Huang, W. Su. (2000). Paclitaxel from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei*. FEMS Microbiology Letters 193: 249-253

Wani M. C., Taylor H. L., Wall M. E., Coggon P., McPhail A. T. (1971). Plant antitumoral agents. VI. The isolation and structure of paclitaxel, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. J. Am. Chem. Soc. 93:2325-2327

Wheeler N. C., and Jech K. (1992). Effects of genetic, epigenetic, and environmental factors on paclitaxel content in *Taxus brevifolia* and related species. J. Am. Chem. Soc. 93: 2325-2327.

Wink M., Alfermann AW., Franke R., Wetterauer B., Distl M., Windhoever J., Krohn O., Fuss E., Garden H., Mohaghighzadeh A., Wildi E., Ripplinger P. (2005). Sustainable bioproduction of phytochemicals by plant in vitro cultures: anticancer agents. Gen. Res. 3: 90-100.

Young D.H., Nichelotti E.L., Swendell C.S., and Krauss N.E. (1992). Antifungal properties of Paclitaxel and various analogues. Experientia. 48:882-885.

Yuan H. (1998). Studies on the Chemistry of Paclitaxel. PhD Thesis Virginia Polytechnic Institute and State University.

Yuan J., Jian-Nan B., Bing Y., Xu-Dong X. (2006). Paclitaxel-Producing Fungi: A New Approach to Industrial Production of Paclitaxel, Chinese Journal of Biotechnology. 22(1): 1-6.

Yukimune Y., Tabata H., Higashi Y., Hara Y. (1996), Methyl jasmonate-induced overproduction of Paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. Nat. Biotechnol. 14:1129-1132.

Yvon A. M. C., Wadsworth P., Jordan M. A. (1999). Paclitaxel suppresses dynamics of individual microtubules in living human tumor cells. Molecular Biology of the Cell. 10: 947-959.

Zhang P. Zhou, P., Jiang, C. *et al.*. (2008). Screening of Paclitaxel-producing fungi based on PCR amplification from *Taxus*. Biotechnol Lett. 30:2119-2123.

Zhang P. *et al.* (2009). An edophytic paclitaxel-producing fungus from *Taxus x media*, *Aspergillus candidus* MD3. FEMS Microbiol Lett. 293:155-159

Zhao K., Zhou D., Ping W., Ge J. (2004). Study on the preparation and regeneration of protoplast from paclitaxel-producing fungus *Nodulisporium sylviforme*. Nature and Science. 2(2): 52-59

Zhong J. J. (2002). Plant cell culture for production of paclitaxel and other taxanes. Review. *Journal of Biosciences and Bioengineering* 94(6): 591-599

Zhou DP, Sun JQ, Yu HY, *et al.* (2001). *Nodulisporium*, a genus new to China. *Mycosystem*. 20(2): 277–278.

Zhou D., Zhao K., Ping W., Ge J., Ma X., Jun L. (2005). Study on the mutagenesis of protoplasts from paclitaxel-producing fungus *Nodulisporium sylviforme*. *The Journal of American Science*. 1 (1): 55-62

Zubrod C. G., Schepartz S., Leiter J., Endicott K. M., Carrese L. M., and Baker C. G. (1966). The chemotherapy program of the National Cancer Institute: history, analysis, and plans. *Cancer Chemother. Rep.* 50: 349-350.