



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE
FACULTAD DE QUÍMICA Y BIOLÓGIA
LABORATORIO DE FISIOLÓGIA Y BIOTECNOLÓGIA VEGETAL

Producción de compuestos aleloquímicos en plantas
chilenas cultivadas *in vitro*

INFORME FINAL

PROYECTO FIA BIOT 01-A-22

II. RESUMEN EJECUTIVO

El **objetivo general** de este proyecto fue desarrollar un programa para la obtención de compuestos Aleloquímicos en plantas chilenas cultivadas *in vivo* e *in vitro*.

Los **objetivos específicos** fueron: i) optimizar metodología para la obtención de biomasa vegetal a partir de especies nativas de canelo (*Drymis winteri*), pintoa (*Pintoa chilensis*), boldo (*Peumus boldus*), pucheá (*Tessaria absinthioides*) y patagua (*Myrceugenia planipis*). ii) Implementar metodologías para la obtención de extractos bioactivos de especies nativas cultivadas *in vitro*, iii) Desarrollar bioensayos para la evaluación de la actividad aleloquímica de los extractos vegetales obtenidos. iv) Determinar la actividad alelopática de los extractos vegetales. V) Evaluar las propiedades antifúngicas de los extractos vegetales. vi) Aislar e identificar el o los principios activos en los extractos. vi) Transferir la tecnología desarrollada, y viii) Proteger la propiedad intelectual de los resultados del proyecto.

Los resultados del proyecto son:

- Se dispone de cultivos *in vitro* de todas las especies comprometidas a analizar, entre las que destacan las especies nativas. *Boldo*, *Canelo*, *Pintoa*, *Patagua*.
- Se dispone de extractos capaces de controlar malezas, lo que permitirá su formulación como herbicidas naturales, previa evaluación de aspectos no considerados en este proyecto tales como su toxicidad, estabilidad, etc.
- Se dispone de extractos capaces de controlar al control de *Botrytis cinerea*. Extractos de dos de las especies estudiadas son capaces de inhibir la germinación de esporas y el desarrollo micelial del hongo.
- Se dispone de extractos capaces de inhibir la actividad de la enzima lacasa de *B. cinerea*. Esto genera grandes expectativas de control a nivel de postcosecha.
- También se han caracterizado extractos de las especies en términos de identificar el o los principios activos.
- Se logró la obtención de plantas crecidas en macetas a partir de los cultivos *in vitro*.
- Se dispone de algunos ejemplares de Boldo, Patagua y Canelo
- Se ha presentado la solicitud de patente para resultados obtenidos con *Pluchea*. Se trabaja en la elaboración de documentos para proteger resultados obtenidos con *Boldo* y *Pintoa*.

III. TEXTO PRINCIPAL

La demanda actual por productos agrícolas de alta calidad y bajos precios, impide la práctica de la agricultura sostenible. El aumento de las producciones agrícolas ha sido acompañado de la utilización masiva y en muchos casos indiscriminada de plaguicidas y fertilizantes, que provocan diversos problemas ambientales.

Entre los métodos de prevención de la aparición de malezas, que compiten y reducen rendimientos, el uso de herbicidas continua siendo el componente más importante a la hora de incrementar el rendimiento de las cosechas. Sin embargo, el uso continuo de agroquímicos en áreas de monocultivo ha conducido a la aparición en varios lugares del mundo de malezas tolerantes y resistentes a muchos herbicidas, lo que en definitiva se ha traducido en un aumento de costos de producción y mayor impacto ambiental debido a problemas de contaminación de suelos y aguas. Una situación similar se observa frente al uso de fungicidas, que en nuestro país se utilizan fundamentalmente en el cultivo de frutas como la vid.

Frente a la problemática descrita, los productos naturales representan una fuente cierta de potenciales productos agroquímicos, debido a su diversidad en estructuras químicas, su acción natural biológica específica y su carácter inocuo sobre el medio ambiente.

Chile presente una flora nativa única y exclusiva, con especies que solo crecen en el país, y que puede constituirse en una fuente importante de principios Aleloquímicos. Sin embargo, la sobre-explotación de una determinada especie podría ocasionar su desaparición.

Frente a la posibilidad de utilizar comercialmente una especie nativa y de asegurar la preservación de un determinado recurso, el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, surge como una alternativa viable. En este proyecto se desarrollaron metodologías que permiten la eficiente obtención de compuestos aleloquímicos y la preservación de germoplasma de plantas nativas. A partir de este proyecto se incorporará valor agregado a plantas nativas productoras de aleloquímicos.

IV Cumplimiento de los objetivos del proyecto: En este proyecto se dio cumplimiento a casi la totalidad de los objetivos planteados. El único tipo de ensayos que no pudo realizarse es aquel que pretendía evaluar los efectos de los extractos sobre *Uncinula necator*. Esto debido fundamentalmente a las dificultades metodológicas que significa cultivar el hongo. La Universidad no dispone de la infraestructura necesaria para estos ensayos. Sin embargo, en un futuro cercano se iniciara una colaboración con el INIA a fin de evaluar los extractos en *U.necator*.

Los resultados obtenidos se agrupan en los siguientes ítems:

OBJETIVO 1. optimizar metodología para la obtención de biomasa vegetal a partir de especies nativas de canelo (*Drymis winteri*), pintoa (*Pintoa chilensis*), boldo (*Peumus boldus*), pucheá (*Tessaria absinthioides*) y patagua (*Myrceugenia planipis*).

IVa. Cultivo *in vitro* de las especies. El cultivo *in vitro* de las especies seleccionadas se realizó utilizando como base el medio MS, modificado según corresponda para cada especie. Se muestra acá un resumen de estos resultados.

El medio de cultivo utilizado se muestra en la tabla siguiente.

MEDIO DE CULTIVO MURASHIGE Y SKOOG (MS)

Nutriente	mg/litro
NH ₄ NO ₃	1650
H ₃ BO ₃	6,2
CaCL ₂	332,2
CoCL ₂ *6H ₂ O	0,025
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,025
Na ₂ EDTA*2H ₂ O	37,26
FeSO ₄ *7H ₂ O	27,8
MgSO ₄	180,7
MnSO ₄	16,9
Na ₂ MoO ₄	0,25
KI	0,83
KNO ₃	1900
KH ₂ PO ₄	170
ZnSO ₄ *7H ₂ O	8,6
Glicina	2
Mio-Inositol	100
Ac.Nicotinico	0,5
Tiamina*Hcl	0,1
Sacarosa	25000
Agar	8000
PH	5,8

Además, se utilizaron medios preparados. En este caso trabajamos con el medio base MS suplementado con Biotina 0,1 mg/L, Cinetina 0,2 mg/l y BAP 0,3 mg/L. En lugar de

sacarosa analítica se utiliza sacarosa comercial IANSA. Los frascos con los explantes fueron mantenidos en cámaras de cultivo a 23 ± 2 °C, un fotoperíodo de 16/8 horas luz: oscuridad y una humedad promedio de 85.

Pluchea absinthiodes. Especie muy común en suelos húmedos y salinos. De esta planta se utilizan infusiones para controlar el colesterol. La familia Plucheaceae esta constituida por 28 generos y alrededor de 250 especies. La investigación de esta familia ha demostrado que algunas especies presentan propiedades alelopáticas.

El cultivo *in vitro* se inicio a partir de plantas colectadas en la localidad de la Cruz, V región. Los ejemplares fueron identificados en el Museo de Historia Natural y se deposito un individuo en el herbario.

Las fotos muestran cultivos de esta especie al cabo de 1 mes. Esta resultado una especie relativamente fácil de cultivar *in vitro*. Se obtuvo un índice de multiplicación igual a 8. Los subcultivos se replicaron con lapsos de 1 mes.



Cultivo *in vitro* de *Pluchea absinthiodes*

Drymis winteri. El canelo es una de las especies de la Familia Winteraceae. Esta Familia compuesta por 4 géneros y 60 especies distribuidas en América del Sur, Madagascar, Australia y Nueva Guinea. En Chile esta representada por 3 especies del género *Drimys*. La madera es de buena calidad y fácil de trabajar, con ella se fabrican instrumentos musicales y madera de construcción. La corteza es utilizada para combatir el escorbuto, también contiene vitamina C, taninos, aceites esenciales, sustancias antibacterianas y sales de fierro y calcio.



Cultivo *in vitro* de *Drymis winteri*

Esta planta relativamente difícil de cultivar *in vitro*, pues presenta un índice de multiplicación igual 3. Las plántulas sin embargo, presentan un buen crecimiento lo que permite obtener una biomasa adecuada en lapsos de 40 días.

Peumus boldus. Especie perteneciente a la familia Monimiaceae. Esta familia comprende árboles, arbustos o enredaderas, siempreverdes y compuesta de 34 géneros con un total de 440 especies.

En Chile esta representada por 3 géneros nativos, uno de los cuales, *Peumus*, es monotípico y endémico de Chile.

Las hojas son utilizadas como infusiones, además contienen numerosas sustancias químicas muy cotizadas en la industria farmacológica. La corteza, rica en taninos y se utiliza en curtiembre. El fruto es comestible.



Los cultivos de boldo resultaron muy difíciles en un comienzo, sin embargo, una vez que se logró inducir la formación de brotes en un medio suplementado con antioxidantes, se obtuvo un muy buen índice de multiplicación equivalente a 8.

Pintoa chilensis Especie endémica de la III región. Ha sido clasificada en peligro de extinción. Resulta una especie de crecimiento relativamente lento. Se obtuvo un índice de multiplicación igual a 4. Perteneció a la Familia de las Zhiophyllaceae.



Myrcegenia planipis (Crynodendron patagua). Planta perteneciente a la familia ELAEOCARPACEAE. Esta familia está compuesta por 9 géneros y cerca de 540 especies.

En Chile la familia está representada por dos géneros y 3 especies. Especie Ornamental, Melífero, Reforestación. Especie de rápido crecimiento. Los taninos de la corteza se utilizan en curtiembres. La madera se utiliza en mueblería.



Patagua cultivada *in vitro*.

Esta especie presenta rápido crecimiento *in vitro*. El índice de multiplicación obtenido igual a 8 y la rápida elongación permiten obtener una buena cantidad de biomasa en periodos de tiempo cortos.

Se dispone además, de algunos ejemplares de patagua, boldo y Pintoa en condiciones de invernadero

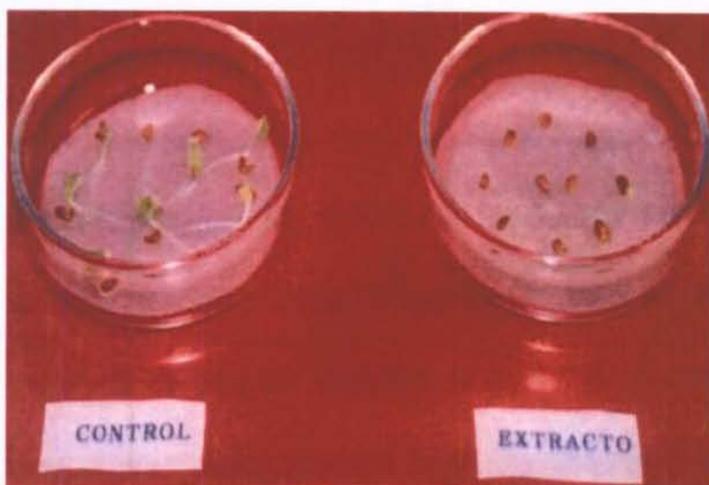
OBJETIVO 2. Implementar metodologías para la obtención de extractos bioactivos de especies nativas cultivadas *in vitro*.

Se analizarán dos metodologías de extracción de los principios activos por difusión y macerando en nitrógeno líquido. En ambos casos se utilizaron como solvente agua y etanol 85%. Los resultados obtenidos muestran que se obtienen más principios activos cuando se macera en tejido en N_2 líquido y luego se extrae con el solvente.

OBJETIVO 3. Desarrollar bioensayos para la evaluación de la actividad aleloquímica de los extractos vegetales obtenidos.

Los bioensayos implementados para dar cumplimiento a este objetivo fueron el ensayo de germinación en placas Petri y el ensayo de la enzima α -amilasa.

El ensayo de la germinación consiste en colocar a embeber durante dos horas semillas de plantas indicadoras en agua o en agua mas el extracto que se pretende probar. Se dejan las placas en una cámara a 23 ± 2 °C hasta 72 hrs y se evalúa el porcentaje de germinación. Se considera una semilla germinada cuando su raíz tiene un tamaño ≥ 5 mm



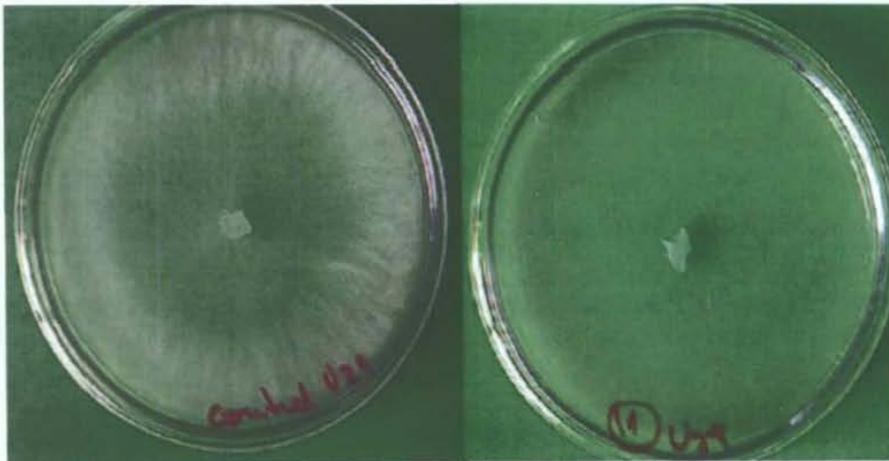
Ensayo de germinacion.

El ensayo de la enzima α -amilasa consiste en preparar placas Petri conteniendo una capa de almidón al 1% disuelto en agua o en los extractos a analizar. Sobre la capa de almidón se colocan mitades de semillas con embrión. El embrión produce acido giberelico que induce la síntesis de la enzima α -amilasa. Esta enzima degrada el almidon. Para revelar el ensayo se agrega a la placa una solución de lugol que reacciona con el almidón. En aquellas zonas donde este sustrato fue degradado se genera un halo incoloro. El ensayo se evalúa determinado el tamaño de los halos en semillas control y el tamaño de los halos en las semillas en presencia de los extractos.



Ensayo de la enzima α -amilasa

El bioensayo para determinar el efecto de los extractos en hongos, se basa en el típico crecimiento de micelio en condiciones *in vitro*. Se preparan placas con agar papa-dextrosa a las cuales se agregan diferentes concentraciones de los extractos a analizar. Luego se siembra en la placa un trozo de agar con micelio del hongo. Se deja a 37 °C y de evalúa el desarrollo del las hifas.



Bioensayo para evaluar efecto de productos naturales en hongos.

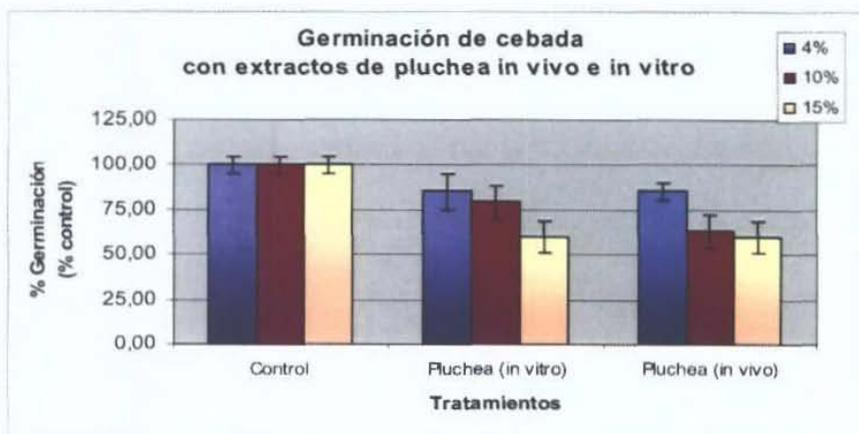
OBJETIVO 4 Determinar la actividad alelopática de los extractos vegetales.

II. Efecto de extractos sobre la germinación.

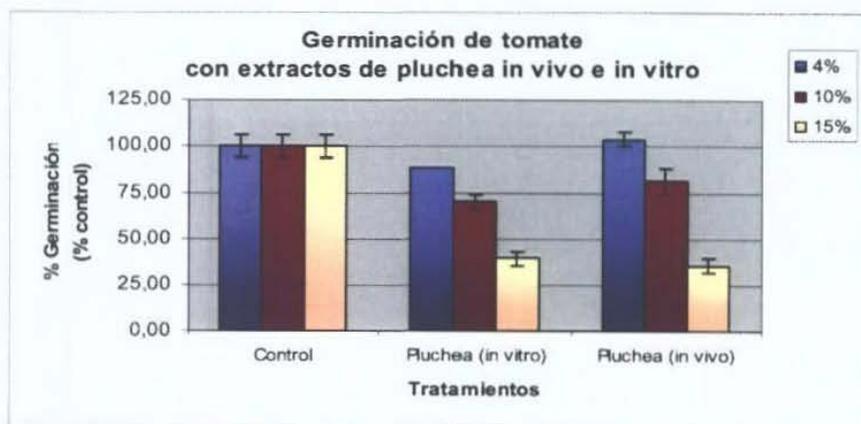
A Continuación se muestran los resultados obtenidos para cada una de las especies estudiadas.

Pluchea absinthiodes.

Se obtuvieron extractos acuosos de *P. absinthiodes*, provenientes de cultivo *in vitro* y liofilizados de plantas colectadas en terreno. La Figura muestra que en ambos casos hubo inhibición de la germinación. Resulta interesante destacar que ambos extractos muestran una actividad equivalente sobre cebada.

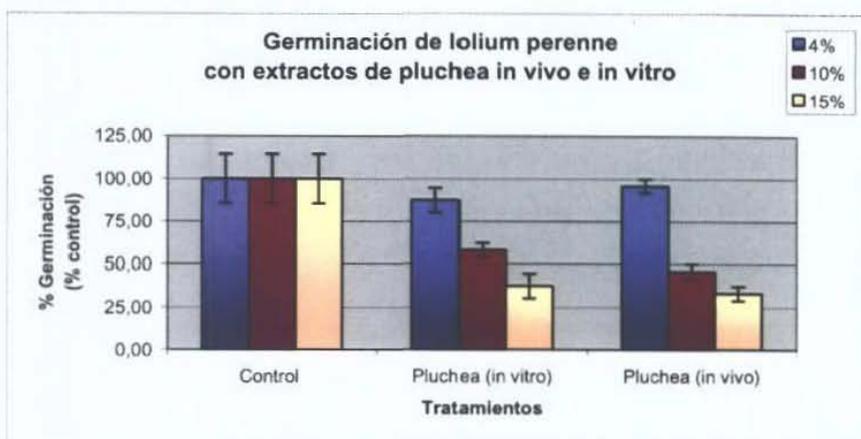


La Figura siguiente muestra los efectos de ambos extractos sobre tomate.



Se observa que el efecto es equivalente en ambos casos, siendo mayor que al obtenido con cebada.

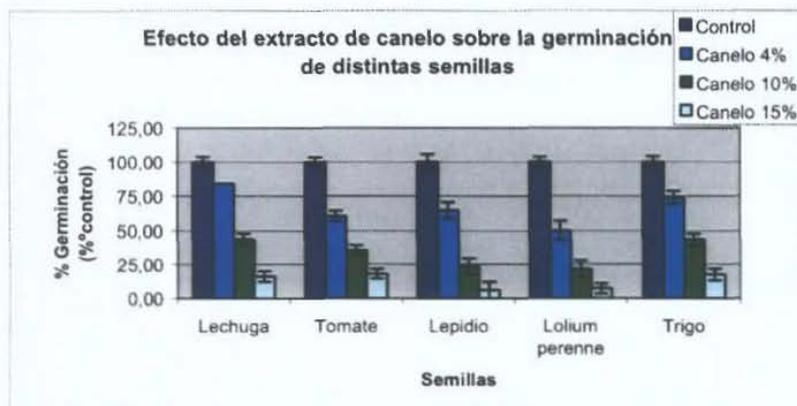
Como una forma de ver los efectos de los extractos sobre malezas que puedan afectar a los cultivos de interés, se selecciono como modelo la planta *Lolium perenne*.



Al comparar los efectos de estos extractos sobre cebada y *Lolium*, ambas monocotiledóneas, se puede concluir que *Lolium* es mas afectada.

Drymis winteri.

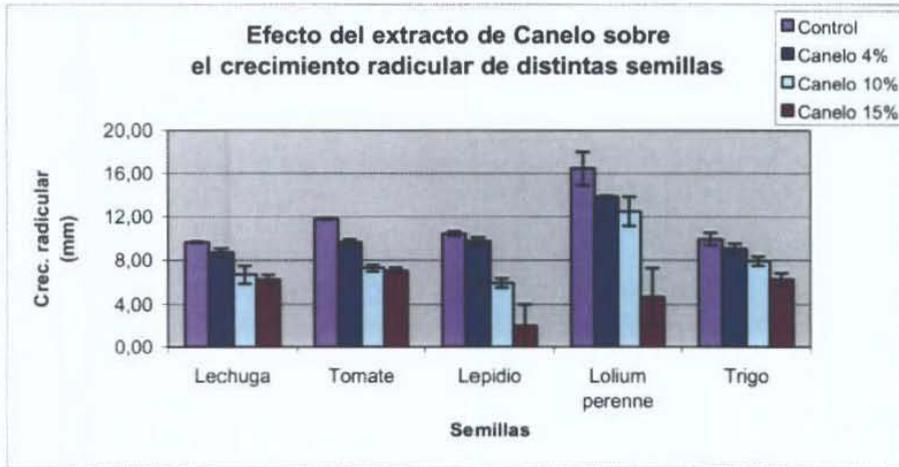
Efecto de extractos acuosos de canelo sobre la germinación de semillas. La figura siguiente resume los resultados obtenido al evaluar el efecto de extractos acuosos de canelo sobre la germinación de semillas de diferentes especies.



Se observa que los extractos inhiben la germinación de todas las semillas utilizadas, siendo las más susceptibles a una concentración del 10% p/v, *Lepidio* y *Lolium*.

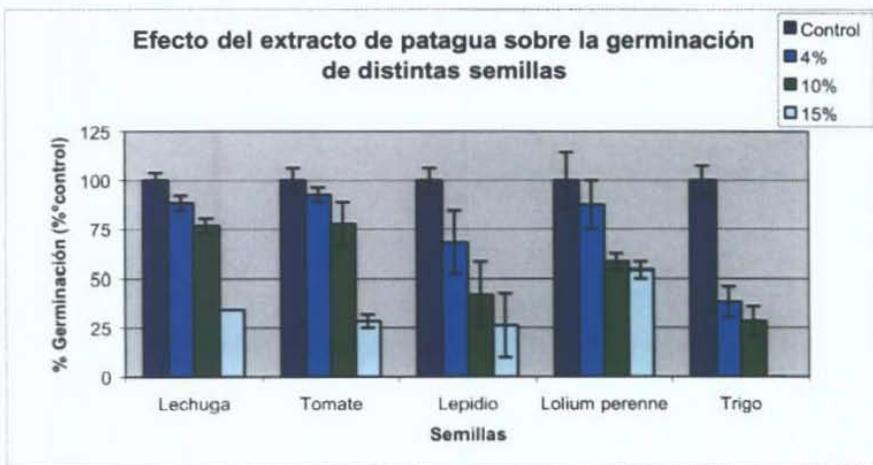
III. Efecto de los extractos sobre el crecimiento radicular.

La figura siguiente resume el crecimiento radicular de las semillas que germinaron en presencia de los extractos. Nuevamente se observa que *Lepidio* y *Lolium* son afectados a altas concentraciones del extracto. Esto sugiere que estas plantas si bien germinan, no desarrollan un sistema radicular adecuado al crecimiento.



Myrcegenia planipis.

Efecto de extractos acuosos de patagua sobre la germinación de semillas. La figura siguiente resume los resultados obtenidos al evaluar los efectos de extractos acuosos de patagua sobre la germinación de diferentes semillas.

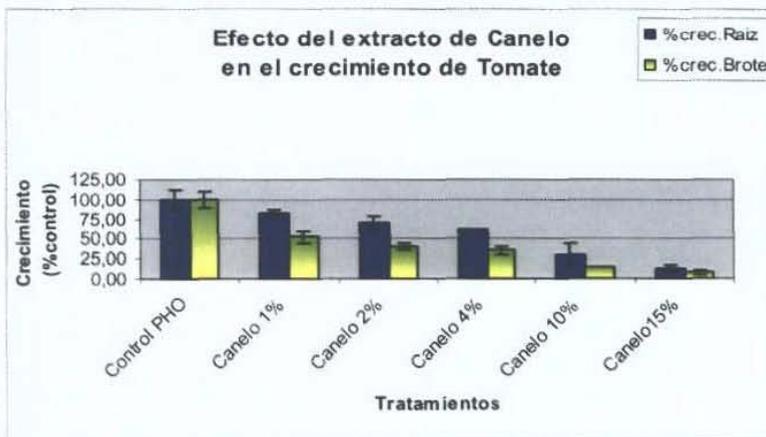
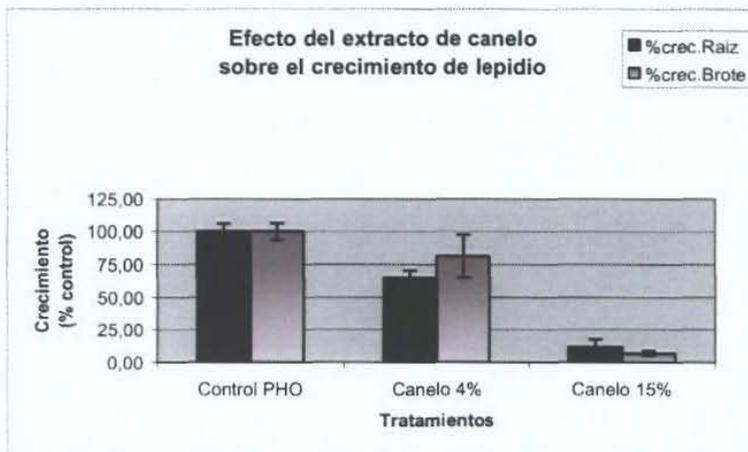


Con extractos acuosos de patagua, la especie mas afectada fue el trigo pues a una concentración de 15% p/v no hubo germinación. El resto de las especies son afectadas de manera diferencial.

IV. Efecto sobre el crecimiento de plantas.

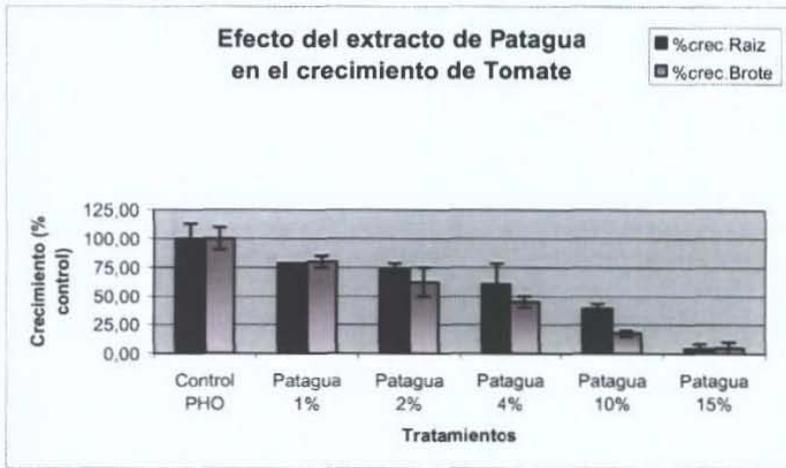
Drymis winterii

Para esta especie se muestra el efecto sobre el crecimiento de dos de las plantas usadas, Lepidio y tomate. El crecimiento de ambas especies de ve inhibido de manera significativa a una concentración de 15% p/v.



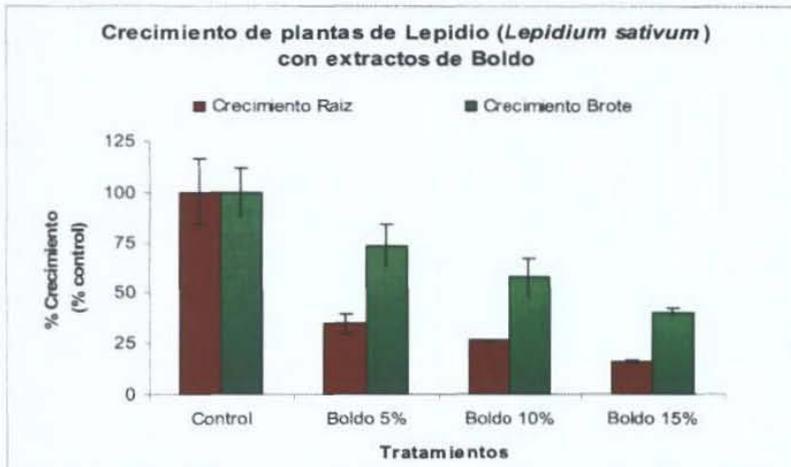
Myrcegenia planipis

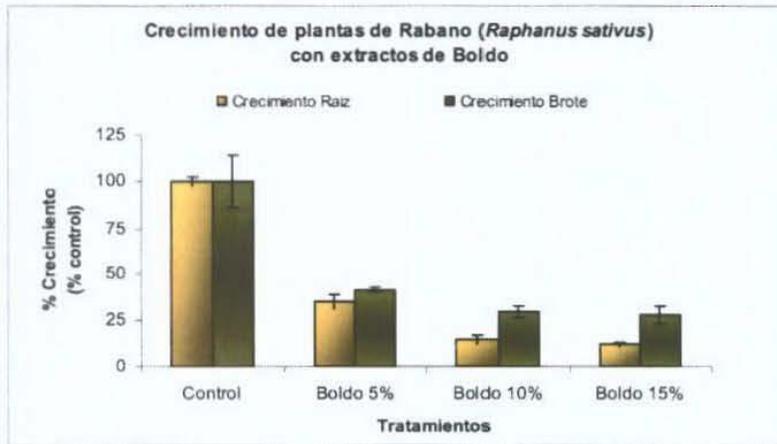
Para esta especie se muestra los resultados obtenidos con el crecimiento de tomate y *Lolium perenne*



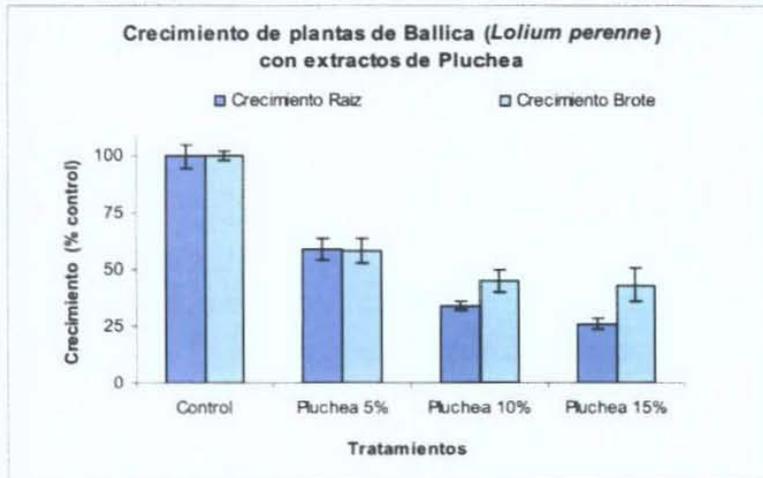
El crecimiento de los brotes de tomate se vio afectado de manera significativa a partir de una concentración equivalente al 4%.

Peumus boldus. El crecimiento de brotes de lepidio y rábano fue afectado por el extracto de boldo de manera significativa





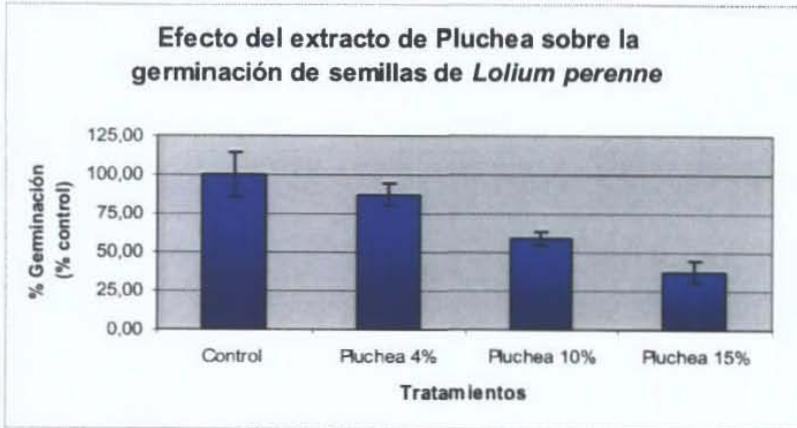
Pluchea absinthiodes. Extractos de *Pluchea* inhiben el crecimiento de ballica.



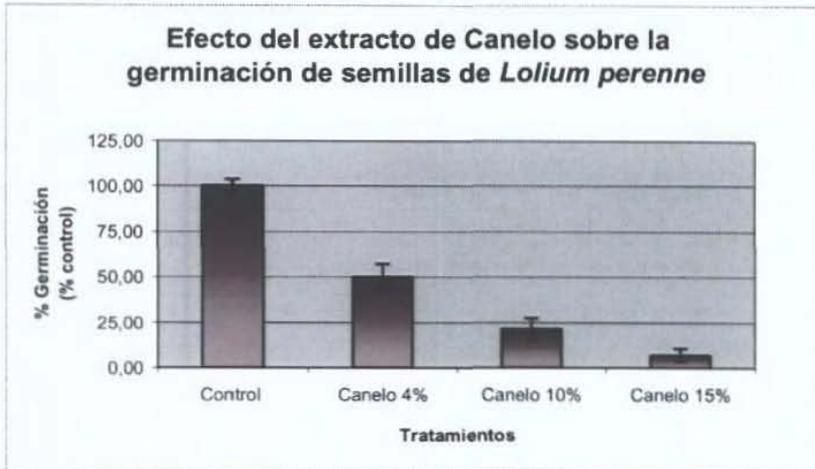
V. Efecto de extractos sobre semillas de malezas

a) *Lolium perenne*.

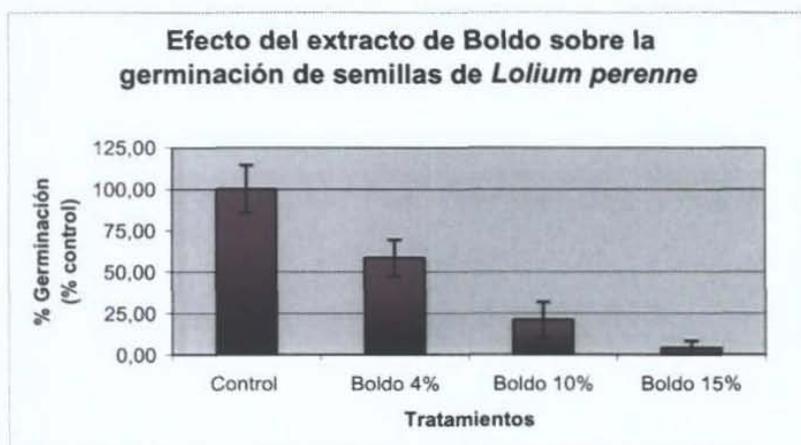
Pluchea absinthiodes. Se observa que los extractos de pluchea inhiben la germinación de *L. perenne*



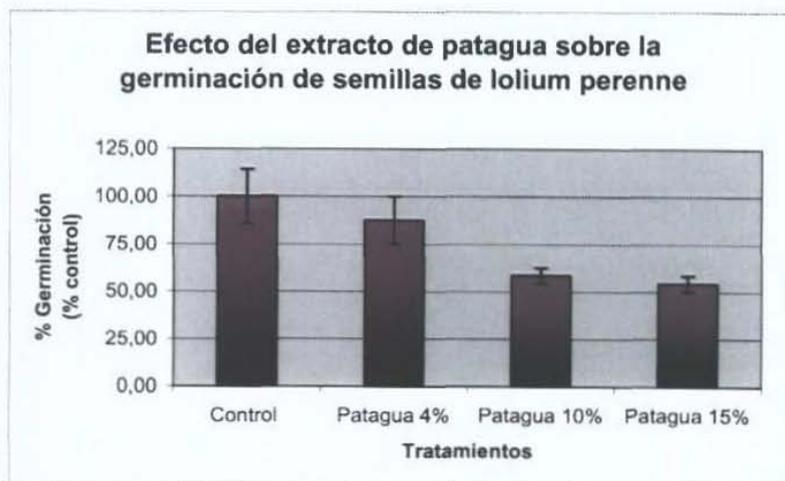
***Drymis winteri*.** Los extractos de canelo muestran un fuerte efecto inhibitorio de la germinación de *L. perenne*



Peumus boldus. Los extractos de boldo tienen un efecto muy significativo sobre la germinación de *L. perenne*.



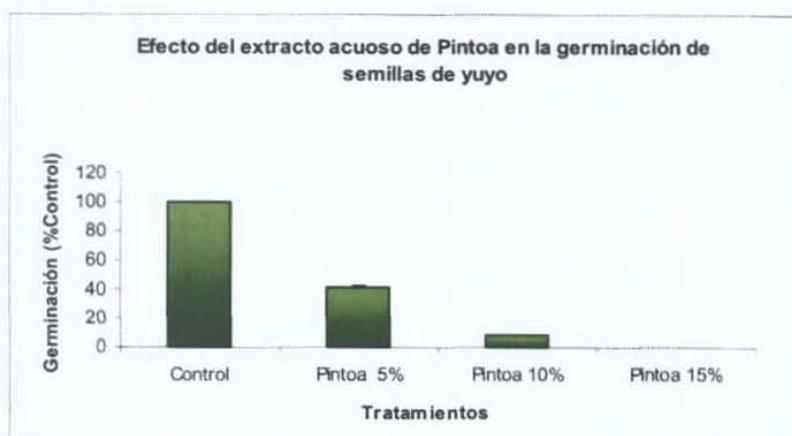
Myrcegenia planipis. Los extractos de patagua mostraron un efecto inhibitor inferior al observado con canelo y boldo



Al comparar los efectos de los 4 extractos, se puede concluir que el extracto de boldo, es el que presenta mayor capacidad inhibitoria de la germinación de *L. perenne*

b) *Brassica rapa* (yuyo)

Pintoa chilensis. El extracto de pintoa mostró un fuerte efecto inhibitor de la germinación de semillas de yuyo.

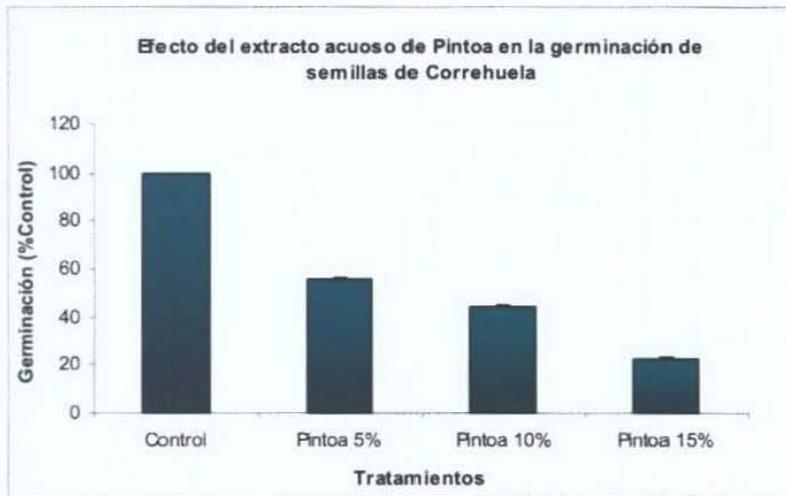


Peumus boldus. El extracto de boldo inhibió la germinación de semillas de yuyo de manera significativa, a una concentración de 15% p/v no hubo germinación.

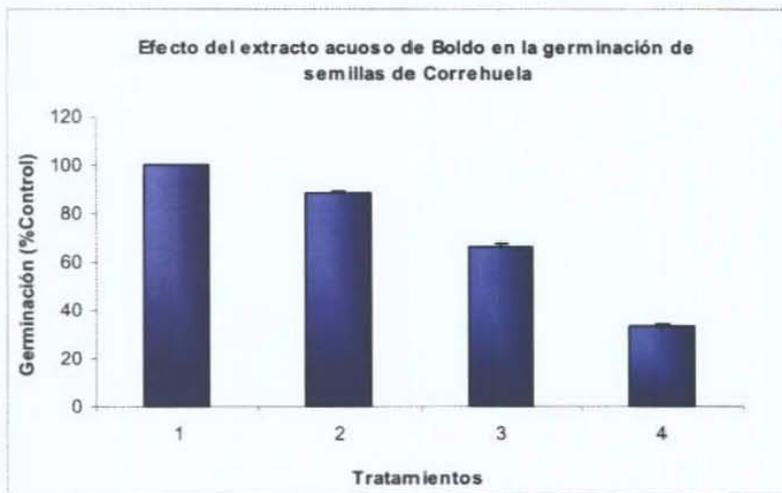


c) *Convolvulus arvensis* (correhuela)

Pintoa chilensis. El extracto de *Pintoa* mostró un efecto inhibitor de la germinación de semillas de correhuela.



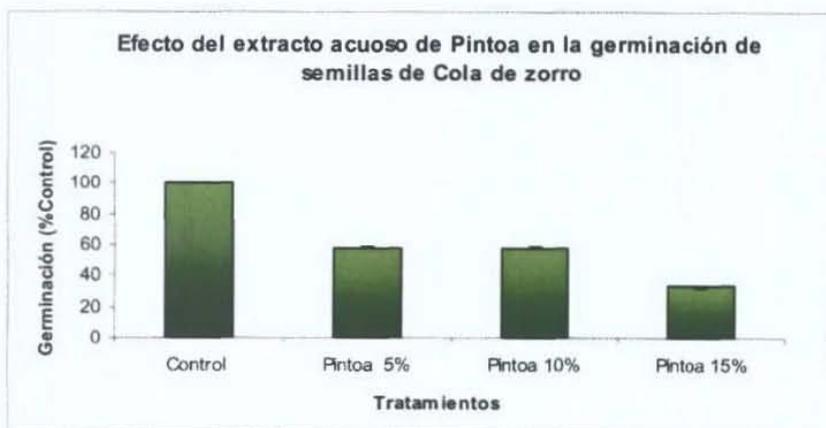
Peumus boldus. El extracto de boldo inhibió la germinación de semillas de correhuela.



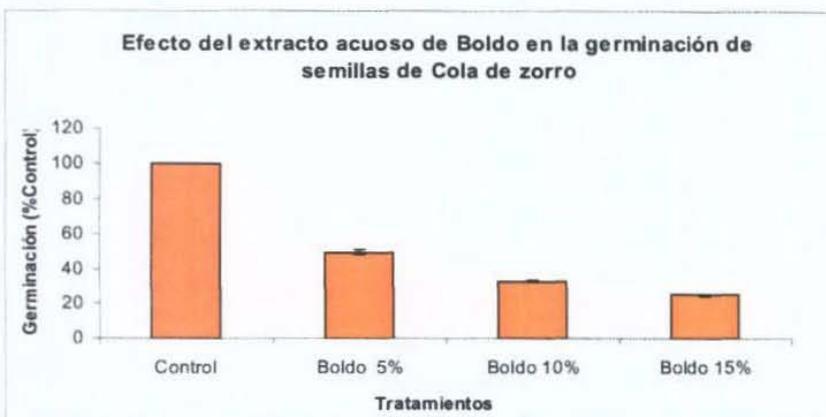
Se observa que ambos extractos tuvieron un efecto similar en la inhibición de la germinación de semillas de correhuela.

d) *Cynosurus echinatus* (Cola de Zorro)

***Pintoa chilensis*.** El extracto de *Pintoa* inhibió la germinación de semillas de cola de zorro.



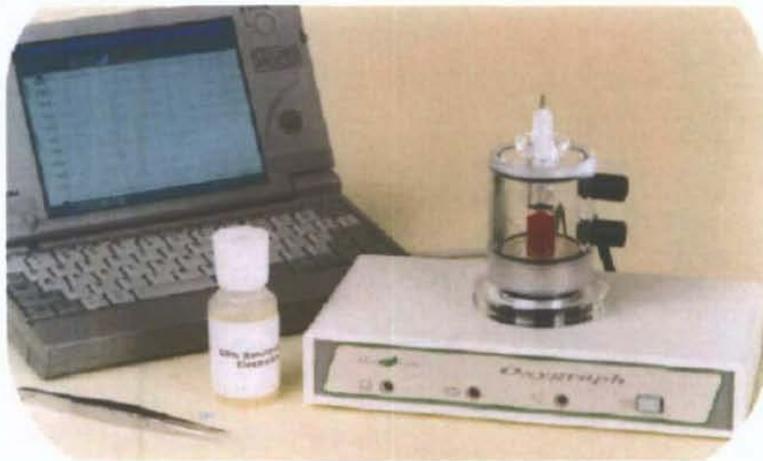
***Peumus boldus*.** El extracto de boldo inhibió la germinación de semillas de cola de zorro.



Se observa que el extracto de boldo presento una mejor actividad inhibidora de la germinación que el extracto de pintoa.

VI. Efecto de extractos sobre mitocondrias y cloroplastos aislados.

Durante este periodo se ha puesto en marcha el uso de un oxígrafo, equipo que permite medir consumo y/o producción de oxígeno en organelos aislados.



La cámara mide el oxígeno disuelto en una solución

Con la ayuda de este equipo se logró evaluar el efecto de los extractos sobre mitocondria y cloroplastos aislados.

Aislamiento de mitocondrias: Para aislar mitocondrias se utilizó la metodología descrita.

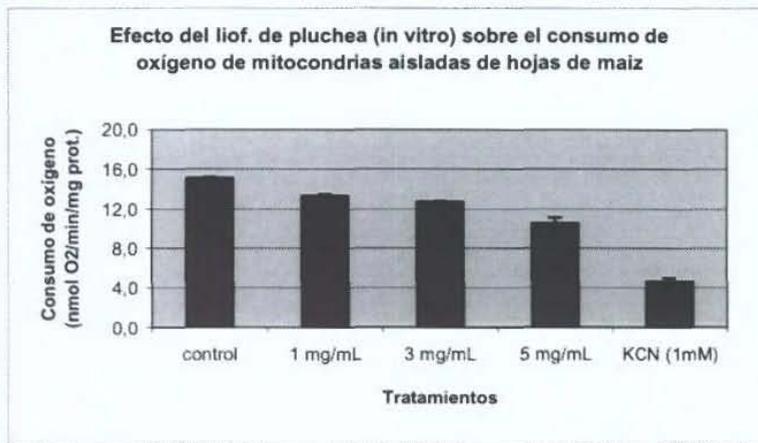
- Plantas de 10 días se maceran en frío en buffer de extracción que contiene (sacarosa 0.25 M, EDTA 1 mM, BSA 2 mg/mL, tris-HCl 10 mM pH 7.6).

- Se filtra y centrifuga a 2000 g por 15 min.

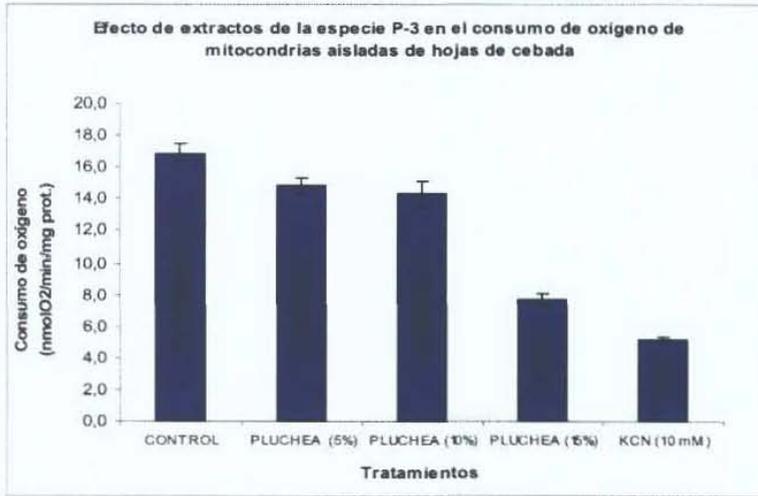
- El sobrenadante se centrifuga a 10000 g por 20 min.

- El pellet se resuspende en buffer mitocondrial que contiene (sacarosa 0.25 M, KCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM, NaH₂PO₄ Na₂HPO₄ 10 mM pH 7.4). Concentración de proteínas 2.8 mg/mL.

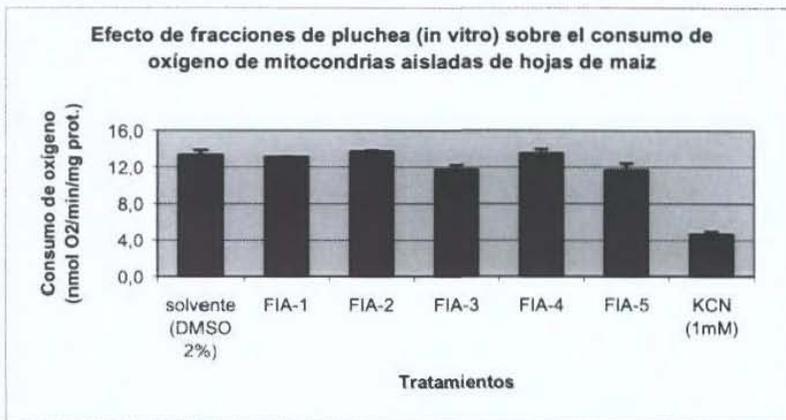
***Pluchea absinthiodes*.** La figura muestra el efecto de diferentes concentraciones de liofilizado de pluchea sobre el consumo de oxígeno de mitocondrias de maíz aisladas. Se observa que el efecto es significativo solo a una concentración de 5 mg/ml. Se puede sugerir que el efecto inhibitorio de esta planta no está relacionado con este proceso.



La figura siguiente muestra el efecto de extractos de *Pluchea* a diferentes concentraciones. Se observa que la inhibición del consumo de oxígeno aumenta con la concentración del extracto.

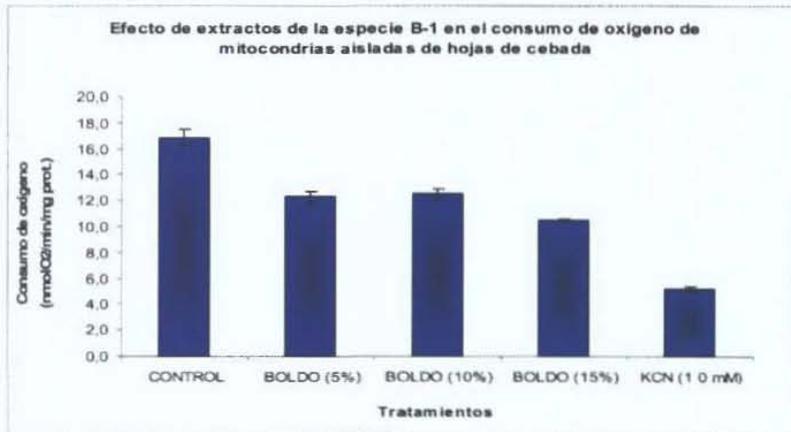


Del extracto inicial se obtuvieron diferentes fracciones cuya actividad se muestra en la figura siguiente.

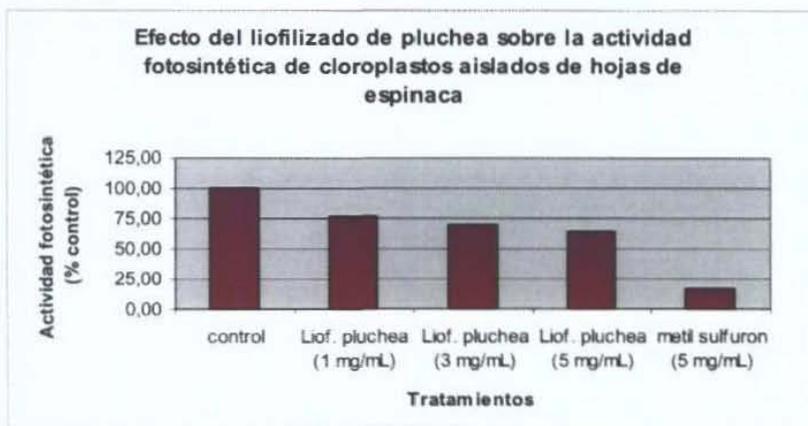


Se puede concluir que ninguna de las fracciones es capaz de inhibir el proceso de respiración mitocondrial. Esto sugiere que en el extracto inicial existen moléculas que se potencian en su actividad.

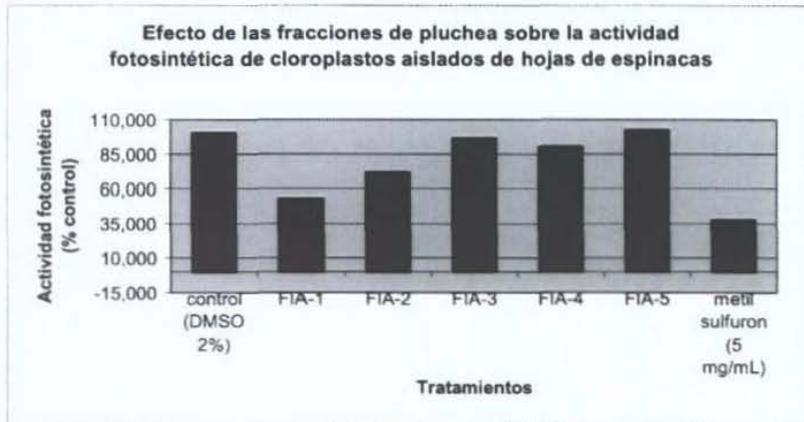
Peumus boldus. Los extractos de boldo muestran una inhibición de la actividad respiratoria que no depende de la concentración del extracto.



Efecto de extractos sobre cloroplastos aislados. La figura muestra el efecto de un liofilizado de pluchea sobre la actividad de cloroplastos. Se observa que hay un efecto inhibitorio del proceso que no es dosis dependiente, dado que las diferencias entre 3 y 5 mg/ml son poco significativas.



Al fraccionar el extracto inicial de pluchea se obtuvieron los siguientes resultados. Se observa que la fracción 1 reduce la producción de oxígeno en casi un 50% y la fracción 2 casi un 30%. Estos resultados permiten sugerir que la actividad del extracto inicial estaría en estas dos fracciones mayoritariamente.



En la figura siguiente se resumen los efectos de extractos de las distintas especies en estudio sobre la actividad de cloroplastos aislados. De los resultados mostrados se puede concluir que a una concentración equivalente al 4% p/v boldo y *pluchea* inhiben la actividad de cloroplastos aislados, mientras que patagua y canelo la estimulan.

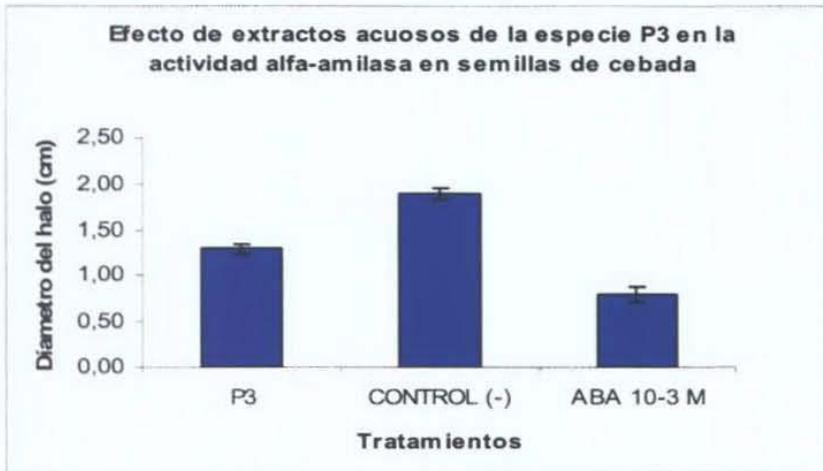


V. Efecto sobre la actividad de la enzima α -amilasa

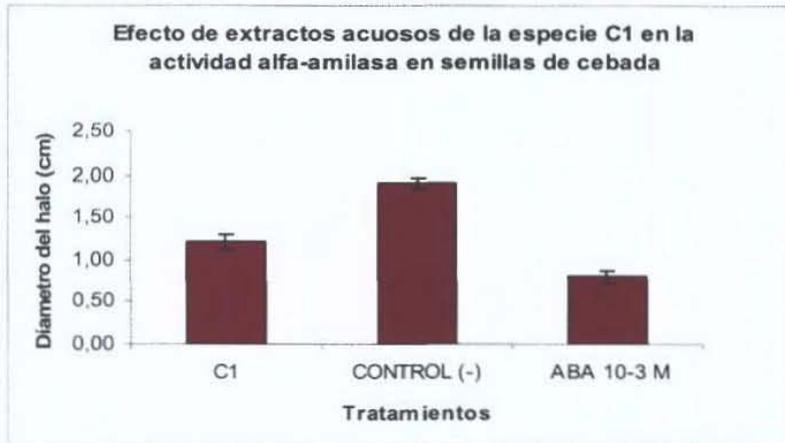
Peumus boldus. El extracto de boldo mostró un efecto inhibitorio de la actividad α -amilasa semejante al ejercido por ABA, conocido inhibidor de la germinación



Pintoa chilensis. El extracto de pintoa inhibió de manera significativa la actividad de la α -amilasa.



Drymis winteri. El extracto de canelo inhibió la actividad de la α -amilasa



El efecto de los extractos sobre la actividad de la α -amilasa, puede explicar el efecto observado sobre la germinación. Esta enzima es clave en la hidrólisis del almidón durante los primeros estadios del proceso.

OBJETIVO 5. Evaluar las propiedades antifúngicas de los extractos vegetales

***Botrytis cinera*.** En la actualidad se ha logrado obtener 5 cepas obtenidas de material proveniente de diferentes viñas del valle del Maipo. Además, se dispone de una cepa aislada de uva que ha permitido realizar ensayos preliminares.

Obtención de cepas de *B. cinerea*

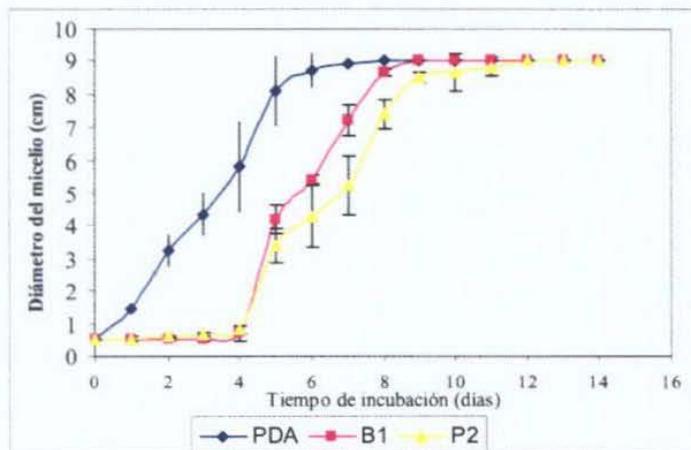
Se dispone de 5 cepas aisladas de uvas infectadas por el hongo y fue purificada de manera que cada cepa utilizada proviene de un conidio. El crecimiento y mantención del hongo se realizó de la siguiente manera: El hongo ha sido crecido en el medio de cultivo agar papa-dextrosa y mantenido en tubos inclinados. Para la obtención de esporas las placas fueron incubadas a 10 cm de distancia de tubos fluorescentes F15T8 BLB con un espectro de emisión de 310-410 nm. Se realizan subcultivos periódicos a fin de mantener el hongo activo.

Efecto de diferentes extractos sobre *B. cinerea*. Se probaron extractos provenientes de de pintoa y boldo mantenidas en cultivo *in vitro*. Esta técnica asegura la disponibilidad de

materia prima sin restricciones. La solución que mejor resultado ha presentado es la de concentración 4% p/v, esto es 4 g de tejido en 100 g de solvente. De esta solución se prepararon disoluciones al 5, 10 y 20% v/v y de determinó su efecto sobre el desarrollo del micelio. La figura muestra los resultados obtenidos al evaluar la cepa U29 de vides. En la placa de la izquierda en un tiempo de 4 días el micelio cubre totalmente la placa, mientras que en el mismo periodo de tiempo en presencia del extracto al 4% no se observa crecimiento micelial.

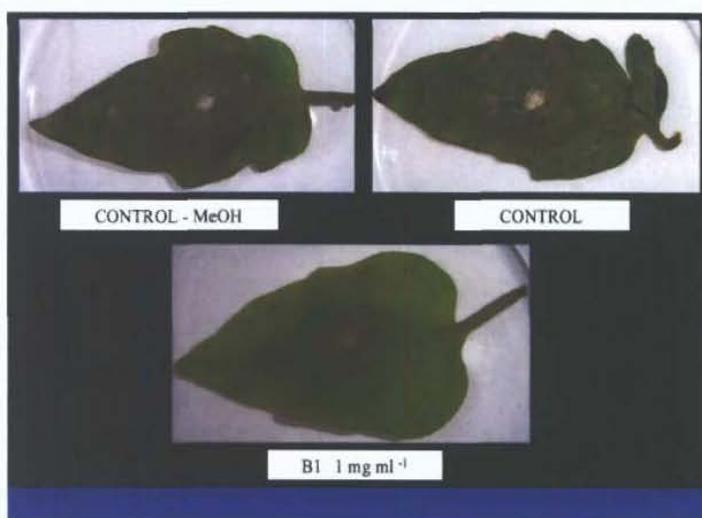


Al evaluar el efecto de extractos al 10% para las especies señaladas se pudo constatar que ambas retardan el crecimiento.



Ensayos *in vivo*.

Las figuras siguientes muestran el nivel de protección de los extractos al inocular hojas de tomate con micelio del hongo *B. cinerea*. Las fotos fueron tomadas 7 días postinoculación. Se observa que existe una real protección. En la actualidad se realizan estudios con plantas completas a fin de determinar concentración óptima de actividad.



Ensayos con frutos de frutilla. Frutos de frutilla se han utilizado para evaluar la actividad de los extractos. Se aplicó a cada fruto un volumen de extracto y luego se les inoculó con esporas de *B. cinerea*. Como elemento de comparación se utilizó el fungicida botánico BC-1000. Este es una de las pocas alternativas con la que cuenta la agricultura orgánica. La figura siguiente muestra los resultados al cabo de 5 días postinoculación con esporas del hongo. Se puede observar que el extracto de nuestra planta muestra una muy buena actividad, pues el hongo experimenta poco crecimiento, mientras que en BC-1000 casi cubre el fruto por completo. El desarrollo adecuado en términos de un producto comercial podría permitir el uso de este extracto en periodo de postcosecha.



BC-1000

Extracto vegetal

Búsqueda de condiciones adecuadas para la obtención de biomasa, con alto rendimiento:

Producción de biomasa mediante el uso de birreactores

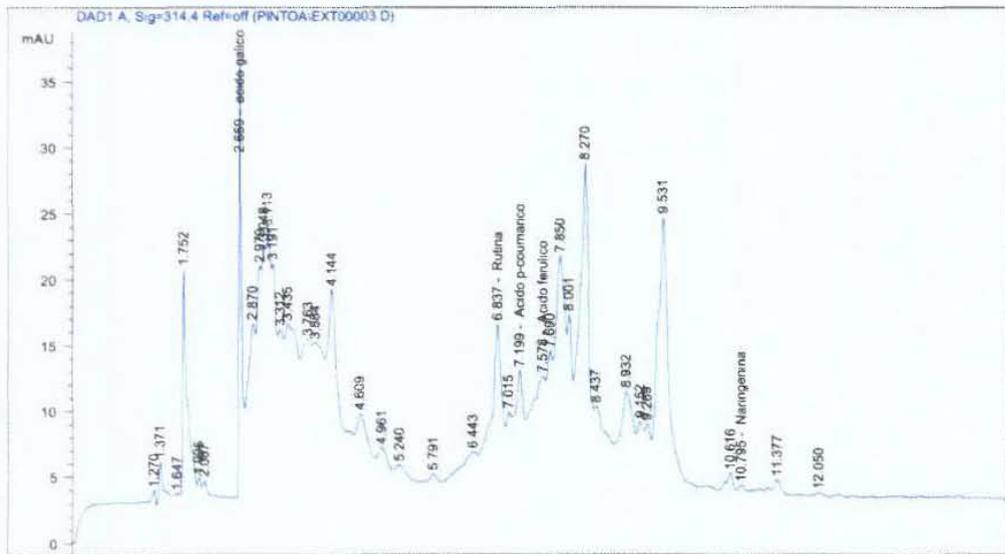
Se han probado diferentes condiciones de cultivo que muestran que este sistema permite aumentar los rendimientos, pero fundamentalmente en plantas no leñosas.

Subcultivo de especies. Se realiza el subcultivo de todas las especies. Esto permite asegurar la disponibilidad de biomasa para cada uno de los bioensayos aplicados.

OBJETIVO 6. Aislar e identificar el o los principios activos en los extractos.

Caracterización química de los extractos. Se han caracterizado los extractos mediante cromatografía líquida de alta eficiencia y espectroscopia de resonancia magnética nuclear.

Pintoa chilensis. Se muestra el perfil de flavonoides y compuestos fenólicos para el extracto crudo de pintoa y dos fracciones mayoritarias.



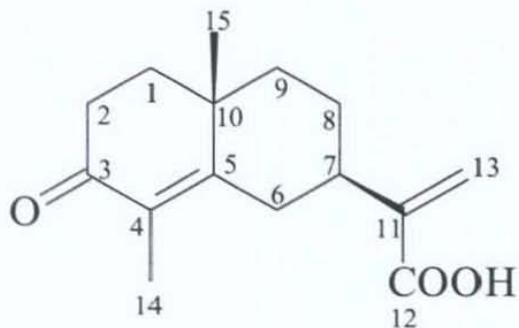
Extracto crudo (1mg/mL)

El análisis de los cromatogramas, permitió identificar algunos compuestos tanto en el extracto crudo como en las fracciones aisladas. Se observa en la tabla , que el ácido gálico, la rutina y la Hesperidina, son componentes mayoritarios tanto del extracto total como de las fracciones. De igual forma, la fracción 5 presentó mayores niveles de estos metabolitos que el extracto total y la fracción 6.

Metabolitos secundarios presentes en el extracto crudo y fracciones aisladas

Compuesto	Extracto crudo (mg/mL)	Fracción 5 (mg/mL)	Fracción 6 (mg/mL)
Ácido gálico	0,0210	0,0483	0,0432
Ácido clorogénico	-----	$3,699 \times 10^{-3}$	$5,007 \times 10^{-3}$
Rutina	0,0124	0,0217	0,0185
Ácido p-cumárico	$1,510 \times 10^{-3}$	$4,016 \times 10^{-3}$	$1,973 \times 10^{-3}$
Ácido ferúlico	$5,180 \times 10^{-4}$	$1,780 \times 10^{-3}$	$5,070 \times 10^{-4}$
Hesperidina	0,0193	0,207	0,0428
Ácido salicílico	$1,865 \times 10^{-3}$	$6,859 \times 10^{-3}$	$2,478 \times 10^{-3}$
Quercetina	$1,522 \times 10^{-3}$	0,0113	$8,169 \times 10^{-3}$
Naringenina	$6,096 \times 10^{-4}$	$2,359 \times 10^{-3}$	$1,658 \times 10^{-3}$
Kaempherol	$1,004 \times 10^{-4}$	$1,161 \times 10^{-3}$	$2,834 \times 10^{-4}$

Pluchea absinthioides. Para esta especie se ha identificado la molécula responsable de la actividad alelopática. Esta molécula representa



Acido (+) -3 -oxo-4,11(13)-dien-12-oico

Problemas enfrentados durante la ejecución del proyecto: Durante la ejecución de este proyecto no se presentó ningún tipo de problemas.

Difusión.

Parte del trabajo realizado en este proyecto fue presentado en las siguientes instancias. Se debe destacar que debido al interés del proteger los resultados siempre se mantuvo las especies solo identificadas con una sigla. Por esta razón tampoco se presentaron trabajos en revistas indexadas.

- Congreso Argentino de Biotecnología.
- El proyecto fue seleccionado por FIA para ser presentado en la Feria de Biotecnología organizada por el programa Explora y realizada entre el 6 y 10 de Octubre de 2004 en el Museo Interactivo Mirador. En esta feria se mostraron actividades a una gran cantidad de alumnos tanto de enseñanza básica como media.
- El proyecto presentó resultados en forma oral y en forma de panel en el Seminario "El sector agrícola y la Biotecnología: Situación actual y desafíos", organizado por FIA entre el 3 y 4 de Noviembre de 2005.
- También se realizó en curso *Bioplaguicidas naturales* en donde mostró parte de los resultados del proyecto. (5-7 de Diciembre).

Impactos del proyecto:

Los impactos del proyecto se pueden resumir en los siguientes aspectos:

- Se implementaron metodologías para el cultivo *in vitro* de especies nativas chilenas. Una de ellas se encuentra en peligro de extinción.
- Se desarrollo un programa que puede permitir el desarrollo de herbicidas o fungicidas a partir de plantas chilenas cultivadas *in Vitro*
- Se dispone de sistemas de producción continua de principios activos de bajo impacto ambiental, púes no se utiliza ninguna especie desde su habitat natural.
- Se han generado las bases para la instalación de una industria productora de Aleloquimicos a partir de plantas chilenas.
- Los resultados están siendo protegidos mediante la solicitud de patentes.

Conclusiones y Recomendaciones.

Las conclusiones de este proyecto son.

- Se logro desarrollar cultivos *in vitro* para todas las especies estudiadas
- Se dispone de extractos que pueden ser utilizados en el desarrollo de potenciales herbicidas
- Se dispone de extractos que pueden ser utilizados en el desarrollo de potenciales fungicidas para el control del hongo *Botrytis cinerea*.

Recomendaciones. Dado los avances que han experimentado en los últimos años los estudios genómicos, proteómicos y metabolómicos en especies cultivadas como hortalizas y frutales, se hace absolutamente necesario comenzar con dichos estudios en especies nativas. Estas plantas representan una fuente invaluable de genes. En ellas se pueden encontrar tolerancias a diferentes factores ambientales, y la producción de diversas moléculas bioactivas. Un programa nacional dedicado a la caracterización molecular de nuestra flora podría entregar una información de alto valor.

1. Bibliografía Consultada.

Smith, R. Plant tissue culture: Techniques and Experiments. Academic Press 2000.

Staba, J.- Plant Tissue culture as a source of Biochemicals CRC Press. 1980.

Contesta Examen Preliminar. Solicitud de Patente de Invención N° 13-2005

S. J. del D. P. I.

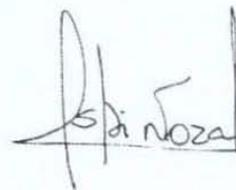
PAMELA ESPINOZA REYES, en representación de la UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE, según escritura de delegación de poder, debidamente acreditada en la Oficina de Patentes de Invención, en el expediente N° 13-2005, sobre Patente de Invención, a Ud. digo:

Que en el examen preliminar de esta solicitud, notificada con fecha 27 de enero de 2006 se pide acompañar una descripción detallada del invento y los dibujos en blanco y negro y sin títulos.

De acuerdo a lo solicitado, vengo en acompañar nuevas páginas 1 a 8 de la memoria descriptiva y nuevas figuras.

POR TANTO:

A UD. PIDO: Tener por contestado el Examen Preliminar y aceptar a tramitación a la solicitud N° 13-2005



P-6929-Q



MEMORIA DESCRIPTIVA

Campo de aplicación de la invención

La invención objeto de la presente solicitud de patente está referida a herbicidas naturales, específicamente se relaciona con herbicidas botánicos producidos mediante la técnica de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*.

En particular, la invención presente se relaciona con la producción- composición de extractos vegetales y métodos para controlar malezas que afectan a los cultivos.

Comentarios del arte previo

En los cultivos se invierte una cantidad significativa de dinero en el uso de pesticidas sintéticos para controlar diversos tipos de plagas y malezas que afectan los rendimientos. Las malezas son un problema por varias razones, pero la más importante es la reducción de rendimiento y calidad de los cultivos, debido que compiten por agua, nutrientes y luz, además, de constituir un refugio para insectos que también afectan a los cultivos.

El uso masivo de los herbicidas para matar y controlar un amplio espectro de malezas es conocido en el estado del arte previo. Más específicamente, los herbicidas químicos son utilizados en el control de malezas que afectan el cultivo de plantas ornamentales y agrícolas. El control de malezas es muy beneficioso cuando permite el control selectivo de dichas especies sin afectar a la vegetación deseada.

Los herbicidas químicos se clasifican de acuerdo al tipo de actividad que presentan. Un determinado compuesto puede tener más de un tipo de actividad dependiendo del modo de aplicación y la velocidad a la cual es aplicado. Los herbicidas naturales se clasifican como selectivos- no selectivos; emergentes postemergentes. Un efectivo herbicida emergente es aquel que es selectivo en su ambiente. Esto significa que tal compuesto puede matar la semilla y la plántula de una maleza sin afectar la planta de interés y generar efectos adversos sobre el ecosistema. Los herbicidas post-emergencia son aplicados luego que las plantas y malezas han alcanzado una altura significativa. En



general un compuesto que presente actividad post-emergencia puede no ser selectivo. Entre los herbicidas se encuentran sustancias con propiedades desfoliantes; desecantes; erradicantes, sistémicos y selectivos.

Uno de los primeros y mas exitosos herbicidas utilizados es el ácido 2,4 diclorofenoxiacético, conocido como 2,4 D, miembro de la familia fenoxi de los herbicidas naturales. Los herbicidas fenoxi son utilizados en el control de malezas de hoja ancha. Desde 1945 este tipo de herbicidas han demostrado ser muy económicos y selectivos en el control de malezas de hoja ancha en cultivos.

Sin embargo, en la actualidad existe consenso en el sentido que la aplicación de estas sustancias afecta tanto la salud humana como animal, además, de provocar daños a los ecosistemas. Debido al que los herbicidas son aplicados al suelo y superficie foliar de las plantas, ellos pueden alcanzar fácilmente reservorios de agua. Como resultado de esto muchas aguas de consumo humano o de riego se encuentran contaminadas con herbicidas.

Este fenómeno ha sido abordado en diferentes campos y se han planteado una gran cantidad de estrategias para resolverlo.

En la naturaleza las plantas controlan su entorno a través de la producción y liberación de un grupo de moléculas que corresponden a los metabolitos secundarios. Este fenómeno conocido como alelopatía fue descrito por primera vez por el científico alemán Hans Molish en 1937. En la actualidad la definición de Alelopatía aceptada por la International Allelopathy Society (IAS 1996) es *"Todo proceso en el que participan metabolitos secundarios producidos por plantas, microorganismos, virus y hongos, con efectos positivos o negativos, sobre el crecimiento y desarrollo de sistemas agrícolas y biológicos (excluidos animales) (Kruse et al., National Environmental Research, Silkeborg, Denmark, 2000)*

Los compuestos químicos con efectos alelopáticos son llamados aleloquímicos (Olofsdotter et al., *Plant Breeding*. 2002). La diversidad de aleloquímicos producidos por



plantas varia desde hidrocarburos simples hasta complejos aromáticos policíclicos (Weston, *Agron. J.*, 1996; Weston y Duke, *Crit Rev Plant Sci.*, 2003), de los cuales se han identificado cerca de 10.000 de un total estimado de 400.000 (Mattner, *Proceeding of the Second Australian Soilborn Diseases Symposium*, 2001). Los metabolitos secundarios en plantas; tales como fenoles, terpenoides, alcaloides, ácidos grasos, esteroides y poliacetilenos, juegan un papel importante en las interrelaciones alelopáticas, presentando efectos positivos y negativos. (Rizvi and Rizvi, *Allelochemicals, Basic and Applied Aspects*, 1987; Yang et al., *Bot. Bull. Acad. Sin.* 2004).

Compuestos químicos con potencial alelopático están presentes en casi todas las plantas y muchos tejidos entre los que se incluyen hojas, tallos, flores, raíces semillas y yemas (Rice, *Allelochemicals: Role in Agricultura and Forestry*, 1987; Weston, *Agron. J.* 1996), rizomas y polen (Rice, *Allelochemicals: Role in Agricultura and Forestry* 1987; Kruse et al., *National Environmental Research, Silkeborg, Denmark* 2000). Bajo condiciones apropiadas; estos compuestos son liberados desde la planta al ambiente (Olofsdotter et al. *Plant Breeding*, 2002) a través de exudación radicular, lavado de partes aéreas, volatilización, y liberación pasiva debido a la descomposición de residuos vegetales (Friedman and Waller, *Trends in Biochemicals Sciences*, 1985; Rice, *Allelochemicals: Role in Agricultura and Forestry* 1987; Weston, *Agron. J.* 1996; Nelson, *Agron. J.* 1996; Wu et al., *Weed Res.* 1999; Kruse et al., *National Environmental Research, Silkeborg, Denmark*, 2000; Olofsdotter et al., *Plant Breeding*, 2002; Inderjit and Duke, *Planta*, 2003; Weston and Duke, *Crit. Rev. Plant Sci.* 2003). (Fig. 1)

La liberación de agentes alelopáticos por volatilización es importante en plantas que producen terpenoides. La descomposición de residuos vegetales libera una gran cantidad de aleloquímicos, pero la mayoría de ellos proviene del exudado radicular (Friedman and Waller, *Trends in Biochemicals Sciences* 1985; Rice, *Allelochemicals: Role in Agricultura and Forestry* 1987). La exudación radicular es afectada por diferentes factores tales como temperatura, sustrato y enfermedades del suelos (Kruse et al.,



*National Environmental Research, Silkeborg, Denmark, 2000; Singh et al., Crit. Rev. Plant Sci.*2003). Aquellos compuestos de bajo peso molecular son liberados desde la planta al suelo, mediante difusión pasiva, mientras que las sustancias de alto peso molecular (polisacáridos, proteínas, mucilagos) son liberadas utilizando mecanismos de transporte vía vesículas. El lavado de metabolitos desde las partes aéreas de las plantas es un mecanismo común de liberación y ayuda a controlar fenómenos de competencia (Friedman and Waller, 1985; Kruse et al., *National Environmental Research, Silkeborg, Denmark 2000*)

Cuando una planta susceptible es expuesta a aleloquímicos, se afecta la germinación, crecimiento y desarrollo (Rice, *Allelochemicals: Role in Agricultura and Forestry* 1987; Kruse et al., *National Environmental Research, Silkeborg, Denmark, 2000; Singh et al., Crit. Rev. Plant Sci* ,2003).

Se han investigado numerosos cultivos en términos de su capacidad alelopática, estos incluyen alfalfa (*Medicago sativa*), cebada (*Hordeum vulgare*), trebol (*Trifolium spp.*, *Melilotus spp.*) avena (*Avena sativa*) pearl millet (*Pennisetum glaucum*), arroz (*Oryza sativa*) centeno (*Secale cereale*), sorgo (*Sorghum spp*), girasol (*Helianthus annuus*), camote (*Ipomoea batatas*) y trigo (*Triticum aestivum*) (Miller, *Agron. J.* 1996; Weston, *Agron. J* 1996; Kruse et al., *National Environmental Research, Silkeborg, Denmark, 2000*).

Los compuestos con propiedades herbicidas corresponden a una amplia variedad de estructuras químicas originadas a través de las rutas metabólicas del acetato o shiquimato (Rice, *Allelochemicals: Role in Agricultura and Forestry* 1987). Entre los mucho compuestos con propiedades alelopáticas descritos tenemos ácidos orgánicos simples soluble sen agua, alcoholes de cadena corta, aldehídos alifáticos y cetonas, lactosas insaturadas simples, ácidos grasos, naftoquinonas, antroquinonas, quinonas complejas, fenoles simples, flavonoides taninos, terpenoides, amino ácidos, alcaloides, glucosinolatos, entre otros (Rice, *Allelochemicals: Role in Agricultura and Forestry* 1987;



Rizvi y Rizvi, *Allelochemicals, Basic and Applied Aspects*, 1992; Einhellig, *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* 582. 1995; Weston, *Agron. J* 1996) Por las razones expuestas, en la actualidad existe una gran demanda por nuevos herbicidas que tengan un bajo impacto ambiental y una alta efectividad.

En el estado del arte previo se describen patentes en las cuales se hace uso de extractos de plantas utilizados para el control de malezas.

En el documento US N° 6.756.341 se propone un herbicida natural para remover malezas desde cultivos compuesto por bicarbonato de sodio, cinamon y aroma de trigo.

La patente US N° 6.323.153 presenta un método para controlar la vegetación utilizando una composición herbicida que contiene sales de ácidos carboxílicos y fosfónicos.

El uso de un recurso natural para la obtención de productos que pueden ser utilizados en diversos campos, puede provocar la sobreexplotación y posterior desaparición del recurso. Esta dificultad puede ser resuelta mediante el uso de la técnica de cultivo de tejidos *in vitro*. Esta técnica permite obtener material homogéneo de manera continua sin provocar efectos sobre el ambiente.

Chile presenta una abundante flora nativa que ha sido solo parcialmente analizada respecto de sus propiedades biológicas. Entre estas especies, *Pluchea absinthioides* (Hook, o *Tessaria absinthioides*), es una planta muy común en suelos húmedos y salinos ya que presenta tolerancia a la salinidad de los suelos. Infusiones de esta planta ha sido empleada durante mucho tiempo en la medicina popular debido a sus propiedades anticolesterol (Kurina, *et al*, *Phytochemistry*, 1997). La familia Plucheaceae esta constituida por 28 géneros y alrededor de 250 especies. La investigación química de algunas especies ha demostrado la presencia de un grupo de compuestos denominados pluchenos, como una característica distintiva (Ahmad, *et al*, *J.Nat Prod.* 1992).

El uso de la técnica del cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, con el propósito de obtener metabolitos secundarios, es conocido en el estado del arte previo.

En la patente US N 430591, se describe el uso de esta técnica para la obtención de material enriquecido en metabolitos secundarios. Mas específicamente, en esta patente se trabaja en la obtención de alcaloides, a partir de plantas de *Papaver* sp. De igual forma, Kurina *et al* , (*Plant and Cell Report*, 2002), describen la obtención de ácido tessarico a partir del cultivo de suspensiones celulares de *Tessaria absinthiodes* .

Breve descripción de los dibujos

Las figuras que se acompañan, las cuales se incluyen para proporcionar una mayor comprensión del invento, quedando incorporadas y constituyendo parte de esta descripción, ilustran parte del arte previo y una ejecución del invento, y junto con la descripción, sirven para explicar los principios del invento.

La Figura N° 1. Muestra plántulas de *P. absinthiodes* propagada *in vitro*.

La Figura N° 2 Muestra efectos de extractos obtenidos de plantas de *P. absinthiodes* cultivadas *in vivo* e *in vitro* en la germinación de *L. sativum*.

La Figura N° 3 muestra los efectos de extractos de *P. absinthiodes* en el crecimiento de raíces y brotes de *L. perenne* (ballica).

La Figura N° 4 muestra los efectos de extractos de *P. absinthiodes* en el crecimiento de plántulas de ballica.

La Figura N° 5 muestra los efectos de extractos de de plantas *in vivo* e *in vitro* de *P. absinthiodes* en la germinación de semillas de tomate.

La Figura N° 6 muestra los los efectos de extractos de *P. absinthiodes* en la eficiencia fotosintética de plántulas de ballica.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere al uso de extractos vegetales obtenidos desde plantas cultivadas *in vitro*, para el control de malezas que afectan a los cultivos. Mas específicamente se trata de un extracto acuoso obtenido desde plantas de 1 mes de subcultivo que inhibe la germinación y crecimiento de malezas tales como ballica, sin afectar de manera significativa el desarrollo de cultivos de tomate.

El método para producir material vegetal generador de extractos bioactivos a partir de *Pluchea absinthiodes*, comprende las etapas de

- (a) obtención de tejido vegetal, específicamente brotes jóvenes,
- (b) cultivo de los brotes en un medio sintético que induce la proliferación de brotes,
- (c) recolección del material vegetal y
- (d) obtención de extractos activos.

Estos son los extractos que sirven como herbicidas naturales utilizados para controlar la maleza en cultivos.

De los resultados obtenidos en los ensayos realizados que se detallan a continuación se encontró que éstos extractos pueden ser usados para controlar malezas que compiten con tomate, en condiciones de campo e invernadero evitando el uso de herbicidas sintéticos que dañan a los trabajadores y al ecosistema.

Parte experimental

Se cultivaron plantas de *P. absinthiodes* en frascos de vidrio utilizando un medio de cultivo Murashigue y Skoog (1960) modificado en una cámara de crecimiento a 22 °C y un fotoperíodo de 16 / 8 (luz / oscuridad). Previo a su cultivo, el tejido original fue desinfectado para eliminar patógenos y luego puesto en los frascos de cultivo. Todo este trabajo se realizó en condiciones asépticas en una cámara de flujo laminar. La propagación de *P. absinthiodes* permitió obtener al cabo de un mes una cantidad de biomasa significativa. (Fig. 1)

Al cabo de un mes se cosecharon plántulas, y se obtuvo un extracto acuoso que contenía un rango de concentraciones entre 2 y 20% de peso fresco de tejido (p/v). Para evitar degradación de material se utilizó nitrógeno líquido para realizar la molienda.

Con los extractos obtenidos, se evaluó la germinación de semillas de *Lepidium sativum* (berro), *Lolium perenne* (ballica). El ensayo realizado consistió en la imbibición

de las semillas en extractos de diferentes concentraciones y posterior germinación en una cámara de crecimiento a 25 ± 2 °C. Se consideró una semilla germinada cuando la longitud de su radícula fue ≥ 5 mm. Los resultados mostrados en la Fig. 2 indican que los extractos de plantas cultivadas *in vitro* tienen una actividad equivalente al de las plantas crecidas en condiciones de campo. Al comparar el efecto de los extractos acuosos sobre el crecimiento de la raíz y el brote en estados tempranos de crecimiento, se observa un efecto dosis-dependiente (Fig. 3). A una concentración equivalente al 15% p/v se obtuvo un 85 % de inhibición de la germinación (Fig. 3). De igual modo, el crecimiento de plántulas de ballica fue afectado por la dosis del extracto empleada, esto es un mayor efecto a mayor concentración del extracto (Fig.4). A esta misma concentración, el extracto tuvo un menor efecto en la germinación de tomate, inhibiéndola solo en un valor cercano al 35% (Fig. 5).

Los extractos analizados también mostraron un efecto a nivel de la fotosíntesis. La eficiencia fotosintética disminuyó con la concentración del extracto aplicado (Fig. 6),

Extractos con las concentraciones descritas pueden ser usados para controlar malezas que compiten con tomate, en condiciones de campo e invernadero. Con el extracto propuesto se evita el uso de herbicidas sintéticos, que ocasionan daño tanto a los trabajadores como al ecosistema.

Por otra parte el sistema de cultivo, asegura la disponibilidad de biomasa, sin afectar a los ecosistemas producto de una sobre-explotación de la especie.

Figura 1. Propagación *in vitro* de *P. absinthiodes*.



Figura 2.

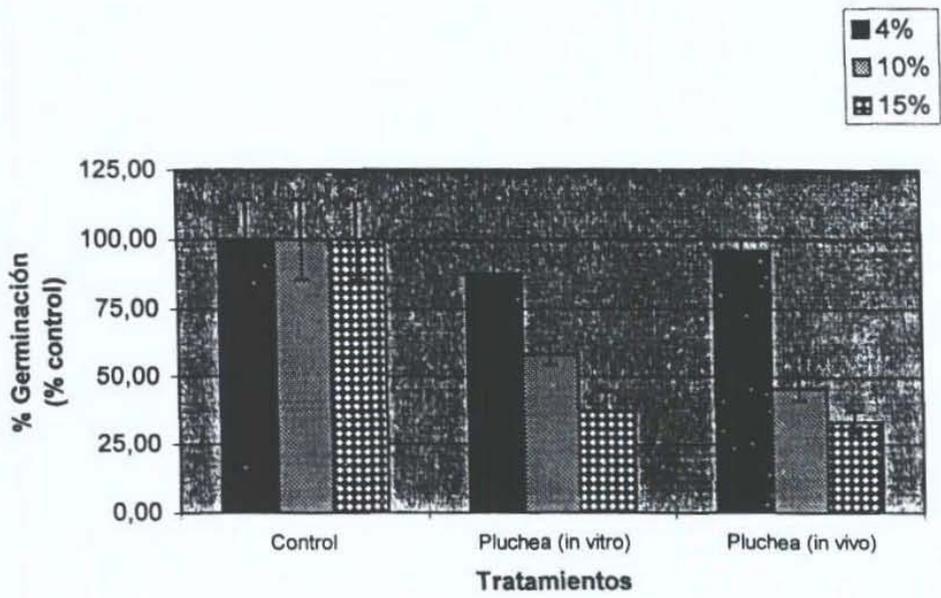


Figura 3.

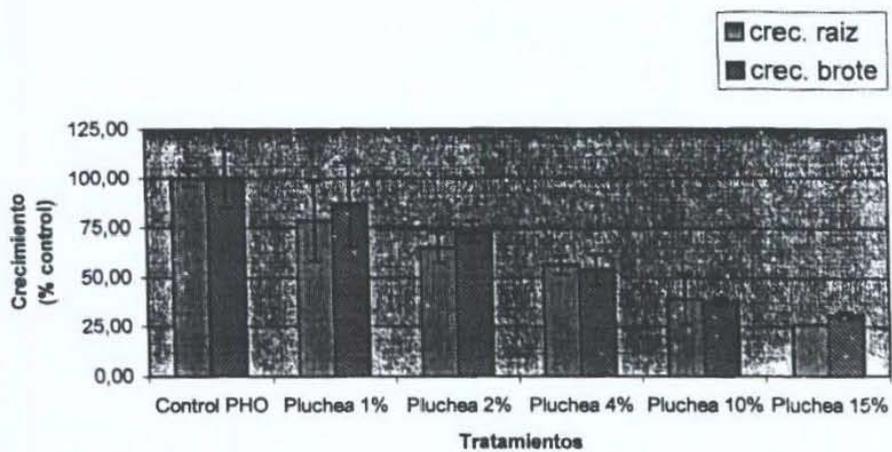


Figura 4.

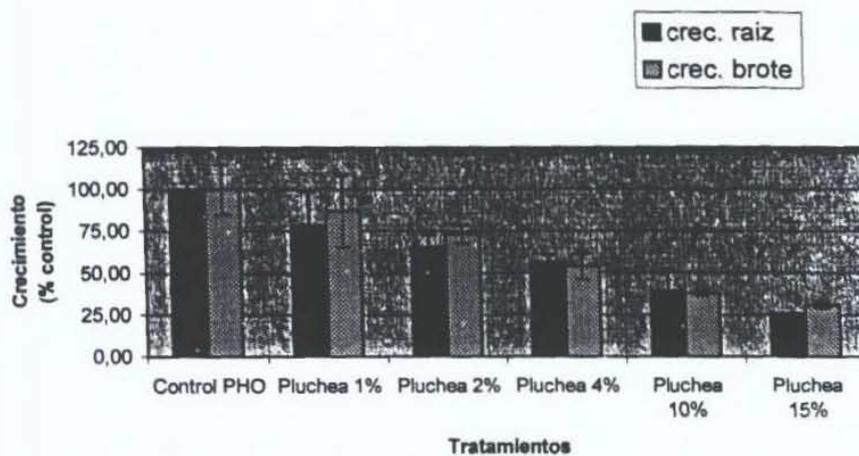


Figura 5.

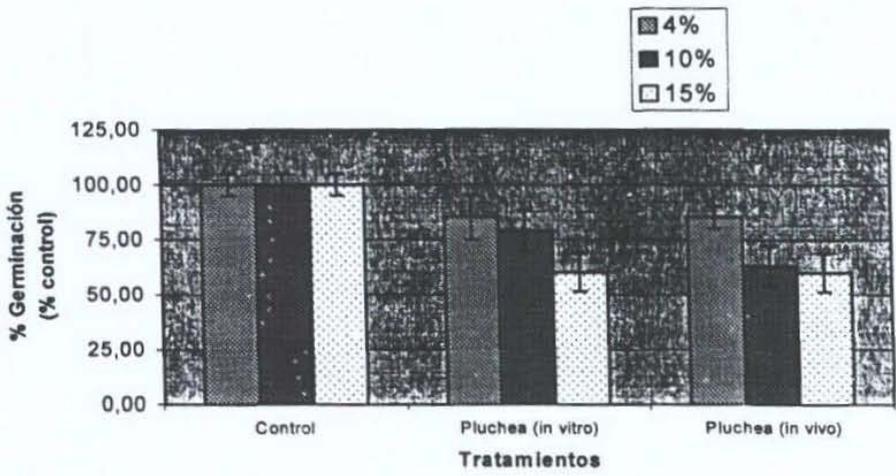
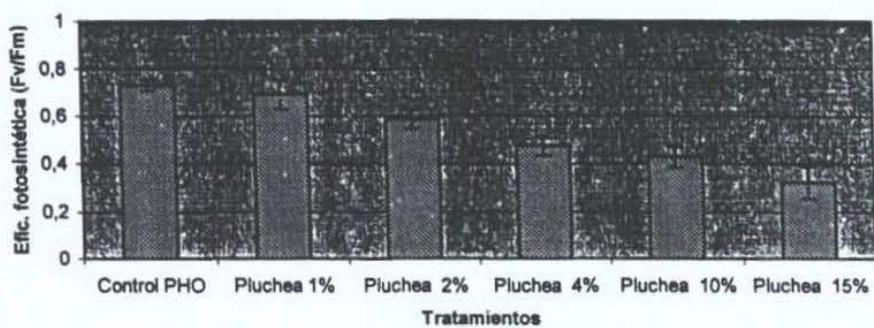


Figura 6.





Patch III - Next page starts new Batch