



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE
FACULTAD DE QUIMICA Y BIOLOGIA
LABORATORIO DE FISIOLOGIA Y BIOTECNOLOGIA VEGETAL

OFICINA DE PARTES - FIA	
RECEPCIONADO	
Fecha	13 JUN 2006
Hora	10:50
Nº Ingreso	2834

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

INFORME FINAL

PROYECTO FIA BIOT 01-A-22

I. ANTECEDENTES GENERALES

Nombre del Proyecto. Producción de compuestos aleloquímicos en plantas chilenas cultivadas *in vitro*, BIOT 01-A-22, Región Metropolitana.

Fecha de aprobación. Diciembre 2000. Concurso Biotecnología.

Agente Ejecutor. Universidad de Santiago de Chile

Coordinador del Proyecto. Dr. Gustavo E. Zúñiga

Costo Total

Aportes FIA.

Periodo de Ejecución. Diciembre de 2000 a Diciembre de 2005.

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. vii) 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. INFORME TECNICO

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.

1. Objetivos del proyecto.

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*.

2. Metodología del proyecto

Cultivo *in vitro* de las especies.

Protocolos para la inducción de cultivos *in vitro*.

Para la obtención de cultivos *in vitro*, se obtuvieron plantas de 1 o 2 años de edad en el vivero de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Chile (boldo, canelo y patagua). *Pluchea absinthioides* Hook & Arn fue colectada durante el mes de enero de 2002 en Ocoa, Chile (V Región). Los ejemplares fueron identificados por Sebastian Teiller del Museo de Historia Natural de Santiago de Chile. Un ejemplar de esta planta fue depositado en el Herbario del Museo.

Los cultivos de *Pintoa chilensis* de iniciaron a partir de embriones obtenidas de semillas donadas por un funcionario de la CONAF III Región, interesado en poder recuperar esta especie en peligro de extinción.

Para obtener los embriones las semillas fueron escarificadas, embebidas en agua, desinfectadas en una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante 10 minutos.

Desinfección previa al cultivo. Los explantes fueron lavados en agua destilada (2-3 veces), y luego sumergidos en agua destilada por 2 hrs a objeto de bajar el contenido endógeno de fenoles. Inmersión en alcohol etílico al 95% por 30 seg. Inmersión por 20 minutos en una solución de hipoclorito de sodio (2-4-6 %) adicionada con algunas gotas de Tween 20 y repetidos lavados en una solución de agua bidestilada con ácido ascórbico (250 mg/L).

Medio de cultivo. Los explantes fueron transplantados por 15 días en un sustrato MS, adicionado con mioinositol (100 mg/L), glicina, Tiamina (1 mg/L), PVP (a fin de reducir la formación de compuestos derivados de la oxidación de fenoles), sacarosa (20 g/L) y agar (7,5 g/L), luego se procedió a ajustar el pH a un valor de 5,5 mediante la utilización de KOH o HCl 0,1-1 N previo a autoclavado a 120 °C por 20 minutos. El agar fue mezclado con el medio de cultivo para obtener su solidificación, procediendo a agitar y calentar la suspensión hasta una T° cercana a los 90 °C. Se transvasijaron alrededor de 20 ml de sustrato al interior de los frascos de cultivo de 200 ml, cubierto con papel aluminio para luego proceder a su esterilización en autoclave a 120°C por 20 minutos. La

transferencia de los cultivos a los vasos fue efectuada bajo cámara de flujo laminar, empleando pinzas y bisturis esterilizadas mediante mechero. Los cultivos fueron mantenidos en cámaras de crecimiento con un fotoperiodo de 16/24 horas, intensidad luminosa de 40 micromoles xm^2xseg y temperatura de 22 – 24 °C.

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

MEDIO DE CULTIVO MURASHIGE Y SKOOG (MS)

Nutriente	mg/litro
NH_4NO_3	1650
H_3BO_3	6,2
CaCl_2	332,2
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,26
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
MgSO_4	180,7
MnSO_4	16,9
Na_2MoO_4	0,25
KI	0,83
KNO_3	1900
KH_2PO_4	170
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6
Glicina	2
Mio-Inositol	100
Ac.Nicotinico	0,5
Tiamina*Hcl	0,1
Sacarosa	25000
Agar	8000
PH	5,8

Las hormonas utilizadas en los medios de cultivo fueron, 2,4-D 0,1 mg/ml; Cinetina 0,2 mg/l y BAP 0,3 mg/L. En lugar de sacarosa analítica se utilizó sacarosa comercial IANSA.

Etapa de proliferación de explantes

Medio de cultivo. Después de 15 días el material fue transferido a un medio con idéntica composición a la inicial, pero con la adición de BAP, necesaria para un sucesivo desarrollo de las yemas axilares. Los brotes de cerezo fueron multiplicados en un medio de cultivo con las sales minerales MS, con los nitratos reducidos a la mitad y con los componentes orgánicos necesarios para la proliferación del material vegetal, este medio fue a su vez empleado en los subcultivos de mantención de los brotes. Al pasar a la etapa de brotación, al medio utilizado se le adicionó BAP (0,2-0,5-1 mg/L), además de una mezcla de BAP, GA3 y ANA. Los trasplantes de los brotes a los sustratos de proliferación se realizaron cada 20 días (Anexo 17).

Evaluación de propiedades aleloquímicas

Obtención de extractos

Obtención de extractos acuosos

La obtención de extractos se hará utilizando las siguientes metodologías:

- a) **Planta completa:** Las plántulas para iniciar las actividades serán obtenidas desde viveros comerciales. A partir de hojas de estas plantas se obtendrán infusiones y extractos previa molienda en nitrógeno líquido. La identificación exacta de las especies adquiridas se realizará con la ayuda de Personal del Museo de Historia Natural.
- b) **Plántulas *in vitro*.** Para plántulas obtenidas de los cultivos "*in vitro*", consistentes en hojas y tallos, se realizarán extracciones por inmersión en agua fría por 24 horas.

c) Planta molida:

El tejido de plantas *in vivo* e *in vitro*, se congelará en nitrógeno líquido y se molerá en un mortero en presencia de agua. El solvente será eliminado por evaporación a presión reducida, los extractos se pesarán y se guardarán en un refrigerador a 0 °C. A cada extracto se le determinará su actividad alelopática y antifúngica.

Obtención de extractos orgánicos

Las plántulas serán sumergidas en un solución alcohólica (85%) durante 24 hrs. Adicionalmente, se molerán en presencia de nitrógeno líquido y se extraerán con la misma solución alcohólica. A estos extractos se les determinará su actividad alelopática y antifúngica.

Estandarización de los extractos.

Con el propósito de disponer de extractos equivalentes en términos de su composición, estos serán estandarizados utilizando la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), que permite comparar los principales componentes existentes en la muestra. La estandarización se hará en función del componente mayoritario presente en la muestra.

Fraccionamiento de los extractos.

Los extractos se fraccionarán por columnas cromatográficas rápidas, utilizando solventes de diferente polaridad, como hexano y mezclas de hexano y acetato de etilo y etanol. Para ello se utilizará la técnica de Cromatografía Líquida a Presión Reducida (CLPR) que permitirá obtener mezclas de compuestos menos complejas que los extractos originales. Cada una de estas sub-fracciones se concentrarán a presión reducida, los extractos se pesarán y se guardarán a 0°C. Las sub-fracciones serán analizadas por cromatografías en capa fina analítica (CCF) en diferentes sistemas cromatográficos. A cada sub-fracción se le medirá su actividad alelopática y antifúngica. Aquellas sub-fracciones de mayor actividad, se seleccionarán para una posterior separación y purificación de sus componentes activos.

Evaluación de las propiedades alelopáticas

Evaluación en Semillas. Para estudiar las propiedades alelopáticas de los extractos, se utilizarán semillas de mono y dicotiledóneas, de acuerdo metodologías descritas en la literatura.

Monocotiledóneas:	Liliaceae:	<i>Allium cepa</i> ; Cebolla
	Gramineae:	<i>Triticum aestivum</i> , Trigo <i>Hordeum vulgare</i> , Cebada
Dicotiledóneas:	Cruciferae	<i>Lepidium sativum</i> , Berro
	Compositae	<i>Lactuca sativa</i> Lechuga
	Solanaceae	<i>Lycopersicum esculentum</i> , Tomate

Efecto de los extractos sobre la germinación de semillas.

En placas Petri de 14 cms de diámetro, cubiertas con papel filtro Watman N° 1, se colocaron 10 semillas previamente desinfectadas de las especies indicadas en el punto anterior. Las placas fueron puestas en una cámara de crecimiento a 24 ± 2 °C y un fotoperíodo de 16/8 hrs. luz/ oscuridad. Cada ensayo se realizó por triplicado. Se consideró como indicador de germinación aquellas semillas cuyo crecimiento radicular fue igual o superior a 0,5 cm.

Efecto de los extractos sobre la α -amilasa

Ensayo de placa Petri:

Se embebieron mitades de semillas de cebada con embrión, por 48 horas en extractos alelopáticos entre 0 y 15% p/v, agua o ácido abscísico (ABA en concentraciones de 10^{-7} a 10^{-3} M). Luego, las semillas se sembraron en placas Petri preparadas con 15 mL de solución agar almidón (1%p/v en extracto, agua o ABA) Cada placa con 10 semillas cerrada herméticamente, se incubó en una cámara de cultivo a 25°C y con un fotoperíodo de 16/8 horas luz, durante 24 hrs. Finalmente, se retiraron las semillas y se reveló las placas con lugol (6gr KI más 600 mg I_2 en 100 mL de agua).

El parámetro a determinar fue el efecto de los extractos sobre la actividad de la enzima α -amilasa. Este efecto se visualiza en el diámetro del halo que indica la degradación de almidón por la enzima.

Análisis espectrofotométrico

Serán maceradas semillas de cebada (previamente embebidas durante 48 horas, en frío en $CaCl_2$ 5mM en una proporción de 0.5:5 (gr/mL). El macerado será filtrado y centrifugado a 12.500 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se utilizará como extracto enzimático. La mezcla de reacción para evaluar la actividad enzimática contendrá 100 μ L del extracto enzimático y 400 μ L de agua. La reacción se iniciará al agregar 500 μ L de solución A (50 mM NaOAc, pH 4.8; 0.03 %p/v almidón p.a.; 60 mM

NaCl y 20 mM CaCl₂) y se detendrá al adicionar 500 µL de solución de lugol, luego de un periodo de incubar 5 minutos a temperatura ambiente. Para evaluar el efecto de los extractos se agregará a la mezcla de reacción diferentes volúmenes de extracto (10-50 µL). La actividad enzimática se expresará en base al consumo de almidón(µg) por (minuto y mg de proteína), al determinar la absorbancia del complejo almidón-lugol a 620 nm.

EFFECTO DE EXTRACTOS SOBRE EL CONSUMO DE OXIGENO EN MITOCONDRIAS DE CEBADA:

Obtención de suspensión mitocondrial de plantas de cebada:

Esta suspensión fue preparada según el método descrito por Aranda y colaboradores (1983), utilizando plantas de cebada crecidas a 25°C y en oscuridad para evitar desarrollo de cloroplastos. Las plantas de 15 días fueron maceradas en frío con buffer de extracción (0.25 M sacarosa, 1mM EDTA, 2 mg/mL de BSA y 10 mM Tris-HCl, pH 7.6), en una proporción 1:5. El extracto obtenido se filtro y centrifugo a 2.000 g por 15 minutos. El sobrenadante fue centrifugado nuevamente a 10.000 g por otros 20 minutos. La pella resultante se resuspendió en buffer de resuspensión mitocondrial (0.25 M de sacarosa, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 7.4).

3.3.2 Determinación de consumo de oxígeno:

El consumo de oxígeno se determino utilizando un electrodo de Clark durante 15 minutos a temperatura de 30°C. La mezcla de reacción contenia una cantidad de proteínas y buffer de resuspensión mitocondrial. La reacción se inicio al agregar 60 µL de NaDH 1 mM.

El efecto de los extractos alelopáticos y 1mM KCN fue evaluado en forma similar al protocolo antes mencionado pero con 100 ul del extracto o 100 µL de KCN (control positivo). El consumo de oxígeno se determino según la siguiente expresión:

$$\text{Consumo de oxígeno} = (M \times S) / (100 \times P) \text{ (umoles} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1} \text{prot.)}$$

Donde:

M = pendiente inicial de la curva trazada por el oxígrafo expresada como una diferencia porcentual de contenido de O₂ por minuto.

S = solubilidad del oxígeno en tampón mitocondrial equivalente a un 100 % (0.223 mM a 30°C).

P = concentración de proteínas (mg/mL).

La concentración de proteínas fue determinada mediante método de Bradford modificado usando una solución de BSA estandar 1mg/mL.

Efecto de extractos sobre la reaccion de Hill:

Se maceraron 10 gramos de hojas de espinaca en frío con 20 mL de 0.5 M sacarosa y 3 mL de 0.1 M buffer NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 6.5. El macerado fue filtrado y luego, centrifugado a 5.700 rpm por 3 minutos. El sobrenadante se centrifugo otra vez a 12.700 rpm por 7 minutos. La pella resultante se resuspendio en 20 mL de 0.1 M buffer NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 6.5 en frío. La suspensión de cloroplastos se guardo en hielo y en oscuridad.

La mezcla de reacción contenía 1 mL de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 6.5, 2 mL de agua y 1 mL de $2.5 \times 10^{-4}\text{M}$ DCPIP (2,6-diclorofenol indofenol). La reacción se inició al adicionar 1 mL de suspensión de cloroplastos y se siguió el avance de la reacción espectrofotométricamente, previa iluminación de los tubos cada 15 segundos durante 75 segundos.

La reacción de Hill se evidenció a través de la fotoreducción del DCPIP a 600nm, por parte de los cloroplastos iluminados.

El efecto de los extractos alelopáticos y de un herbicida fue evaluado en forma similar al protocolo antes mencionado.

Actividad de los extractos alelopáticos sobre malezas:

Semillas desinfectadas de diferentes malezas (*Gallega officinalis*, fueron embebidas en agua (control) y en extractos crudos de plantas *in vitro* (tratamiento) durante 2 horas.

Luego, las semillas se sembraron en placas de germinación siguiendo similar protocolo que en punto 4. Se consideraron semillas germinadas aquellas que presentaron un desarrollo de la radícula $\geq$ que 0.5 cms, a las 72 horas de realizado el ensayo. Las placas selladas fueron incubadas en una cámara de cultivo a 25°C y fotoperíodo de 16/8.

Evaluación de las propiedades fungicida.

Cepas de *B. cinerea*.

En este estudio se utilizó la U29 de *B. cinerea*, esta cepa fue aislada de uvas infectadas por el hongo y fue purificada de manera que la cepa utilizada proviene de un conidio

Crecimiento y mantención del hongo

El hongo se hizo crecer en el medio de cultivo agar papa-dextrosa y fue mantenido en tubos inclinados con agar papa-dextrosa. 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 realizaron subcultivos periódicos a fin de mantener el hongo activo.

Actividad antifúngica *in vitro* y citotoxicidad de los extractos.

En los experimentos *in vitro* se evaluó el efecto sobre el crecimiento del micelio y sobre la germinación de los conidios.

Sobre el crecimiento de *B. cinerea*.

Para realizar estos experimentos se prepararon placas Petri que contenían el medio de cultivo agar papa-dextrosa y los extractos solubles en una concentración de 0-15% p/v. Se inoculó al centro de la placa micelio del hongo y se midió el diámetro de crecimiento del micelio diariamente. Como controles se usó placas de cultivo que contenían agar papa-dextrosa en ausencia de los extractos. Cada experimento se realizó al menos en quintuplicado.

Sobre la germinación de los conidios de *B. cinerea*.

Para determinar el efecto de los extractos sobre la germinación, los conidios fueron resuspendidos en el medio de cultivo líquido papa-dextrosa en presencia de los extractos. Los conidios resuspendidos fueron incubados a 22 °C y se determinó la cinética de germinación. Como control se determinó la cinética de germinación de los conidios resuspendidos en medio de cultivo, pero en ausencia de los extractos.

Citotoxicidad Celular

Línea celular

Se empleó una línea celular HeLa, la cual fue crecida en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino inactivado (SFB 10 %), L-glutamina (1 mM), gentamicina (50 µg/mL), piruvato (1 mM). Las células fueron cultivadas en una atmósfera controlada con 5% CO₂, una humedad relativa del 95% y una temperatura de 37 °C.

Conteo celular

Las células fueron tratadas con el reactivo azul tripán y posteriormente se estimó el número de células vivas utilizando una cámara de Neubauer montada sobre un microscopio óptico (microscopio binocular óptico Zeiss, modelo KF2 pla acromática con lámpara de 10 W) Zeiss.

Inducción de apoptosis celular

Se sembraron aproximadamente $2,2 \times 10^5$ células HeLa en las placas de 6 pocillos en medio DMEM suplementado sin rojo fenol. Posteriormente se incubaron las placas en una estufa de cultivo (VWR-Shellab, modelo 2425) a 90% RH, 37 °C y 5 %CO₂ hasta alcanzar luego de 3 días una confluencia del 80% en los pocillos (aprox. 650.000 células), las que fueron visualizadas en un microscopio invertido Nikon, modelo TMS). Los pocillos fueron lavados con medio DMEM (sin rojo y sin suplementar) dos veces con el fin de eliminar las células que no se adhirieron.

Se utilizó actinomicina D como inductor de apoptosis a una concentración de 5 µg/mL durante un periodo de 18 horas como control positivo del ensayo. Las células apoptóticas se encontraron libres en el medio de cultivo. Por lo tanto, se recuperó el sobrenadante en tubo falcon de 15 mL y las células adheridas fueron tripsinizadas (Tripsina-EDTA 0,5%) durante 10 min a temperatura ambiente sobre un agitador orbital. Una vez tripsinizadas se mezclaron con el sobrenadante y centrifugadas a 1500 rpm x 10 min, se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con medio DMEM sin rojo fenol.

Tratamiento de células HeLa con extractos

Se incubaron las células en confluencia en los pocillos con extractos crudos de Pintoa, donde se evaluaron las siguientes concentraciones: 1 mg/mL, 4 mg/mL y 6 mg/mL (volumen final de 2 mL con medio DMEM suplementado sin rojo fenol) por periodos de 24 y 48 horas en las mismas condiciones descritas anteriormente para crecer células HeLa.

Extracción de proteínas

El pellet celular que se obtuvo después de la tripsinización se trató con 300 µL de buffer de lisis 1X frío (Kit caspasa-3, Chemicon) durante 10 minutos en hielo, para luego ser centrifugado a 10000g x 5 min. El sobrenadante (extracto citosólico) se conservó a -20 °C.

Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas se determinó por medio del método de Bradford (1976) a 595 nm. A 1,0 mL de reactivo de Bradford se le adicionó un volumen de 8 µL del extracto citosólico para que se ajustara a la curva de calibración.

Determinación de Actividad Caspasa-3

La actividad de esta enzima se evaluó con el kit Caspase-3 Colorimetric Activity Assay (Chemicon) cuantificando la absorbancia a λ_{405} nm (Lector de microplacas ELISA BioRad, modelo 550). Se emplearon 100 µL como volumen final de la reacción.

3. ACTIVIDADES DEL PROYECTO.

Las actividades realizadas en este proyecto se muestran en el listado a continuación. Se destaca el que prácticamente todas las actividades fueron realizadas de acuerdo al cronograma inicial tal cual se informe en cada uno de los informes técnicos. La única actividad que no se pudo desarrollar fue la relacionada con el hongo *U.necator* que no se puede cultivar in Vitro. Sin embargo, se iniciara una colaboración con el Estacion Experimental la Platina del INIA para evaluar in vivo el efecto de los extractos en el hongo.

Determinar medio de cultivo adecuado para obtener cultivos *in vitro* de las especies

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

Producción de biomasa mediante el uso de biorreactores

Subcultivo de las especies

Obtención de extractos bioactivos. Efecto de solvente.

Obtención de extractos bioactivos. Efecto de pH

Ensayo de Germinación

Ensayo sobre enzimas

Respiración en mitocondrias aisladas

Fotosíntesis- Reacción de Hill

Efecto de extractos acuosos de diferentes especies sobre la germinación

Efecto del pH sobre la actividad de extractos en la germinación

Efecto de extractos orgánicos sobre la germinación

Efecto de extractos sobre la actividad de la α -amilasa

Efecto de los extractos sobre la respiración

Aislamiento de cepas de *Botrytis cinerea*

Cultivo de *B. cinerea* en condiciones de Laboratorio

Efecto de extractos sobre *B. cinerea in vitro*

Efecto de extractos sobre *B. cinerea in vivo*

Efecto de extractos sobre *U. necator*

Realizar talleres

Patentar resultados

Elaborar informe final

4. RESULTADOS DEL PROYECTO.

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*).

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

Las fotos muestran cultivos de esta especie al cabo de 1 mes. Esto resultó 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. Se dispone de cultivos *in vitro* de esta planta.



Cultivo *in vitro* de *Plucheá absinthioides*

***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 relativamente bajo (3 brotes por explante). 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. Resultó una especie de crecimiento relativamente lento. Se obtuvo un índice de multiplicación igual a 4. Perteneció a la Familia de las Zygophyllaceae.



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

En Chile la familia esta 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 presento 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.

En conclusión, este objetivo fue logrado en un 100% no existiendo dificultades metodológicas y utilizando la metodología propuesta en el proyecto original sin grandes modificaciones.

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

Se analizaron dos metodologías 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 mas principios activos cuando se macera en tejido en N₂ 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 , el ensayo de la enzima α -amilasa, el efecto de los extractos sobre la respiración y fotosíntesis y el efecto de los extractos sobre el hongo *B.cinerea*.

Germinación de semillas en placas. La germinación en placas resulto un ensayo de fácil aplicación y con una alta reproducibilidad, por lo que es un muy buen sistema para medir la actividad de aleloquímicos.



Ensayo de germinación

Ensayo de la alfa-amilasa. Este es un bioensayo originalmente diseñado para evaluar la actividad de reguladores de crecimiento en plantas. En este proyecto se implemento para evaluar el efecto de Aleloquímicos en la actividad de la enzima alfa-amilasa. Es un ensayo relativamente simple, por que su implementación resulta muy apropiada para evaluar la actividad de metabolitos secundarios



Ensayo de la enzima α -amilasa

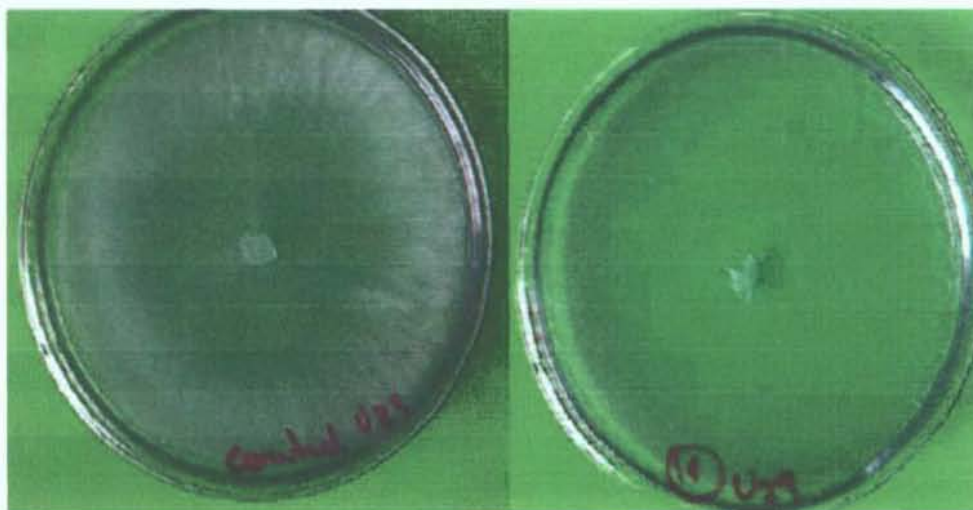
Efecto de los extractos en la respiración y fotosíntesis. El en desarrollo del proyecto se implemento el uso de un oxígrafo, equipo que permite medir consumo y/o producción de oxígeno en organelos aislados. Con la ayuda de este equipo se logró evaluar el efecto de los extractos sobre mitocondria y cloroplastos aislados.





La cámara mide el oxígeno disuelto en una solución

Efecto de extractos en *B. cinerea*. El bioensayo implementado consistió en incorporar los extractos en medios de cultivos que fueron utilizados para cubrir placas Petri. Los extractos fueron incorporados mediante filtración, una vez que el agar había alcanzado una temperatura cercana a los 50 °C, a fin de evitar una posible degradación por efecto del proceso de esterilización en autoclave. El bioensayo resulto reproducible por lo que permite evaluar de manera confiable el efecto de diversos aleloquímicos.



Bioensayo para evaluar efecto de productos naturales en hongos

En conclusión, este objetivo fue logrado en un 100%

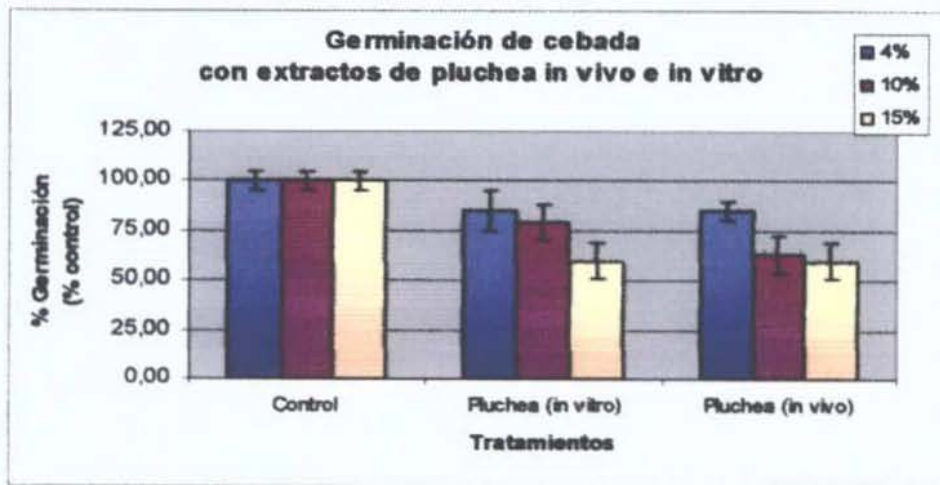
OBJETIVO 4 Determinar la actividad alelopática de los extractos vegetales.

Efecto de extractos sobre la germinación.

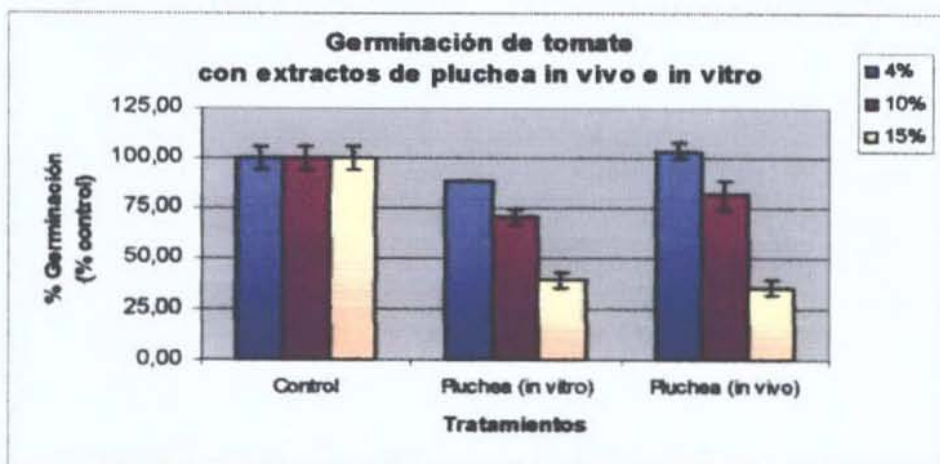
A Continuación se muestran los resultados obtenidos para cada una de las especies estudiadas.

***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.



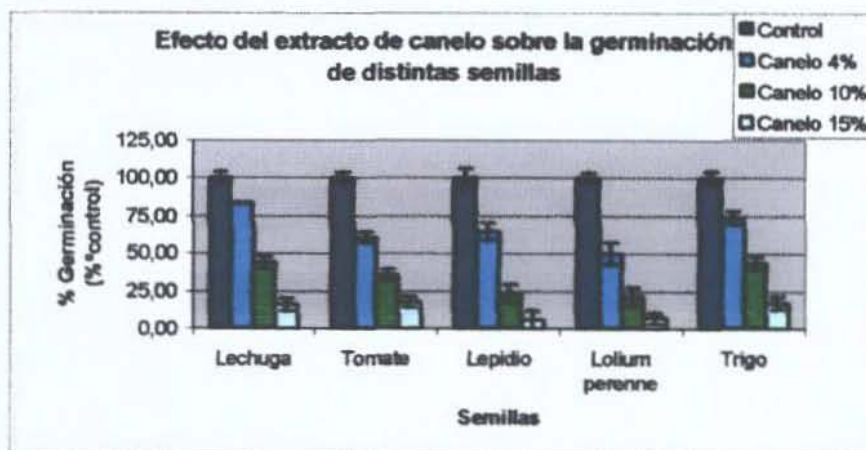
La Figura siguiente muestra los efectos de ambos extractos sobre tomate.



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

Drymis winteri.

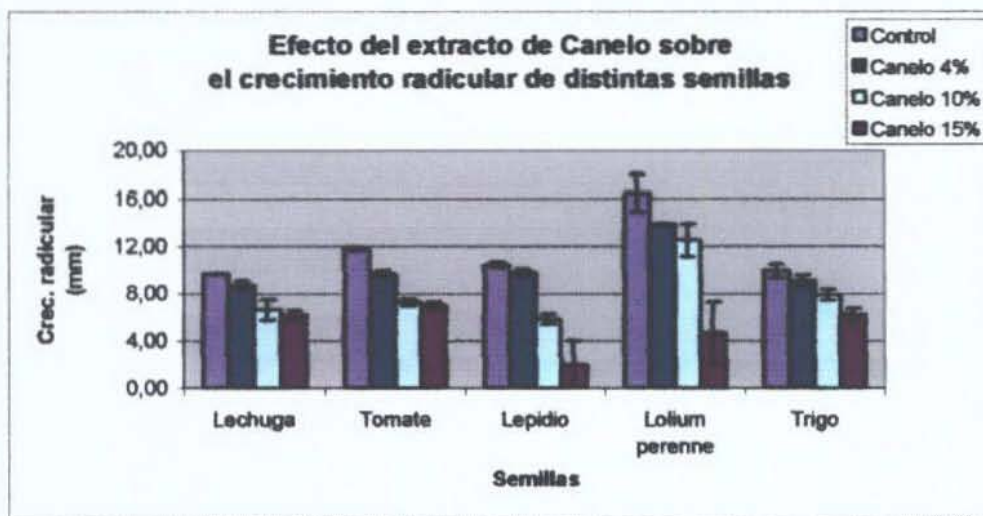
Efecto de extractos acuosos de canelo sobre la germinación de semillas. La figura siguiente resume los resultados obtenido al evaluar el efecto de extractos acuosos de canelo sobre la germinación de semillas de diferentes especies.



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

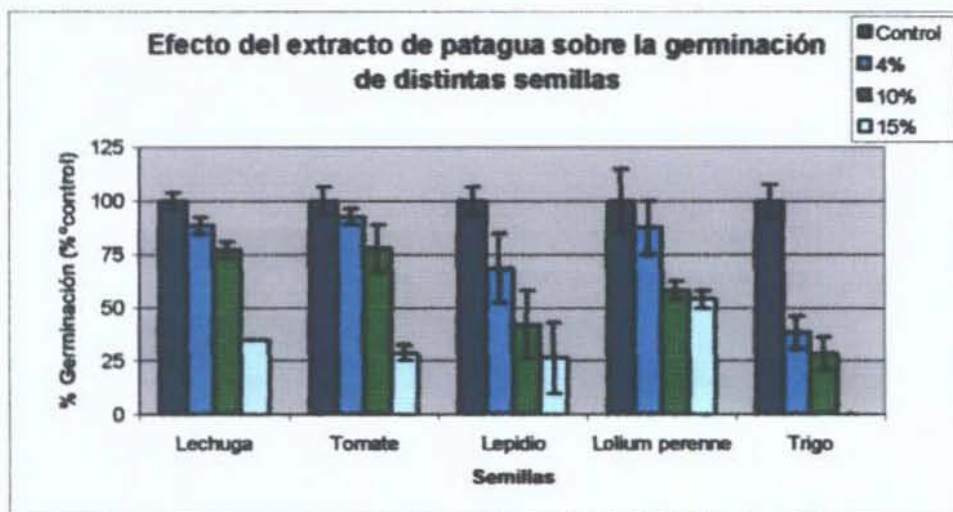
III. Efecto de los extractos sobre el crecimiento radicular.

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.

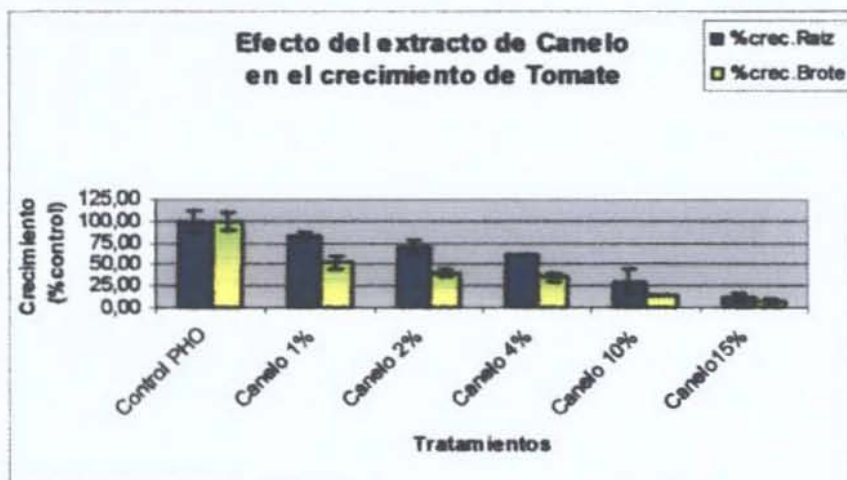
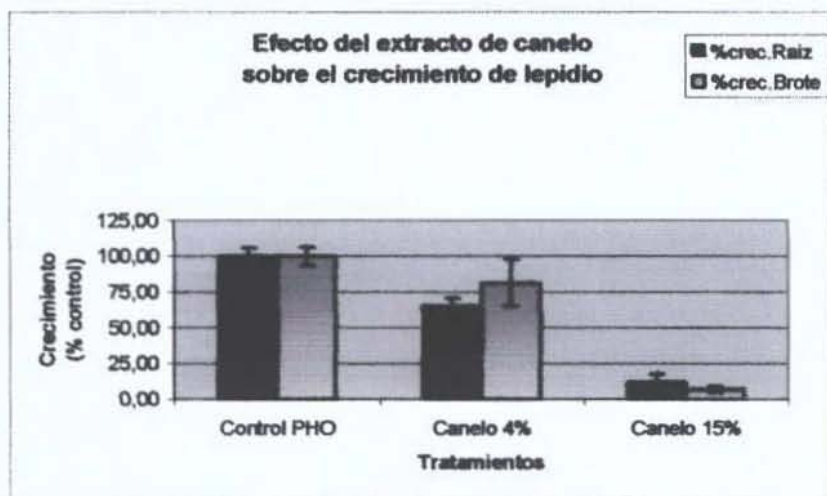


Con extractos acuosos de patagua, la especie mas afectada fue el trigo pues a una concentración de 15% p/v no hubo germinación. El resto de las especies son afectadas de manera diferencial.

IV. Efecto sobre el crecimiento de plantas.

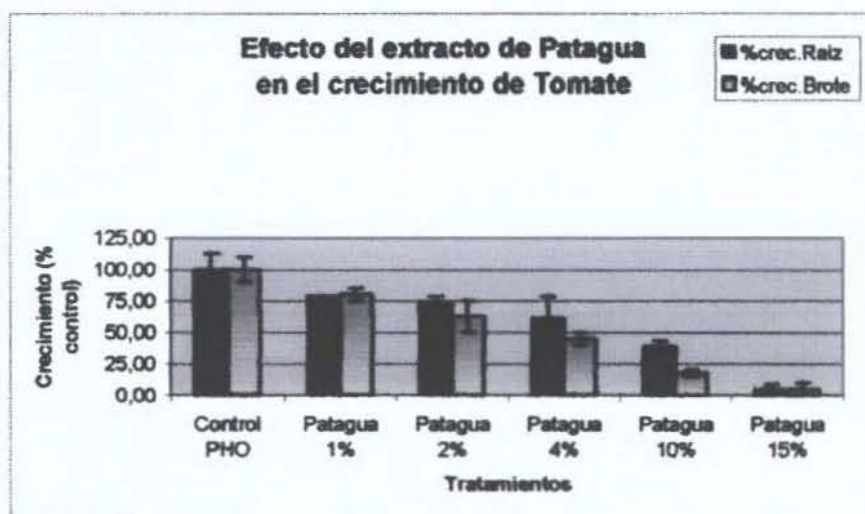
Drymis winterii

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.



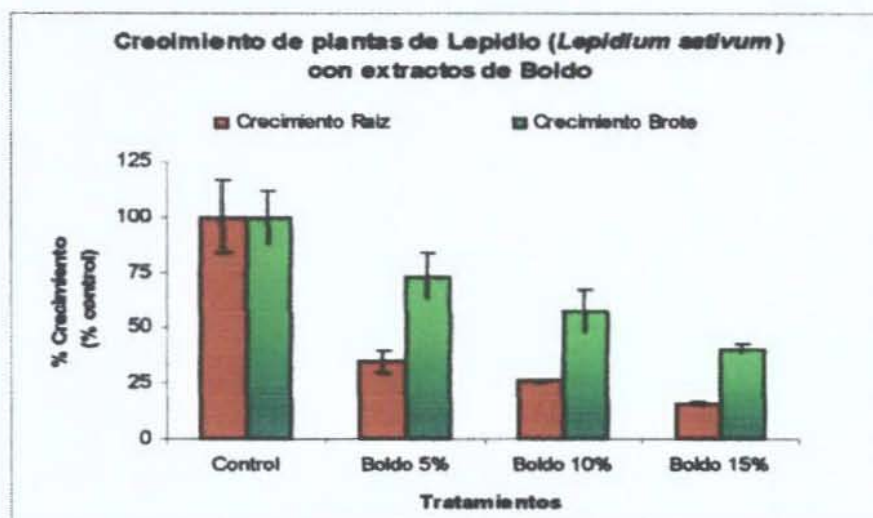
Myrcegenia planipis

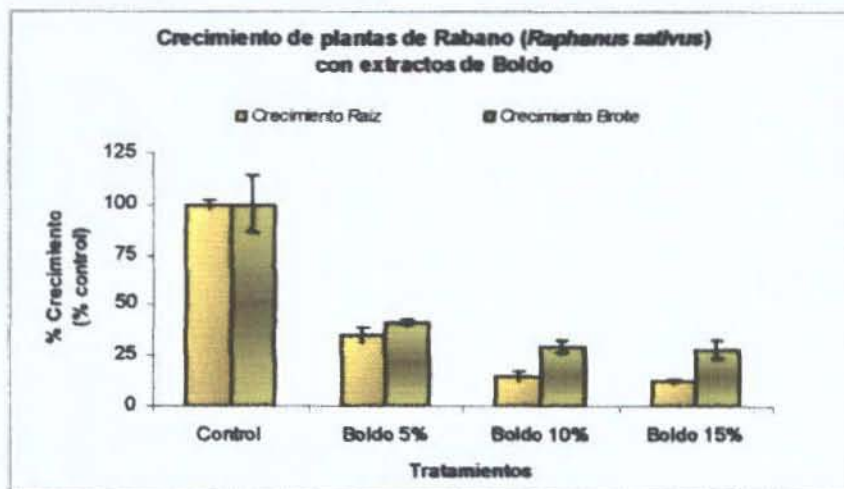
Para esta especie se muestra los resultados obtenidos con el crecimiento de tomate y *Lolium perenne*



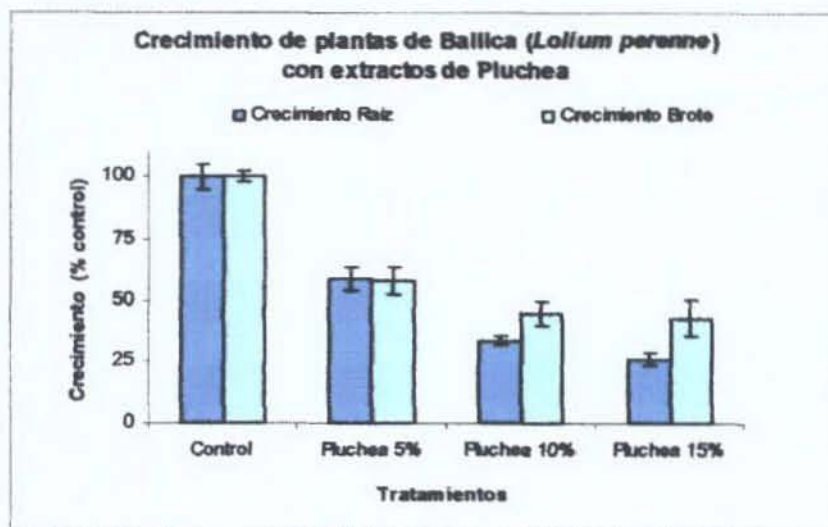
El crecimiento de los brotes de tomate se vio afectado de manera significativa a partir de una concentración equivalente al 4%.

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





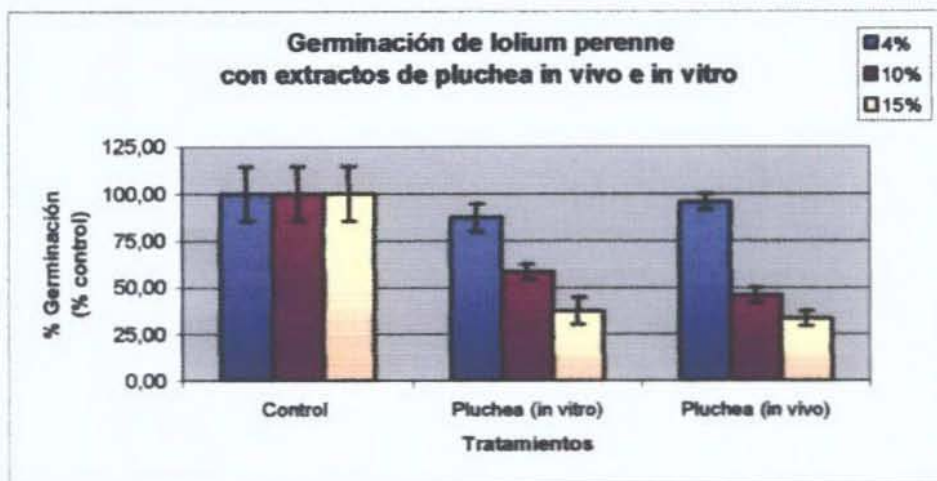
Pluchea absinthiodes. Extractos de *Pluchea* inhiben el crecimiento de ballica.



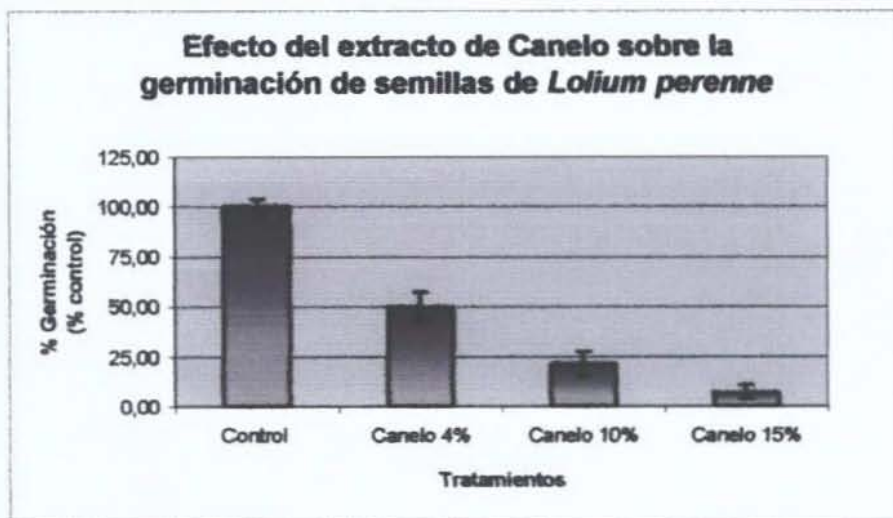
Efecto de extractos sobre semillas de malezas

a) *Lolium perenne*.

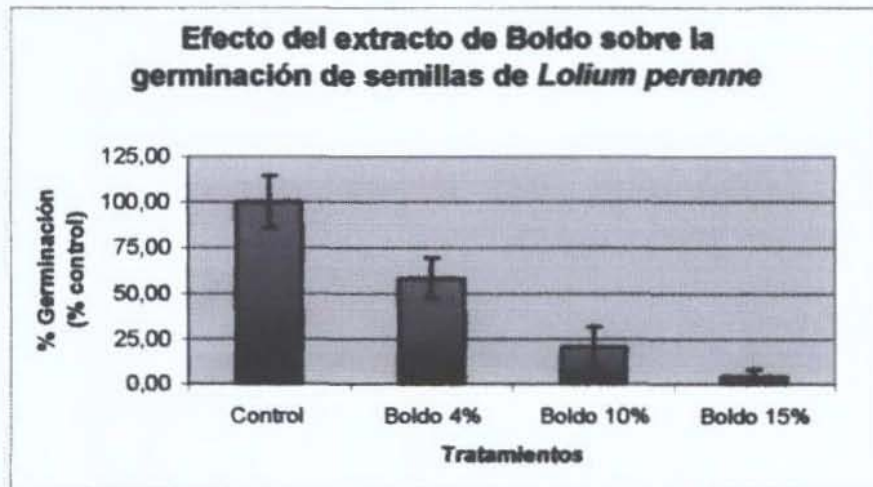
Pluchea absinthioides. Se observa que los extractos de pluchea tanto *in vivo* como *in vitro*, inhiben la germinación de *L. perenne*



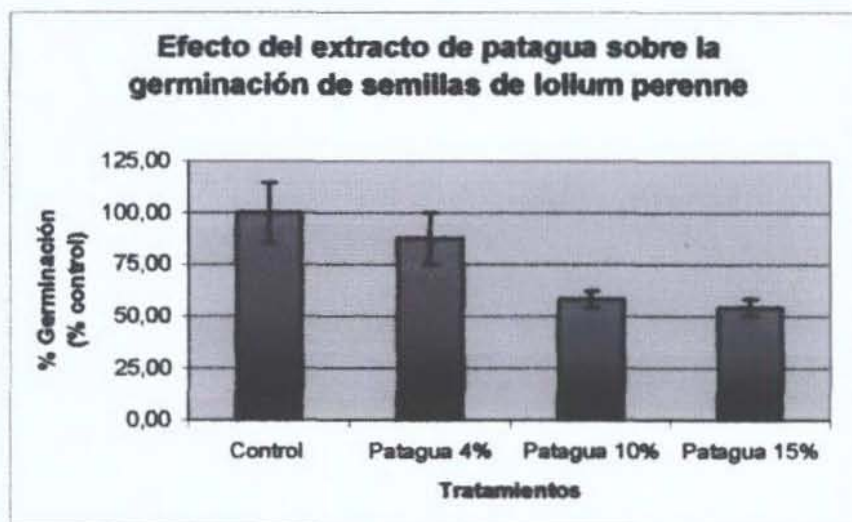
***Drymis winteri*.** Los extractos de canelo muestran un fuerte efecto inhibitorio de la germinación de *L. perenne*



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 inhibidor 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.

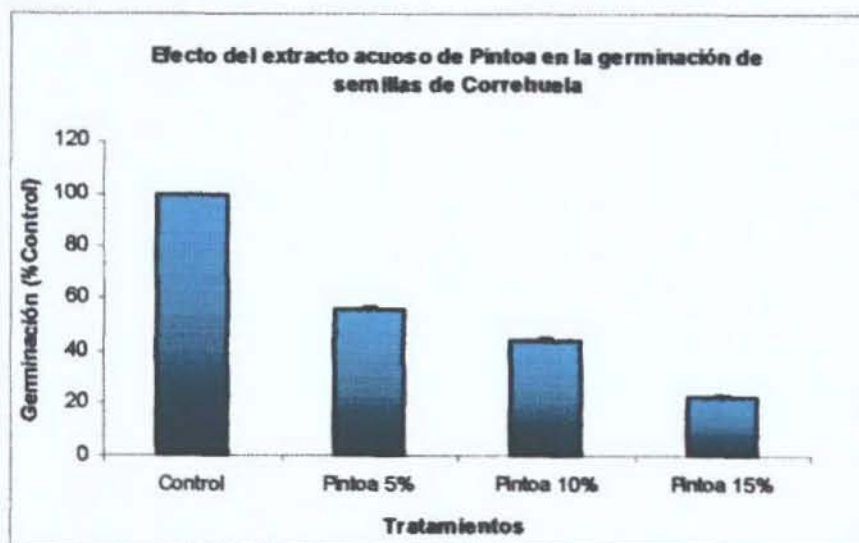


***Peumus boldus*.** El extracto de boldo inhibió la germinación de semillas de yuyo de manera significativa, a una concentración de 15% p/v no hubo germinación.

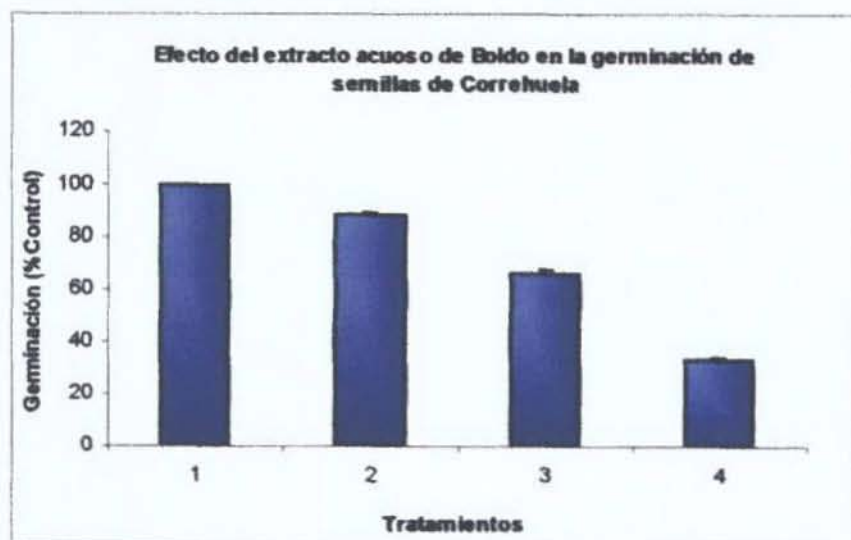


c) *Convolvulus arvensis* (correhuela)

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.



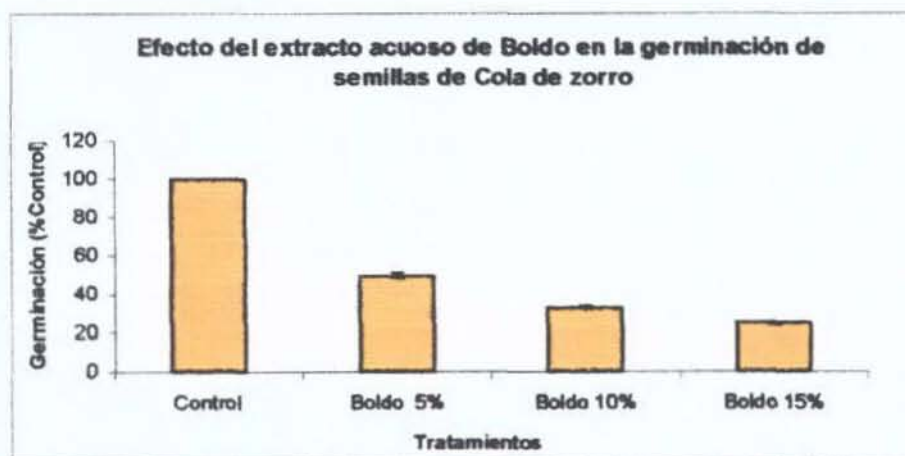
Se observa que ambos extractos tuvieron un efecto similar en la inhibición de la germinación de semillas de correhuela.

d) *Cynosurus echinatus* (Cola de Zorro)

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



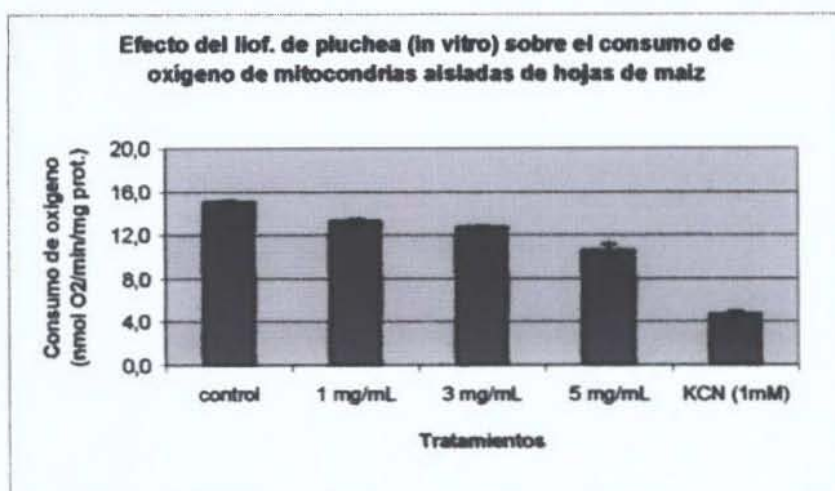
Peumus boldus. El extracto de boldo inhibió la germinación de semillas de cola de zorro.



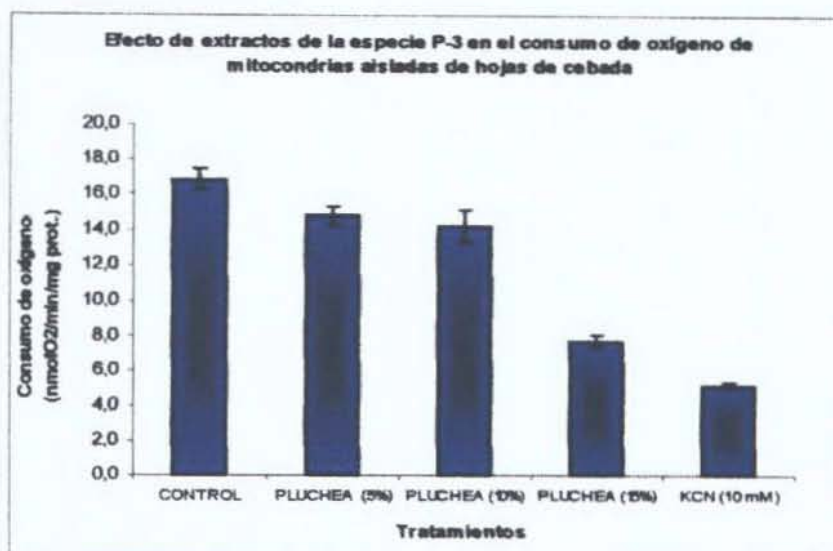
Se observa que el extracto de boldo presento una mejor actividad inhibidora de la germinación que el extracto de pintoa.

Efecto de extractos sobre mitocondrias y cloroplastos aislados.

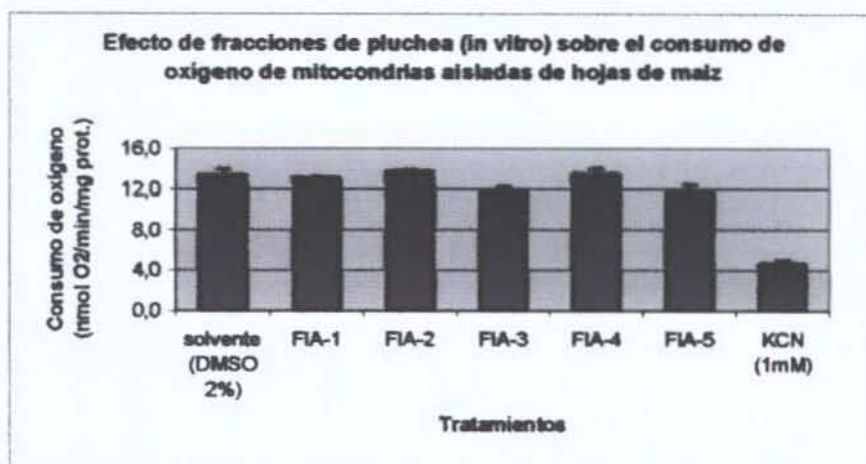
Pluchea absinthioides. La figura muestra el efecto de diferentes concentraciones de liofilizado de pluchea sobre el consumo de oxigeno de mitocondrias de maíz aisladas. Se observa que el efecto es significativo solo a una concentración de 5 mg/ml. Se puede sugerir que el efecto inhibidor de esta planta no esta 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 oxigeno aumenta con la concertación del extracto.

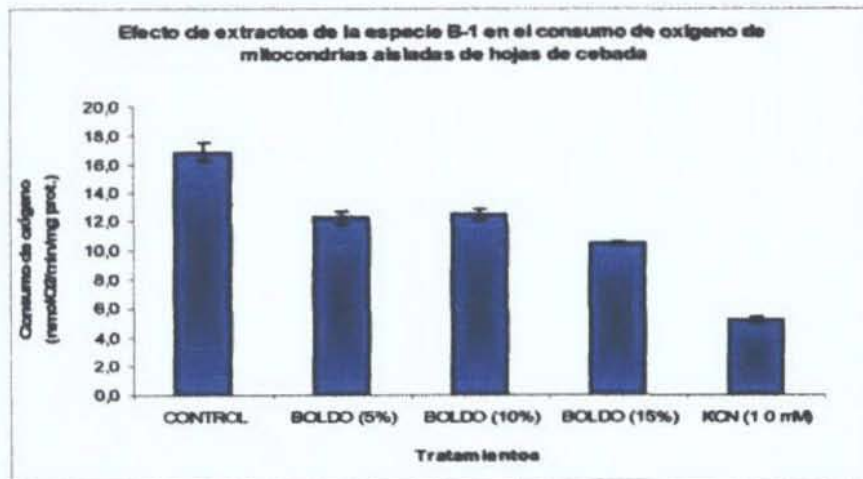


Del extracto inicial se obtuvieron diferentes fracciones cuya actividad se muestra en la figura siguiente.

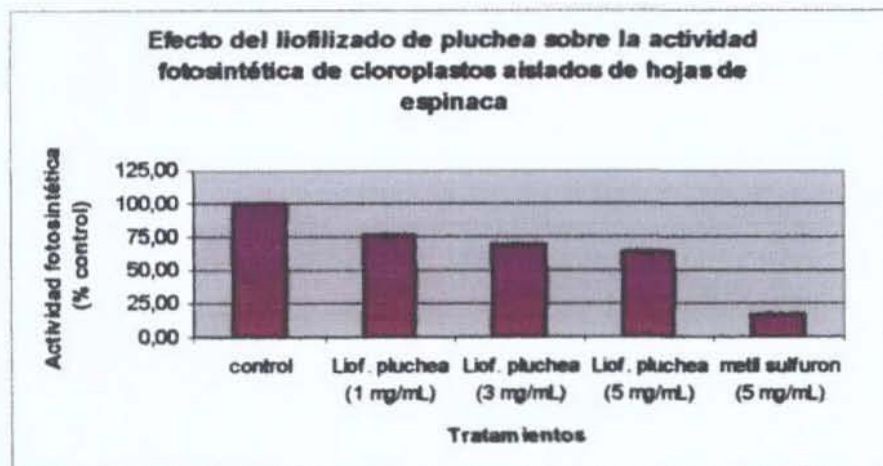


Se puede concluir que ninguna de las fracciones es capaz de inhibir el proceso de respiración mitocondrial. Esto sugiere que en el extracto inicial existen moléculas que se potencian en su actividad.

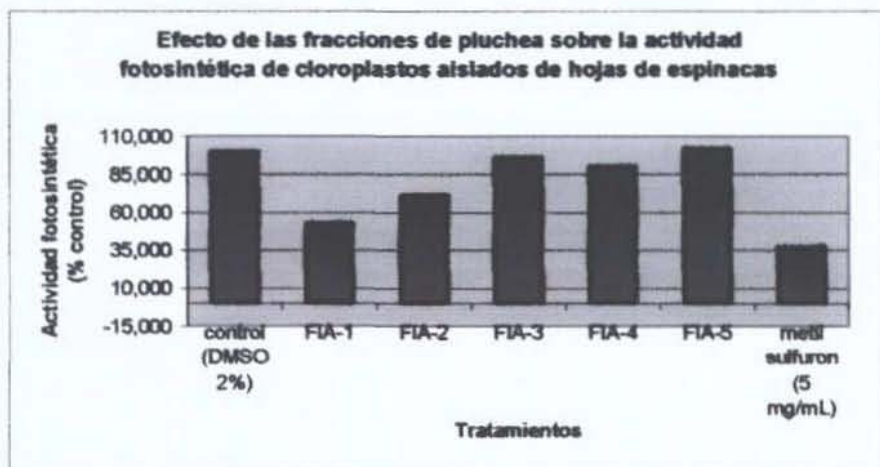
Peumus boldus. Los extractos de boldo muestran una inhibición de la actividad respiratoria que no depende de la concentración del extracto.



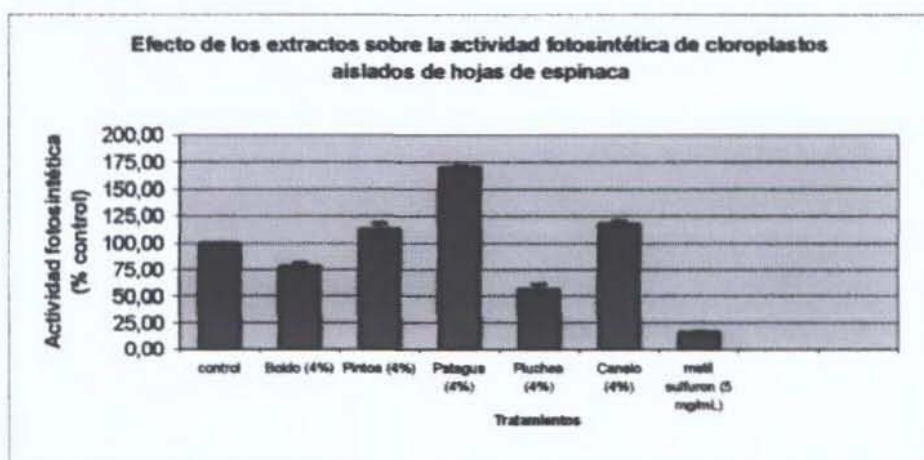
Efecto de extractos sobre cloroplastos aislados. La figura muestra el efecto de un liofilizado de pluchea sobre la actividad de cloroplastos. Se observa que hay un efecto inhibitor del proceso que no es dosis dependiente, dado que las diferencias entre 3 y 5 mg/ml son poco significativas.



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.

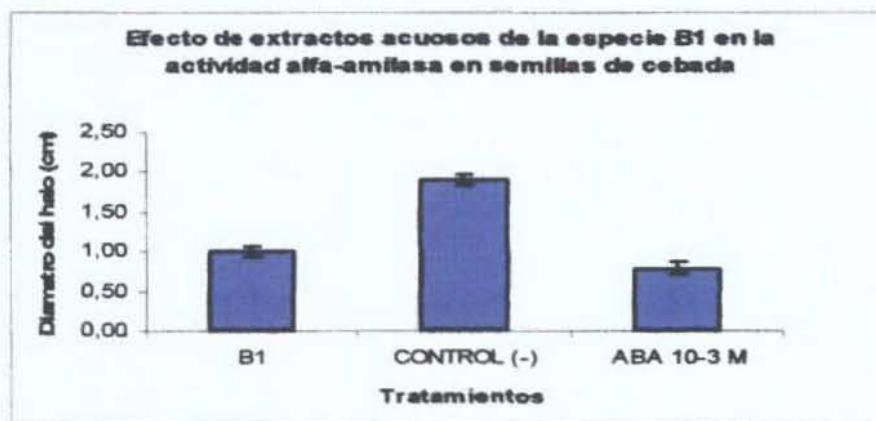


En la figura siguiente se resumen los efectos de extractos de las distintas especies en estudio sobre la actividad de cloroplastos aislados. De los resultados mostrados se puede concluir que a una concentración equivalente al 4% p/v boldo y *pluchea* inhiben la actividad de cloroplastos aislados, mientras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

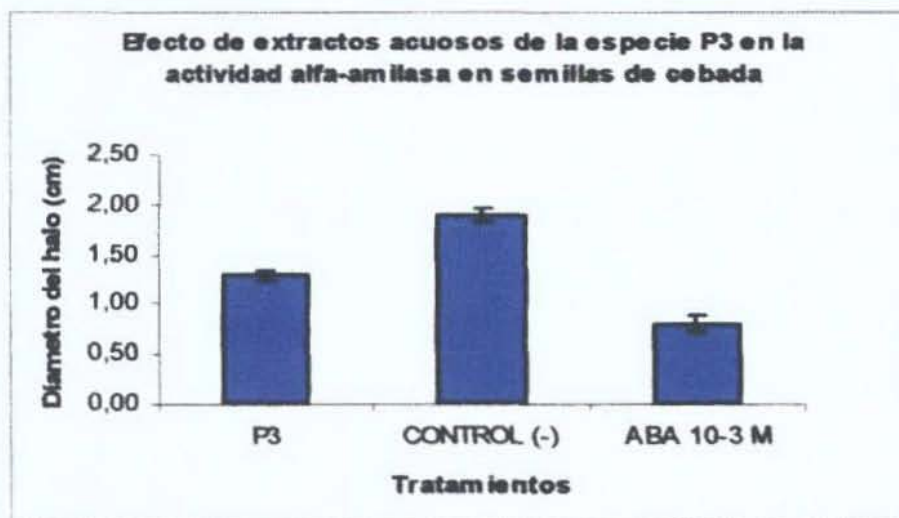


V. Efecto sobre la actividad de la enzima α -amilasa

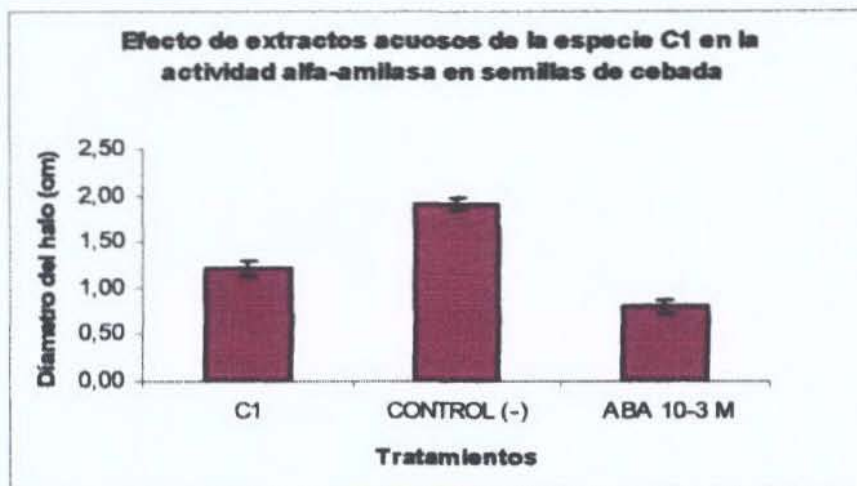
Peumus boldus. El extracto de boldo mostró una efecto inhibidor de la actividad α -amilasa semejante al ejercido por ABA, conocido inhibidor de la germinación



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.

En conclusión este objetivo se logro en un 100%

OBJETIVO 5. Evaluar las propiedades antifúngicas de los extractos vegetales

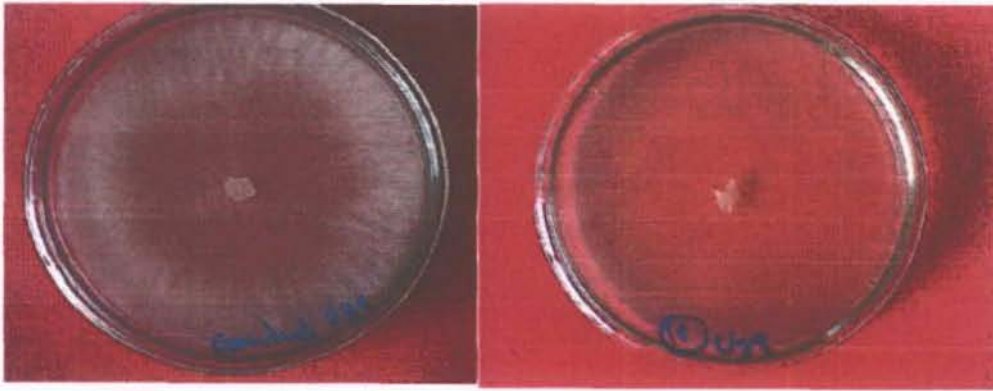
***Botrytis cinera*.** En la actualidad se ha logrado obtener 5 cepas obtenidas de material proveniente de diferentes viñas del valle del Maipo. Además, se dispone de una cepa aislada de uva que ha permitido realizar ensayos preliminares.

Obtención de cepas de *B. cinerea*

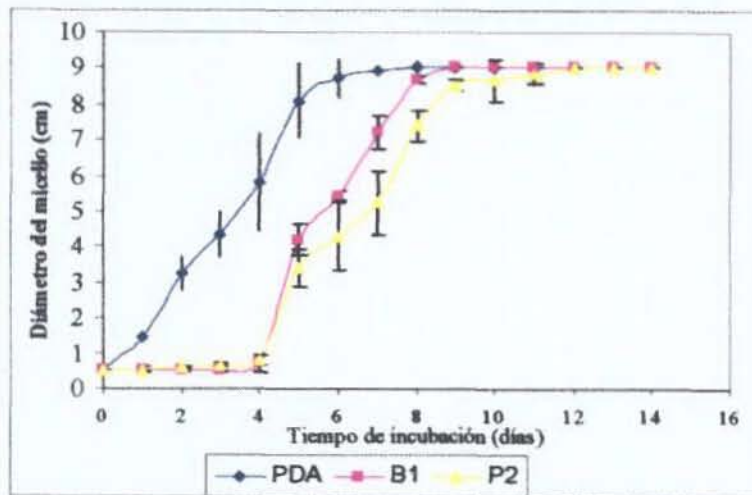
Se dispone de 5 cepas aisladas de uvas infectadas por el hongo y fue purificada de manera que cada cepa utilizada proviene de un conidio. El crecimiento y mantención del hongo se realizó de la siguiente manera: El hongo ha sido crecido en el medio de cultivo agar papa-dextrosa y mantenido en tubos inclinados. 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.



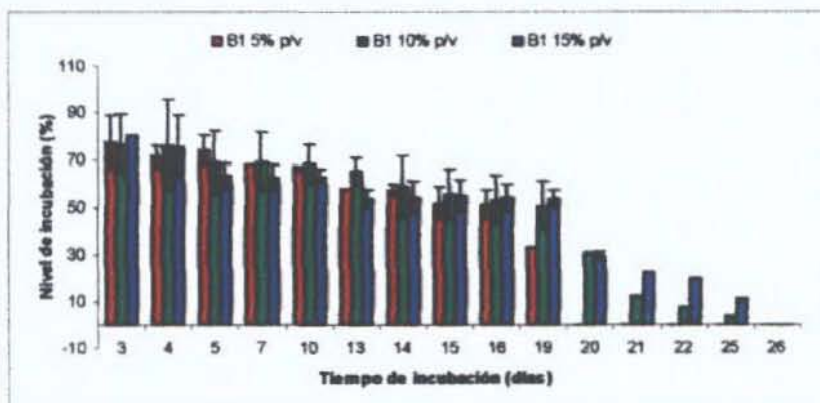
Al evaluar el efecto de extractos al 10% para las especies señaladas se pudo constatar que ambas retardan el crecimiento.



La figura siguiente muestra los resultados obtenidos al tratar el hongo *B. cinerea* con extractos de las diferentes especies analizadas.

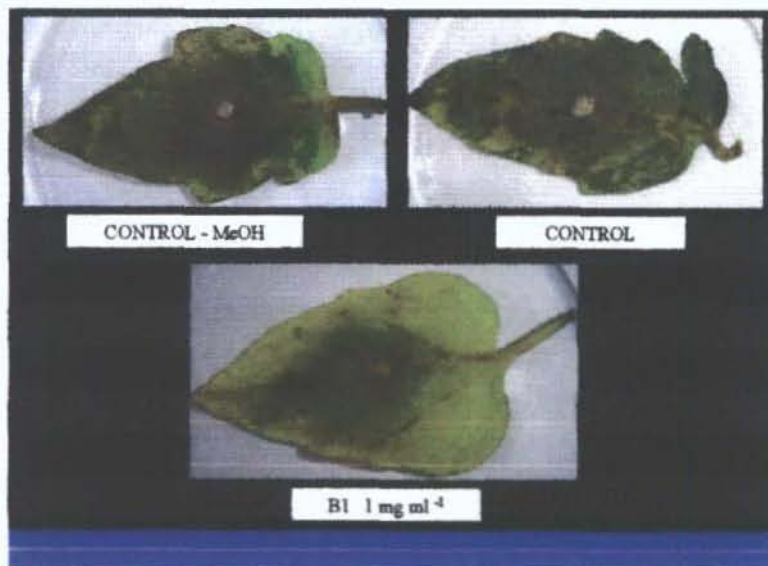


La figura siguiente muestra el porcentaje de inhibición del desarrollo del micelio del hongo *B. cinerea* a los 5 y 10 días. Se observa que los extractos inhibieron el desarrollo del micelio de manera significativa en valores superiores al 50% por mas de 15 días.

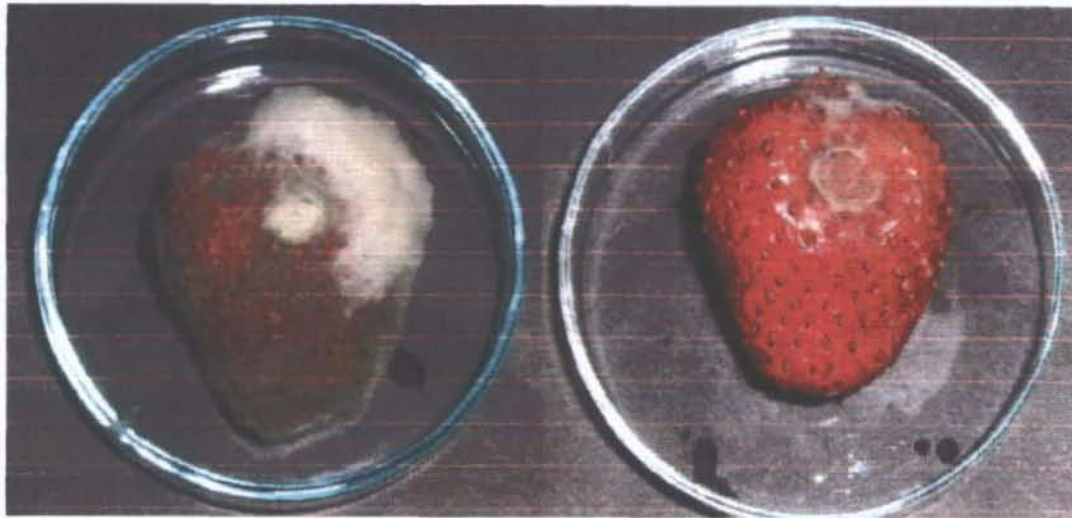


Ensayos *in vivo*.

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

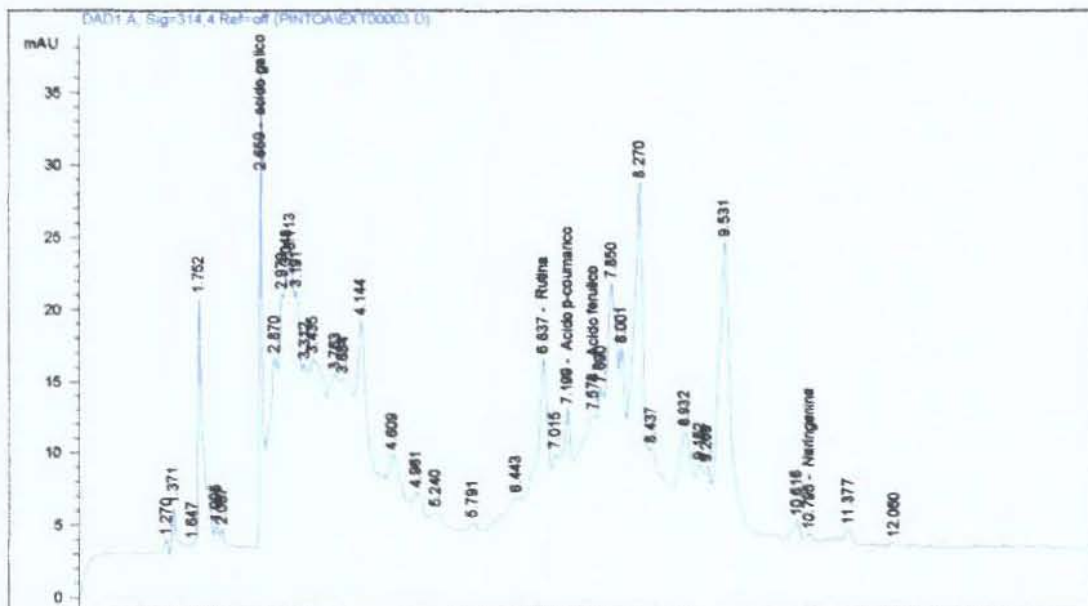
Se han probado diferentes condiciones de cultivo que muestran que este sistema permite aumentar los rendimientos, pero fundamentalmente en plantas no leñosas.

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.



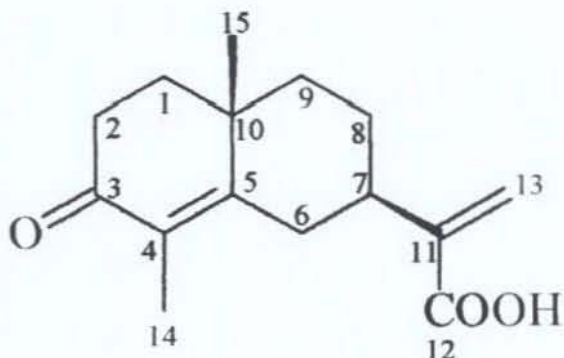
Extracto crudo (1mg/mL)

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



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

6. IMPACTOS DEL PROYECTO

Impactos tecnológicos

Propiedad intelectual	Numero	Detalle
Patentes		
Solicitudes de patentes	1	Se encuentra en tramite 1 solicitud
Intención de patentar	2	Extractos alelopáticos en <i>Pintoa Chilensis</i> , Propagación <i>in vitro</i> y extractos activos en <i>Peumus boldus</i>
Secreto industrial		
Resultado no patentable	2	Los estudios con <i>Pluchea</i> in vivo
Resultado de interés público	5	La propagación <i>in vitro</i> de plantas (5), las actividades herbicidas de extractos, las actividades antifúngicas de los extractos

Logro	Numero	Detalle
Convenio o alianza tecnológica	2	CSIC España, Dra Azucena Gonzalez
Generación de nuevos proyectos	1	Proyecto FDI-Corfo (presentando)

Impactos científicos

Logro	Numero	Detalle
Publicaciones	3	En elaboración, debido a protección
Eventos de divulgación científica	5	2 presentaciones en Congreso

		Biотecnológico Argentino, 1 Presentación en Feria Explora, 1 Presentación en Congreso Agronómico y 1 Presentación en seminario FIA-REDBIO
Integración de redes de investigación		

Impactos de formación

Logro	Número	Detalle
Tesis de pregrado	2	2 Tesis de Bioquímica: Sandra Orellana y Mauricio Lozano.
Tesis de postgrado	1	Tesis de Doctorado en Manejo de Recursos Naturales: Propiedades antifúngicas de plantas Chilenas
Pasantías	1	Estadia de 1 mes en España
Cursos de capacitación	2	Un taller Extractos Vegetales y Curso Bioplaguicidas Naturales

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, pues no se utiliza ninguna especie desde su habitat natural.
- Se han generado las bases para la instalación de una industria productora de Aleloquímicos a partir de plantas chilenas.
- Los resultados están siendo protegidos mediante la solicitud de patentes.

7. PROBLEMAS ENFRENTADOS DURANTE LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO: Durante la ejecución de este proyecto no se presento ningún tipo de problemas que afectaran el desarrollo del proyecto.

9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Desde el punto de vista:

Técnico:

- Se logro desarrollar cultivos *in vitro* para todas las especies estudiadas; Canelo, Boldo, Patagua, Pintoa y Pluchea.
- 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*.

Económico.

Los impactos económicos que pueden generarse de este proyecto se resumen en los siguientes aspectos:

- Se generaron 3 solicitudes de patentes
- Existen las bases científico-tecnológicas para la generación de empresas dedicadas a producir extractos bioactivos de plantas chilenas.
- El desarrollo de un producto natural para el control de *B. cinerea*, representa un gran avance en el control de este hongo fitopatógeno, que genera grandes pérdidas económicas en pre y post cosecha.

De gestión.

- En el desarrollo de este proyecto contribuyeron diferentes capacidades, que permitieron el logro de la totalidad de los objetivos.

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.

IV. INFORME DE 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.
- Propagación in vitro de plantas medicinales”, Dr. Gustavo Zúñiga (Chile). IV congreso internacional de plantas medicinales, Talca 2001
- 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.
- Efecto alelopático de extractos de *Pluchea absinthioides* cultivada in vitro. 56 Congreso Agronomico.
- El proyecto presento 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).

Proyecto USACH-FIA. Artículo publicado en Revista BIOPLANET (Marzo-Abril 2002)

VALORANDO NUESTRA FLORA NATIVA

La conservación y utilización de las propiedades biológicas propias de la flora chilena puede ser un primer paso para la formación de una plataforma científica que sustente el desarrollo económico nacional.

Una de las más notorias características geográficas de **nuestro país es la diversidad climática observable a través** de toda su extensión y la variedad de flora y fauna que **existen gracias a ello. Si bien es notoria su abundancia, la** continua acción del hombre sobre su medio ambiente menoscaba la oportunidad de varias especies de plantas, muchas de ellas autóctonas, de vivir, reproducirse y, **eventualmente, defenderse contra las agresiones externas.** Esta capacidad forma parte del trabajo que el doctor Gustavo Zúñiga, profesor titular y vicedecano de Investigación y Desarrollo de la Facultad de Química y Biología de la Universidad de Santiago de Chile, USACH, desarrolla desde hace unos años.



El proyecto que el doctor Gustavo Zúñiga presentó al FIA tiende a generar una plataforma que permita a Chile ser un productor importante de compuestos que reemplacen a los químicos que hoy son importados, obtenidos de plantas cultivadas in vitro.

“Hemos implementado cultivos in vitro como un sistema alternativo en la obtención de moléculas bioactivas, basado en dos premisas: nuestro país posee una gran biodiversidad en términos vegetales y, por otro lado, el uso indiscriminado que se hace de algunas especies ha puesto a varias en peligro de extinción. Por lo tanto, partimos con este proyecto cuando la intención fue contribuir, mediante el desarrollo de esta técnica, a la generación de elementos para conservar el germoplasma de especies nativas, y luego vimos que era posible demostrar que el tejido elegido era capaz de producir de compuestos con actividad biológica, de manera equivalente a la encontrada en las plantas in vivo, lo que nos permitió orientar nuestra investigación hacia el campo aplicado enfocándola a la producción de compuestos aleloquímicos en plantas chilenas cultivadas in vitro”. Esta investigación plasmada en un proyecto fue seleccionada en el primer concurso Nacional de Proyectos de Desarrollo e Innovación Biotecnológica 2001, convocado por la Fundación para la Innovación Agraria (FIA).

Los aleloquímicos son moléculas químicas producidos por la planta que provocan una acción determinada en ciertos sistemas biológicos, así, un fármaco aislado de un vegetal es una molécula bioactiva. El planteamiento básico para usar estos aleloquímicos se basa en que las plantas producen diferentes compuestos a través de los cuales interactúan con el entorno, actuando en la atracción de agentes polinizadores o en términos defensivos, ya sean patógenos (bacterias, virus, hongos) o plagas de insectos. También existe un grupo de compuestos que tienen las plantas para interactuar entre ellas, en un fenómeno llamado alelopatía. “Es muy interesante, puesto que a partir de la interacción planta a planta a través de estas moléculas es posible generar herbicidas ecológicos lo que constituye una amplia necesidad, dado que los aleloquímicos naturales en general entregan la posibilidad de reemplazar todos aquellos químicos sintéticos que provocan daños a los humanos y al medio ambiente. Por otra parte, en muchos países se está volviendo a lo tradicional, y la agricultura orgánica, que ha alcanzado un desarrollo importante, requiere de este tipo de moléculas para reemplazar compuestos de origen químico artificial”.

Este proyecto trata de contribuir a la generación de elementos para conservar el germoplasma de especies nativas que están en peligro de extinción por causa de su explotación indiscriminada.

Este es el contexto en el cual se basó el proyecto que el profesor Zúñiga presentó al FIA, tendiente a generar una plataforma que permita a Chile ser un productor importante de compuestos que reemplacen a los químicos que hoy son importados, lo cual presenta dos aspectos de interés. El primero apunta a la proyección económica, pues a partir del éxito pueden surgir varias patentes que permitan el desarrollo de empresas para la producción de compuestos. Segundo, permitiría conservar la biodiversidad nacional sin afectarla en forma significativa, “por ejemplo, nosotros habitualmente exportamos la materia prima, como el Quillay o el Boldo y luego importamos los principios activos. El objetivo es que aquí seamos capaces de tener una completa implementación que habilite el desarrollo de la exportación, ya sea de moléculas bioactivas o extractos estandarizados, por ejemplo”, explica el profesor Zúñiga. De este modo el proyecto apunta a la obtención de aplicaciones agrícolas como la obtención de herbicidas naturales para reemplazar los sintéticos y encontrar compuestos para combatir patógenos como hongos, que atacan comúnmente cultivos frutales, lo cual ya ha mostrado resultados.



Las plantas producen diferentes compuestos a través de los cuales interactúan con su entorno, actuando en la atracción de agentes polinizadores o en términos defensivos, ya sean patógenos (bacterias, virus, hongos) o plagas de insectos.

editados por investigadores nacionales, que tratan el tema. “Hemos intentado hacer cultivos in vitro de la mayor parte de las plantas del país y paralelamente hemos ido probando la actividad biológica. Algunas funcionan bien como antifúngicos, otras son mejores como herbicidas. Estamos haciendo un catastro de un número bastante grande de vegetales, que supera al número que especificamos en el proyecto, puesto que ya habíamos desarrollado, con ellas, un trabajo preliminar. Entre las especies con las que se cuenta ya hay una que sólo ‘nosotros poseemos’, y que corresponde a una especie que ha sido sobreexplotada en la Tercera Región, y que según la Conaf, se clasifica como una especie rara. El trabajo desarrollado podría permitir la generación de un programa de reforestación con esta especie.”

Un gran mérito del equipo del profesor Zúñiga es trabajar con ideas propias que han desarrollado dentro del trabajo para la USACH y paulatinamente han establecido lazos con laboratorios europeos, especialmente españoles. Y aunque las plantas con las que se trabajan son chilenas, es reacio a entregar sus nombres, pues es posible que sus principios activos sean patentados por personas ajenas al equipo y les dificulte su labor, más aún si tiene una proyección empresarial. Al respecto el profesor Zúñiga plantea que debería existir un organismo que conociera los proyectos en forma centralizada y que se involucrara en la protección de los resultados. “De lo contrario se dificulta el desarrollo propio y se corre el riesgo que otros protejan nuestra biodiversidad, lo que ya ha pasado con algunas de nuestras especies. Por otra parte, impugnar una patente implica tiempo y mayores recursos, que en muchos casos no se disponen.”

El proyecto, tal como está definido para el FIA, apunta al desarrollo de intereses agrícolas, sin embargo, en función del dinamismo de la ciencia, a futuro no se descarta el trabajo con investigadores del área farmacológica, a fin de descubrir medicamentos partiendo de los principios activos que sean útiles a esa área, como los antioxidantes y otros compuestos que funcionan como antibacterianos, lo cual también se perfila como una línea de desarrollo interesante.

“Tenemos un ejemplo en relación a una planta que cultivada in vitro, produce compuestos que inhiben el desarrollo de malezas. Esto genera amplias expectativas de generar un herbicida natural, de bajo impacto ambiental. De igual forma en un trabajo conjunto con colegas fitopatólogos, estamos evaluado la capacidad de algunos extractos obtenidos desde de plantas cultivadas in vitro, frente a hongos fitopatógenos y en este contexto los resultados que esperamos al finalizar el proyecto son muy prometedores”, apunta Zúñiga.

La selección de las plantas chilenas que forman parte del estudio se realizó en forma sistemática a partir de descripciones etnobotánicas generadas en estudios anteriores y de una exhaustiva revisión de libros

El papel que universidades como la USACH juegan en este tipo de investigaciones es vital, ya que “nuestra universidad ha entendido que el trabajo científico de sus docentes va en su propio beneficio, apoyándolo y estableciendo políticas para fomentar que los investigadores postulen a aquellos concursos donde su temática de trabajo sea más fuerte y en los que consideren que tienen oportunidades”. En este proyecto, la mayor parte del financiamiento proviene del FIA, la USACH facilita la infraestructura, haciéndose cargo de costos operacionales como mantención de laboratorios, entre otros gastos complementarios. El monto total del proyecto asciende a 246 millones de pesos. El trabajo comenzó el 20 de diciembre pasado y su duración es de cuatro años. Este es el primer proyecto que la USACH obtiene en el FIA, postulando como única institución ejecutora.

V ANEXOS

Listado de Participantes

Nombre	Formación	Función
Gustavo Zúñiga	Ph.D en Ciencias Biológicas	Coordinador
Luis Villarroel	Magister en Química	Coordinador Alterno
Sandra Orellana	Bioquímico	Ayudante de Investigación
Lorena Tapia	Bioquímico	Ayudante de Investigación
Alejandra Ribera	Ing. Agronomo	Ayudante de Investigación
Cristina Vargas	Técnico Químico	Propagación de plantas
Graciela Rojas		Propagación de plantas

VI 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.