

UCH-FC  
Biotecnología  
L 231  
C-1



Escuela de Pregrado  
Facultad de Ciencias  
Universidad de Chile



## **“Optimización del cultivo *in vitro* de *Azorella trifurcata* para la obtención de diterpenos con propiedades medicinales”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

**Arturo Osvaldo Lamilla Maulén**

Directora del Seminario de Título: Dra. Claudia Stange Klein

Codirector del Seminario de Título: Dr. Aurelio San Martín Barrientos

**Marzo, 2016**

**Santiago de Chile**



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título presentado por el candidato:

**ARTURO OSVALDO LAMILLA MAULÉN**

**“Optimización del cultivo *in vitro* de *Azorella trifurcata* para la obtención de diterpenos con propiedades medicinales”**

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial para optar al título profesional de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dra. Claudia Stange Klein  
**Directora Seminario de Título**

Dr. Aurelio San Martín Barrientos  
**Co-Director Seminario de Título**

**Comisión Revisora y Evaluadora**

Dr. Orlando Muñoz Muñoz  
**Presidente**

Dra. Lorena Norambuena Morales  
**Evaluadora**

This block contains three handwritten signatures in blue ink, each written over a horizontal line. The signatures are for Claudia Stange Klein, Aurelio San Martín Barrientos, and Orlando Muñoz Muñoz. A circular stamp is placed over the middle signature, containing the text "FACULTAD DE CIENCIAS", "BIBLIOTECA CENTRAL", and "U. DE CHILE".

Santiago, Marzo de 2016

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer la buena disposición de mis dos tutores en este proceso de titulación, específicamente al profesor Aurelio San Martín que me ayudó desde el principio para poder establecer un tema de investigación y además me permitió trabajar en el Laboratorio de Productos Naturales en donde todo su equipo colaboró conmigo amablemente en todo el proceso; y también a la profesora Claudia Stange y a todo su equipo CSK los cuales me recibieron entusiastamente en su laboratorio para aprender a trabajar con técnicas de biología molecular en la planta *Azorella trifurcata*, ya que sin su buena disposición ninguno de mis resultados ni avances en mi investigación se hubieran podido realizar. Extiendo mis agradecimientos a todo el Centro de Biología Molecular en donde también colaboraron conmigo de manera importante a resolver los problemas que tuve en mi trabajo y a aportar a mi formación como profesional. Además agradezco todo el apoyo que me han entregado mis seres queridos en este proceso, los cuales jugaron un rol muy valioso para poder superar toda mi etapa universitaria.

*Arturo Lamilla Maulén.*

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>4</b>
1.1 El género de plantas <i>Azorella</i> .....	4
1.2 Diterpenos: estructura, función y biosíntesis.....	8
1.3 Cultivo <i>in vitro</i> de células de especies vegetales que producen metabolitos secundarios de interés farmacológico y estrategias para su mejoramiento.....	13
1.4 Estrategia a utilizar.....	17
1.5 Objetivo General.....	18
1.6 Objetivos Específicos.....	18
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
2.1 Material biológico.....	19
2.2 Reactivos.....	19
2.3 Plásmidos.....	19
2.4 Partidores.....	20
2.5 Obtención y esterilización de explantes de <i>Azorella trifurcata</i> .....	20
2.6 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Azorella trifurcata</i> .....	21
2.7 Cultivos y subcultivos de callos de <i>Azorella trifurcata</i> en medio líquido con la aplicación de los elicitores .....	22
2.8 Extracción y análisis en TLC (cromatografía en capa fina) de compuestos orgánicos provenientes de los cultivos líquidos de callos de <i>Azorella trifurcata</i> .....	24
2.9 Extracción de ARN y síntesis de ADNc de hojas de <i>Azorella trifurcata</i> .....	24
2.9.1 Extracción de ARN de hojas de <i>Azorella trifurcata</i> .....	24
2.9.1.1 Cuantificación y Análisis de ARN total de hojas de <i>Azorella trifurcata</i> .....	26
2.9.2 Síntesis de ADNc de hojas de <i>Azorella trifurcata</i> .....	26
2.9.2.1 Tratamiento de la muestra con DNasa I.....	26
2.9.2.2 Síntesis de ADNc por medio de Transcripción Reversa.....	26
2.10 Elaboración de partidores para PCR convencional.....	27
2.11 PCR convencional utilizando ADNc como molde.....	28
2.11.1 PCR con Taq ADN Polimerasa.....	28

2.11.2	PCR con Pfu ADN Polimerasa.....	28
2.12	Electroforesis de ácidos nucleicos (ADN y ARN) en geles de agarosa.....	30
2.13	Purificación y concentración de un producto de PCR de interés.....	31
2.14	Ligación del fragmento en el vector pCR8 y transformación en células de <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ .....	31
2.15	Producción de células de <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ quimiocompetentes.....	32
2.16	PCR de colonias.....	33
2.17	Purificación de ADN plasmidial.....	33
2.18	Digestión enzimática de la construcción pCR8/fragmento con EcoRI.....	34
2.19	Secuenciación y análisis de las secuencias del producto clonado.....	34
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
3.1	Establecer el cultivo <i>in vitro</i> líquido de suspensiones celulares provenientes de callos de <i>Azorella trifurcata</i> aplicando los elicitores.....	35
3.2	Evaluar la producción de diterpenos en cultivos líquidos de suspensiones celulares de <i>Azorella trifurcata</i> sometidos a los elicitores mediante análisis de cromatografía en capa fina (TLC).....	37
3.3	Diseñar los oligonucleótidos y analizar la expresión de genes involucrados en vías metabólicas de producción de diterpenos en hojas de <i>Azorella trifurcata</i> .....	39
3.3.1	Diseño de los oligonucleótidos.....	39
3.3.2	Análisis de expresión génica.....	43
3.4	Clonar e identificar la secuencia de un gen de <i>Azorella trifurcata</i> involucrado en la biosíntesis de diterpenos.....	46
<b>4.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>52</b>
4.1	Establecer el cultivo <i>in vitro</i> líquido de suspensiones celulares provenientes de callos de <i>Azorella trifurcata</i> aplicando los elicitores .....	52
4.2	Evaluar la producción de diterpenos en cultivos líquidos de suspensiones celulares de <i>Azorella trifurcata</i> sometidos a los elicitores mediante análisis de cromatografía en capa fina (TLC).....	53
4.3	Diseñar los oligonucleótidos y analizar la expresión de genes involucrados en vías metabólicas de producción de diterpenos en hojas de <i>Azorella trifurcata</i> .....	56
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>62</b>
<b>6.</b>	<b>PROYECCIONES.....</b>	<b>63</b>
<b>7.</b>	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>65</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Imágenes tomadas a distintas especies del género <i>Azorella</i> .....	4
Figura 2: Estructura del GGPP. ....	8
Figura 3A: Transformación del GGPP a <i>ent</i> -CPP por acción de pirofosfato de <i>ent</i> -copalilo sintasa.....	11
Figura 3B: Transformación de <i>ent</i> -CPP a <i>ent</i> -kaureno por acción de la enzima <i>ent</i> -kaureno sintasa.....	11
Figura 4: Diterpenos comúnmente encontrados en especies del género <i>Azorella</i> .....	12
Figura 5: Hojas de <i>Azorella trifurcata</i> utilizadas para realizar los explantes y las extracciones de ARN...35	
Figura 6: Cultivos de callos de <i>Azorella</i> .....	36
Figura 7: Cultivos de células en suspensión. ....	37
Figura 8: Análisis por cromatografía en capa fina (TLC) de los extractos de cultivos líquidos.....	38
Figura 9A: Alineamiento de secuencias encontradas para <i>ent</i> -kaureno sintasa mostrando la región donde se confeccionó el partidor forward.....	41
Figura 9B: Alineamiento de secuencias encontradas para <i>ent</i> -kaureno sintasa mostrando la región donde se confeccionó el partidor reverse.....	41
Figura 10A: Alineamiento de secuencias encontradas para difosfato de <i>ent</i> -copalilo sintasa mostrando la región donde se confeccionó el partidor forward.....	42
Figura 10B: Alineamiento de secuencias encontradas para difosfato de <i>ent</i> -copalilo sintasa mostrando la región donde se confeccionó el partidor reverse.....	43
Figura 11: ARN de <i>Azorella trifurcata</i> en un gel de agarosa.....	44
Figura 12: PCR utilizando los partidores confeccionados.....	45
Figura 13: Gel de agarosa que muestra el amplificado de 700 pb utilizando los partidores de <i>ent</i> -kaureno sintasa.....	46
Figura 14: Purificación del fragmento amplificado.....	47
Figura 15: PCR de colonias crecidas en medio LB con espectinomicina.....	48
Figura 16: Geles de agarosa conteniendo plásmidos purificados de pCR8/fragmento.....	49
Figura 17: BLAST de las secuencias entregadas por la secuenciación.....	50
Figura 18: Alineamiento entre las secuencias obtenidas y el gen de la subunidad ribosomal 26S de <i>Azorella trifurcata</i> .....	51

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Compuestos con actividad biológica aislados de diferentes especies de <i>Azorella</i> .....	7
Tabla 2: Partidores utilizados en el seminario de título.....	20
Tabla 3: Programas de PCR y RT-PCR.....	29

## LISTA DE ABREVIATURAS

2,4D:	Ácido diclorofenoxiacético
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ARN:	Ácido ribonucleico
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
GGPP:	Pirofosfato de geranilgeranilo
ent-CPP:	Pirofosfato de ent-copalilo
FPP:	Pirofosfato de farnesilo
IPP:	Pirofosfato de isopentenilo
DMAPP:	Pirofosfato de dimetilalilo
RT:	Transcriptasa reversa
DEPC:	Diethylpirocarbonato
pb:	Par de bases
Kb:	Kilobase
MS:	Murashige-Skoog
dNTP:	Desoxinucleótido trifosfato
DNasa:	Desoxi-ribonucleasa
TLC:	Cromatografía en capa fina

## RESUMEN

Las plantas del género *Azorella*, entre ellas *A. compacta* y *A. trifurcata*, han sido investigadas por mucho tiempo debido a sus conocidas cualidades medicinales, las cuales se han estudiado en profundidad y se ha encontrado que están asociadas a la acción de compuestos llamados diterpenos los cuales poseen estructuras orgánicas muy particulares encontradas en este tipo de plantas y que les confieren las cualidades medicinales respectivas. Dentro de los caracteres medicinales que estos diterpenos poseen están sus actividades antihiperlipémicas, combatientes del Alzheimer, antiparasitarias, gastroprotectoras, espermicidas, antibacterianas, antiinflamatorias, entre otras. De aquí se desprende el interés de desarrollar métodos alternativos de producción de este tipo de compuestos desde el punto de vista biotecnológico, ya que estas plantas son especies protegidas y su explotación con fines farmacológicos no puede ser realizada, además de que presentan un crecimiento muy lento como para realizar cultivos de estas al nivel de otras especies de común uso en la agricultura. Dentro de los métodos que se han buscado para realizar la producción de metabolitos secundarios con actividad biológica en plantas del género *Azorella*, recientemente se han desarrollado cultivos líquidos de células en suspensión de *A. compacta*, las cuales se producen básicamente estimulando explantes de la planta en oscuridad con la hormona sintética 2,4D (ácido diclorofenoxiacético) para así generar callos los cuales son puestos luego en medio líquido con la hormona en donde son producidas las células en suspensión. Esta aproximación experimental fue replicada en este seminario de título con células de *Azorella trifurcata*. Adicionalmente, se estimularon las células mediante el uso de elicitores como lo son el ácido jasmónico o el ácido salicílico, los cuales poseen la capacidad de estimular células para producir metabolitos secundarios que están asociados a la defensa de la planta contra estrés abiótico o biótico. De esta



manera se encontró mediante TLC (cromatografía en capa fina) que mediante tratamientos con ácido jasmónico se produjeron compuestos orgánicos de tipo apolar. Por otro lado, como no se conocen las rutas de biosíntesis de diterpenos en plantas de este género, se intentó realizar un análisis de expresión de genes conocidos que generan diterpenos cíclicos en otras plantas relativamente cercanas a *Azorella* confeccionando partidores específicos para los genes *ent-kaureno sintasa* y *pirofosfato de ent-copalilo sintasa* que codifican para enzimas involucradas en la síntesis de diterpenos. Luego de obtener un amplificado de PCR candidato, éste se clonó en bacterias y se envió a secuenciar, el cual fue obtenido utilizando los partidores elaborados para *ent-kaureno sintasa*, en donde se produjo una secuencia de 660 pb la cual, desafortunadamente, correspondió al gen de la subunidad ribosomal 26S de *Azorella trifurcata*.

## ABSTRACT

Plants of the genus *Azorella*, among them *A. compacta* and *A. trifurcata*, have been investigated for a long time because of its known medicinal qualities, which have thoroughly been studied and it has been found that these medicinal qualities are associated to the action of compounds called diterpenes which have very particular organic structures in these plants, structures that give them the respective medicinal qualities. Within these qualities, there are diterpenes with biological activities such like antihyperglycemic, Alzheimer fighters, antiparasitic, gastroprotective, spermicides, anti-bacterial, anti-inflammatory, among others. Because of this, it has been attracted the interest on developing alternative methods of production of these compounds from the point of view of biotechnology, as these plants are protected species and their exploitation for pharmacological purposes cannot be performed, in addition to having a

very slow growth rate compared to other species commonly used in agriculture. Within the methods for the production of biological active secondary metabolites, in plants of the genus *Azorella* recently it has been tried to generate models of liquid cultures of cells in suspension in *A. compacta*, which are produced mainly by stimulating explants of the plant in darkness with the synthetic hormone 2,4D (*dichlorophenoxyacetic acid*) to generate calli which are then placed in liquid medium with the hormone, thus producing the cells in suspension. These experiments were replicated in this thesis with *Azorella trifurcata* cells. Additionally the cells were stimulated using elicitors such as jasmonic acid or salicylic acid, where it has been shown that this elicitors have the ability to stimulate cells to produce secondary metabolites that are associated with plant defense against biotic or abiotic stress. Thus, possible diterpene biosynthesis was studied in liquid cultures which were analyzed by TLC (thin layer chromatography) and it was found that by using jasmonic acid, polar organic compounds were produced. Furthermore, as routes of biosynthesis of diterpenes in plants of this sort are not known, it was attempted expression analysis of known genes that generate cyclic diterpenes in other nearby plants to *Azorella* making specific primers for the genes *ent-kaurene synthase* and *ent-copalyl pyrophosphate synthase*, then it was obtained a candidate DNA fragment amplified by the PCR technique using primers made to the *ent-kaurene synthase* gene, which was cloned into bacteria and sent to sequence. Unfortunately the sequence corresponded to the 26S ribosomal subunit gene of *Azorella trifurcata*.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 El género de plantas *Azorella*.

Las plantas del género *Azorella* están compuestas por 26 especies ubicadas principalmente en el suroeste de Sudamérica y son conocidas coloquialmente como “yaretas” (Martínez y cols., 1993). Son clasificadas como especies de la familia de las *Apiaceae*, en donde también están ubicadas plantas conocidas por la población como lo son la Zanahoria (*Daucus carota*) y el Apio (*Apium graveolens*) (Hill, 1965; Zuloaga y cols., 1999). Además pertenecen al gran grupo de plantas con flores eudicotiledóneas *Asterids*, el cual posee más de 80 mil especies, en donde se ubican 30 órdenes y más de 100 familias de especies vegetales (APGII, 2003). Las plantas del género *Azorella* presentan una morfología muy particular dentro de todas sus especies, esto hace que al verlas estas se aprecien como verdaderos cojines verdes, ya que crecen a ras del suelo y forman verdaderas acumulaciones de tejido vegetal que rodea superficies de tierra o rocas (Arroyo y cols., 2003). En la Figura 1 se observa la estructura general de algunas plantas del género *Azorella*.



**Figura 1: Imágenes tomadas a distintas especies del género *Azorella*. Aquí se puede observar que la forma de cojin es muy notoria en los asentamientos de estos organismos. A) *A. madreporica* (Fotógrafo Anónimo 1); B) *A. trifurcata* (Fotógrafo Anónimo 2); C) *A. compacta* (Fotógrafo Anónimo 3); D) *A. pedunculata* (Fotógrafo Anónimo 4).**

Normalmente este tipo de plantas viven en regiones inhóspitas y de climas extremos, como en: la cordillera de los Andes a grandes alturas en el norte de Chile, sur de Perú, oeste de Bolivia, sectores cordilleranos del Ecuador y noreste de Argentina; también se han encontrado en sectores al extremo sur de Chile (Aysén, Magallanes) y Argentina (Patagonia) y en sectores del centro-sur de Chile hacia la cordillera de los Andes. Además, se han registrado especies de *Azorella* en sectores tan aislados como lo son las islas subantárticas, lo que muestra las grandes adaptaciones a climas extremos que este tipo de plantas han desarrollado a lo largo de millones de años de evolución (Andersson y cols., 2006; Flora Chilena, 2015).

Dentro de lo que las caracteriza desde el punto fisiológico es la capacidad que poseen de vivir bajo suelos con baja cantidad de nutrientes o áridos, también con bastante exposición al sol y a la radiación ultravioleta, además son plantas que generalmente no crecen a la sombra y son de crecimiento lento (Arroyo y cols., 2003; Martínez y cols., 1989). Específicamente en lo que respecta a la especie *Azorella trifurcata*, la cual es tratada más en profundidad en este seminario de título, posee la particularidad de crecer en áreas húmedas, es decir en proximidades de humedales o lagos, y de sobrevivir cuando es tapada completamente por nieve, la cual es una cualidad interesante que comparte con la mayoría de las plantas de este género (Areche y cols., 2009; Flora Chilena, 2015). Esta especie se puede encontrar principalmente en áreas

el centro sur de Chile como el lago Llanquihue (X Región de los Lagos, Chile) o en las inmediaciones del lago Icalma (IX Región de La Araucanía, Chile) (Gardner, 2013). Desde el punto de vista ecológico cabe destacar que la estructura en que se desarrollan estas plantas permite facilitar la vida de otras especies vegetales o animales dentro del cojín que forman almacenando humedad y aumentando la temperatura ambiental dentro de la planta con respecto al aire, así formando un microecosistema muy interesante desde el punto de vista ecológico (Arroyo y cols., 2003). Por otro lado se conocen beneficios o cualidades interesantes que estos organismos vegetales han proporcionado al ser humano. Entre ellos se encuentran principalmente las cualidades medicinales que poseen, las cuales han sido conocidas por muchos años por las poblaciones rurales aledañas a sectores en donde estas plantas crecen y han sido utilizadas como medicinas naturales por mucho tiempo para tratar diversas afecciones ya sea de tipo estomacales, respiratorias, dermatológicas o hiperglicémicas. (Morales y cols., 2003). Además, hace no mucho tiempo en Chile algunas especies de *Azorella* (principalmente *A. compacta*) fueron explotadas de manera severa por las industrias mineras, como también por parte de la población con el fin de producir energía calórica, debido al alto potencial energético que poseen las raíces de estas plantas para producir fuego. Con respecto a esto último se consideró por parte del Estado de Chile la idea de proteger bajo la ley todo tipo de extracción de plantas del género *Azorella* (*Azorella spp.*), de esta manera actualmente es penada por ley cualquier tipo de explotación de las distintas especies de yareta que habitan en territorio chileno (Muñoz y Serra, 2006). Ahora hablando específicamente de las cualidades medicinales que este tipo de plantas poseen, se ha encontrado que principalmente están atribuidas a una gran variedad de diterpenos, los cuales son únicamente encontrados en plantas de la subfamilia *Azorelloideae* en donde se

encuentran diversos géneros de plantas incluyendo *Azorella*, *Mulinum*, *Lateria* y otros géneros de especies emparentadas (APG II, 2003). Los diterpenos que se han encontrado en plantas de la subfamilia *Azorelloideae* son muy particulares dentro del reino vegetal y no se conoce de qué manera específica se sintetizan, por lo tanto solamente se han estudiado las estructuras químicas y las actividades biológicas que estos presentan, los que han sido aislados a partir de extractos orgánicos de diversas especies del género *Azorella* u otros géneros (Areche y cols., 2014). También se han encontrado triterpenos con cualidades medicinales en plantas del género *Azorella* (Areche y cols., 2009). Algunos de los compuestos mencionados anteriormente se nombran y describen en la Tabla 1:

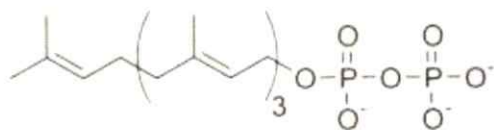
<b>Tabla 1.</b> Compuestos con actividad biológica aislados de diferentes especies de <i>Azorella</i> .	
<b>Compuesto</b>	<b>Actividad</b>
Ácido mulinólico (diterpeno)	Antihiperlipémico (Fuentes y cols., 2005); tricomonocida (Loyola y cols., 2001)
Azorellanol (diterpeno)	Antihiperlipémico (Fuentes y cols., 2005); fuerte actividad tripanocida (Araya y cols., 2003); antiinflamatorio (Borquez y cols., 2007); tricomonocida (Loyola y cols., 2001)
Ácido mulin-11,3-dien-20-oico (diterpeno)	Fuerte actividad tripanocida contra <i>T. cruzi</i> : 99%, actividad tricomonocida (Loyola y cols., 2001); actividad gastroprotectora (Areche y cols., 2014)
Acetato de 20-hidroximulin-11,13-dienilo (diterpeno)	Inhibición del crecimiento de <i>Plasmodium berghei</i> (Loyola y cols., 2004)
Ácido 14-dihidroximulin-11-en-20-oico (diterpeno)	Inhibición del crecimiento de <i>Plasmodium berghei</i> (Loyola y cols., 2004)
Ácido mulínico (diterpeno)	Actividad inhibidora de acetilcolinesterasa (combate el Alzheimer) (Areche y cols., 2009)
13- $\alpha$ -hidroxi-7-oxoazorellano (diterpeno)	Inhibidor de la movilidad de espermatozoides humanos (Morales y cols., 2003), actividad tricomonocida (Loyola y cols., 2001).
13- $\beta$ -hidroxi-azorellano (diterpeno)	Actividad tricomonocida (Loyola y cols., 2001).
Diterpeno de tipo mulinano (nombre no asignado)	Leve actividad gastroprotectora (Salgado y cols., 2014).

Lanost-7-en-3β-ol (triterpeno)	Actividad inhibidora de acetilcolinesterasa (combate el Alzheimer) (Areche y cols., 2009).
Extracto acuoso	Antioxidante (Rojo y cols., 2009)

Como se contempló en la Tabla 1, hay una gran variedad de diterpenos y de actividades biológicas asociadas a estos, encontrados en las diversas especies del género *Azorella*, siendo estos compuestos los más interesantes desde el punto de vista biotecnológico. En la siguiente sección se describen más en profundidad los mecanismos conocidos con respecto su síntesis general, como también se describen ejemplos de estructuras de diterpenos sintetizados en plantas del género *Azorella*.

### 1.2 Diterpenos: estructura, función y biosíntesis.

La biosíntesis de diterpenos es un aspecto del metabolismo primario y secundario de plantas y hongos bastante estudiado en las últimas décadas (Ijoma, 2007). Sin embargo, existen diferencias importantes en los procesos biosintéticos que generan este tipo de compuestos, por lo que es lógico que la variedad de diterpenos y sus estructuras orgánicas sea muy amplia. Sin embargo un aspecto común que todos estos compuestos poseen es que provienen del sustrato común llamado pirofosfato de geranilgeranilo o por sus siglas GGPP (Figura 2; Ijoma, 2007):

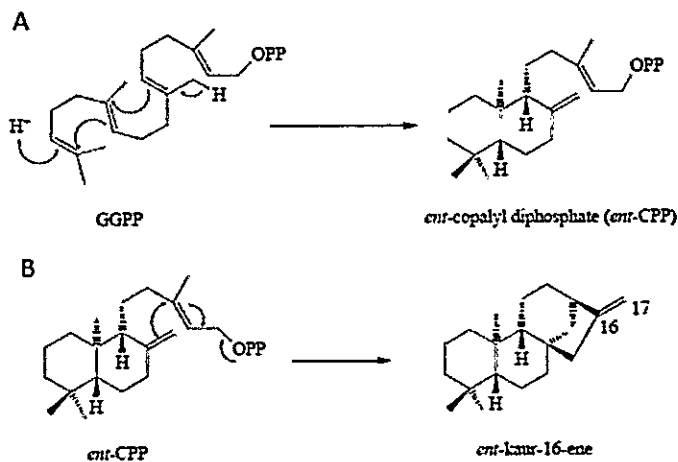


**Figura 2: Estructura del GGPP.** La imagen muestra la presencia de 20 átomos de carbono en la estructura isoprenoide de esta molécula (Ijoma, 2007).

Esta molécula posee veinte átomos de carbono los cuales están de acuerdo con los veinte átomos de carbonos que se presentan en el esqueleto de un diterpeno común. El proceso en el cual se obtiene este sustrato esencial para la síntesis de diterpenos en las células es mediante dos vías metabólicas paralelas presentes en plantas, la vía del mevalonato (MVA) o de la HMG-CoA reductasa que se produce en el citoplasma celular y la vía del no-mevalonato (MEP) o DOXP la cual se realiza en el interior de los plástidos celulares (Ijoma, 2007). Estas dos vías metabólicas producen como productos finales el IPP (pirofosfato de isopentenilo, 5 carbonos) y el DMAPP (pirofosfato de dimetilalilo, 5 carbonos) los cuales son isómeros producidos en la etapa final de las vías anteriormente mencionadas, los cuales reaccionan debido a la acción de la enzima pirofosfato de geranilo sintasa (GPS) formando el compuesto pirofosfato de geranilo (GPP, 10 carbonos) el cual reacciona luego con otra molécula de IPP por la acción de la enzima pirofosfato de farnesilo sintasa (FPS) formando el compuesto pirofosfato de farnesilo (FPP, 15 carbonos), este a su vez es utilizado en el siguiente proceso bioquímico por la enzima pirofosfato de geranylgeranilo sintasa (GGPS), la cual utiliza una nueva molécula de IPP y la molécula de FPP para sintetizar finalmente GGPP (20 carbonos) (Ijoma, 2007; Tata y cols., 2015). Como podemos ver, hay dos compartimientos de la célula en donde se puede producir GGPP, sin embargo lo que se ha visto es que principalmente este producto en el citoplasma sirve para su utilización en la síntesis de sesquiterpenos y triterpenos; y en el caso de su síntesis en los plastidios éste es utilizado principalmente en la síntesis de carotenoides, monoterpenos y diterpenos (Ridley S. y Ridley J., van Klink y cols., 2005). Ahora, entrando directamente en la forma en que el GGPP se cicla de manera de formar los diterpenos, los cuales son principalmente compuestos que en su estructura están conformados por ciclos carbonados, se pueden encontrar estructuras de tres, cuatro y



cinco ciclos (MacMillan y Beale, 1999). Estas estructuras son producidas por la acción conjunta de diferentes enzimas o ciclasas involucradas en la biosíntesis de diterpenos llamadas diterpeno sintasas (diTPS). Existen las diTPS de clase I y II, en donde se ha observado que en primer lugar una diTPS de clase II toma el compuesto GGPP para formar un diterpeno cíclico inicial. El proceso que estas enzimas de clase II catalizan en general está definido por la ciclación dependiente de protonación del GGPP a un compuesto de tipo difosfato bicíclico, lo cual es realizado en la enzima por un motivo funcional tipo DxDD en el extremo N-terminal del dominio  $\gamma\beta$ . En segundo lugar el difosfato bicíclico es utilizado como sustrato por una diTPS de clase I. Estas enzimas poseen motivos DDxxD y NSE/DTE en el dominio  $\alpha$  de la enzima los cuales realizan un clivaje del segmento difosfato del compuesto bicíclico inicial lo que es seguido por varios posibles reordenamientos de la molécula (dependiendo de la especie) que desencadenan en diferentes tipos de estructuras de diterpenos cíclicos. La reacción anterior catalizada por la diTPS de clase I genera el intermediario que será modificado posteriormente por otro tipo de enzimas, lo que le dará la funcionalidad al diterpeno. Las modificaciones posteriores se realizan por enzimas que pueden presentar actividad oxigenasa, metilasa u otro tipo de modificación, las cuales realizan la transformación química de la estructura de anillos y los hacen funcionales desde el punto de vista de las actividades biológicas que los diterpenos en su forma final presenten; las diTPS de clase I también poseen la capacidad de hidroxilar la estructura de anillos proporcionada por una diTPS de clase II (Zerbe y cols., 2014). En la Figura 3 se muestran algunos procesos conocidos de biosíntesis de diterpenos.



**Figura 3: A) Transformación del GGPP a ent-CPP por acción de pirofosfato de ent-copalillo sintasa.** La enzima que cataliza este proceso es una diTSP de clase II. **B) Transformación de ent-CPP a ent-kaureno por acción de la enzima ent-kaureno sintasa.** La enzima que cataliza este proceso es un ejemplo clásico de diTSP de clase I. Se observa que el producto de esta reacción ya no posee el pirofosfato ligado al esqueleto del diterpeno (MacMillan y Beale, 1999).

Como se observa en las figuras 3A y 3B en el caso de la transformación del GGPP a ent-kaureno esta transformación es muy conocida y el ejemplo claro en el que se utilizan dos enzimas, una de clase II en primer lugar (*pirofosfato de ent-copalillo sintasa*) la cual forma ent-CPP el cual es utilizado por la enzima de clase I *ent-kaureno sintasa* para formar ent-kaureno el cual es un intermediario en la síntesis de giberelinas. Sin embargo, la estructura de los diterpenos caracterizados previamente y para los cuales se conocen las enzimas involucradas en su biosíntesis, tienen estructuras muy diferentes a las de los diterpenos que poseen actividad biológica sintetizados en especies del género *Azorella*. Se han encontrado diterpenos semejantes a los aislados de plantas del género *Azorella* en organismos vegetales de tipo briófitas. Dentro de las características de este tipo de compuestos encontrados en

bríofitas se tiene que poseen anillos de cinco miembros y siete miembros al igual que en diterpenos encontrados en *Azorella* (acoplados a un anillo de seis miembros), sin embargo tampoco se han realizado estudios enzimáticos ni genéticos que permitieran conocer qué genes y enzimas están involucradas en su biosíntesis (Asakawa y cols., 2013; Eisenreich y cols., 1999). Ahora, con respecto a los diterpenos que las plantas del género *Azorella* sintetizan se muestran en la Figura 4 ejemplos de cuatro diterpenos comúnmente encontrados en extractos orgánicos de plantas del género *Azorella*, dos de los cuales fueron utilizados como patrones en los estudios cromatográficos (A y B) en este seminario de título:

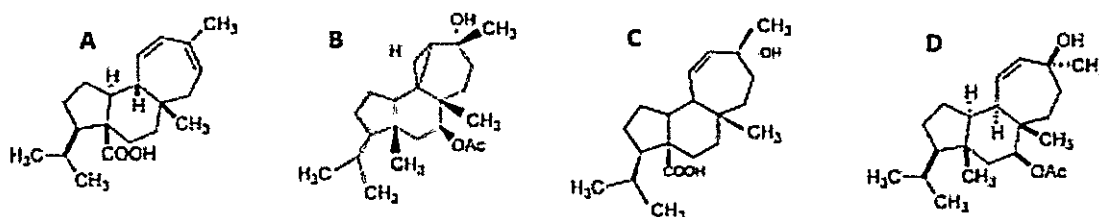


Figura 4: Diterpenos comúnmente encontrados en especies del género *Azorella*. A) ácido mulin-11,3-dien-20-oico, B) azorellanol, C) ácido mulinólico, D) 7- $\alpha$ -acetoxi-9-epi-13 $\beta$ -hidroximulinano (Areche y cols., 2014).

Como se puede notar en las estructuras mostradas, existe en todos los casos un anillo de cinco miembros acoplado a un anillo de seis miembros central, el cual sólo se ha observado en moléculas de diterpenos que se han encontrado en plantas de la subfamilia *Azorelloideae* y briófitas. Particularmente en *Azorelloideae* el anillo de siete miembros está en la mayoría de los casos acoplado al anillo de seis miembros central, lo cual no se ha observado en diterpenos encontrados en briófitas. (Areche y cols., 2014; Asakawa y cols., 2013; Eisenreich y cols., 1999). Finalmente con respecto a la función que este tipo de moléculas poseen no se ha reportado específicamente en qué procesos fisiológicos actúan en el género *Azorella*. Sin embargo, en otras especies no

emparentadas se ha descrito que la producción de diterpenos cíclicos está asociada a la producción de giberelinas, las cuales son hormonas importantes en el desarrollo vegetal; también se puede mencionar la biosíntesis en el cloroplasto del compuesto fitol, que es un diterpeno el cual participa como componente de la clorofila (Iijoma, 2007). También se ha reportado que posiblemente las funciones que entreguen algunos de estos productos del metabolismo secundario tengan que ver con la protección de las plantas contra agentes bióticos externos, lo que se condeciría con los resultados de la actividad de algunos diterpenos encontrados en diversas especies, en donde se ha probado que actúan naturalmente en la planta en contra de bacterias o parásitos, o como repelentes de insectos (Caniard y cols., 2012; de Morales y cols., 2014; Zerbe y cols., 2013). Sin embargo, en muchos casos se cree que la síntesis de estos compuestos no tiene explicación desde el punto de vista fisiológico y que su aparición se produjo en el proceso de evolución de manera azarosa sin un objetivo biológico específico (Dudareva y Gershenzon, 2007).

### **1.3 Estrategias de cultivo *in vitro* de células de especies vegetales que producen metabolitos secundarios de interés farmacológico.**

Actualmente es de gran importancia mundial el descubrimiento de condiciones de cultivo específicas para cada tipo de organismo que permitan la síntesis eficiente de los compuestos del metabolismo secundario que se conoce que son importantes en la industria farmacéutica (Vanisree y cols., 2004). Su importancia deriva de la dificultad de obtener grandes cantidades de compuestos de alta importancia médica directamente desde las plantas que crecen en condiciones nativas, las cuales en general producen muy bajas cantidades de estos metabolitos secundarios y que además, si son



explotadas de manera desmesurada se corre el riesgo de extinguirlas así perdiendo la fuente de estos importantes organismos que generan de manera natural compuestos interesantes para el uso humano (Vanisree y cols., 2004). Está el ejemplo de la producción del diterpeno taxol, el cual es de alta importancia en la lucha contra el cáncer, que en condiciones normales se produce en cantidades que están cerca del 0,001% del peso seco de la planta silvestre (*Taxus brevifolia*) lo cual claramente es una cantidad baja desde el punto de vista biotecnológico (Cragg y cols., 1993). De esta manera se han estudiado por mucho tiempo mecanismos biotecnológicos para mejorar las condiciones de los cultivos de células vegetales. Principalmente, este tipo de cultivos se realizan a partir de células en suspensión generadas por callos puestos en suspensión en medio líquido, el cual puede estar en agitación como también inmóvil lo que dependerá de qué tipo de células o tejido se utilizan en los cultivos (Vanisree y cols., 2004). Puede aplicarse la estimulación de las células vegetales por medio de hormonas como comúnmente se utilizan el 2,4D o NAA las que en algunos casos mejoran las condiciones de cultivo produciendo sustancialmente más cantidades de metabolitos secundarios extraíbles (Sakato y Misawa, 1974; Van Hengal y cols., 1992). Sin embargo, también se ha reportado que la utilización de hormonas de este tipo en algunas especies vegetales solamente disminuye la síntesis de estos metabolitos (Tsay y cols., 1994; Tsay, 1999). También la adición de carbohidratos como la sacarosa la que se utiliza como estimulante para la producción de metabolitos secundarios con interés medicinal en cultivos de células en suspensión (Chen, 1985). Por otro lado un método que también es muy aprovechado en esta área de la biotecnología es la aplicación de elicitores como jasmonato de metilo, ácido jasmónico o ácido salicílico para aumentar la síntesis de este tipo de compuestos en cultivos de diversas especies vegetales, los cuales son mensajeros secundarios que activan

genes de síntesis de compuestos que las plantas naturalmente utilizan para su defensa contra patógenos, estrés abiótico, o como repelentes contra animales herbívoros como insectos u otros (Gadzovska y cols., 2007; Rodas y cols., 2015). También se ha reportado el uso de elicitores biológicos como microorganismos los cuales de alguna manera estimulan ciertos tipos celulares para producir más de sus metabolitos secundarios de interés medicinal (Ciddi y cols., 1995; Strobel y cols., 1992; Yukimune y cols., 1996). Actualmente nuevas estrategias se han desarrollado para mejorar cultivos de células en suspensión como los son las técnicas de transformación celular mediante *Agrobacterium tumefaciens* ya sea de tejidos diferenciados o de tejidos indiferenciados como los son los callos (Choi y cols., 1989). Con estas estrategias se ha logrado mejorar sustancialmente algunos tipos de cultivos, en donde necesariamente se deben conocer las rutas de biosíntesis de los metabolitos en cuestión para sobreexpresar los genes de interés con el objetivo de producir altas cantidades de los compuestos biológicamente activos (Vanisree y cols., 2004). También dentro de las técnicas que emplean como base la biología molecular para mejorar la producción *in vitro* de metabolitos de interés biotecnológico está la expresión heteróloga de genes particulares de organismos que producen compuestos de alto interés medicinal en organismos en donde su cultivo *in vitro* ya ha sido estandarizado eficientemente con el fin de propagar sus células y producir en altas tasas metabolitos secundarios que naturalmente se producen en diferentes especies de plantas. Esta utilización de organismos modelo para sintetizar diterpenos de interés medicinal se ha realizado en células bacterianas de *Escherichia coli* (expresando diterpenos de *Marrubium vulgare*), de *Saccharomyces cerevisiae* (expresando diterpenos de *Salvia sclarea*) o en células vegetales de *Nicotiana benthamiana* (expresando diterpenos de *Artemisia annua*), en donde se ha observado un aumento en la eficiencia de producción de diterpenos con

respecto a los métodos convencionales (Zerbe y cols., 2014; Caniard y cols., 2012; Buckner y Tissier, 2013). Otro punto importante de destacar en cuanto a las tendencias actuales de cultivos de este tipo es la dificultad que se ha observado en cuanto a producir metabolitos secundarios de interés medicinal en tejidos indiferenciados en algunas especies, es decir, no se han encontrado en algunos casos las formas de estimular células indiferenciadas para que produzcan *in vitro* los metabolitos que se desean producir. Es por ello que ha sido necesario realizar los cultivos en los tejidos especializados, lo que dificulta la eficiencia en la producción masiva de compuestos de interés industrial. Como ejemplo está la producción de saponina u otros productos en el Ginseng (*Panax ginseng*), compuestos que sólo se producen en tejido de la raíz, por lo que no ha sido posible prescindir de cultivos *in vitro* de este tejido (Hussain y cols., 2012). Otro caso importante de mencionar son los experimentos realizados con la planta medicinal *Hypericum perforatum* en donde en cultivos de células indiferenciadas en suspensión no se producen los compuestos de interés como las hipericinas e hiperforinas las cuales se sintetizan específicamente en glándulas foliares en la planta silvestre, sin embargo se han generado otro tipo de metabolitos secundarios como los fenilpropanoides y las naptodiantronas (Hussain y cols., 2012; Gadzovska y cols., 2007). Finalmente es importante mencionar experimentos recientes que se han realizado en células indiferenciadas de *Rosmarinus officinalis L.* en donde la aplicación de elicitores bióticos como hongos o abióticos como  $\text{CaCl}_2$  aumentaron la producción de diterpenos de interés medicinal lo que se observó en análisis de cromatografía HPLC (Rashid y cols., 2011).

#### 1.4 Estrategia a utilizar.

En este seminario de título se realizaron cultivos *in vitro* líquidos de células en suspensión de *Azorella trifurcata* obtenidas a partir de callos generados en medios semisólidos con la aplicación de la hormona 2,4D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético). Las suspensiones fueron tratadas con los elicitores ácido jasmónico, salicilato de metilo y ácido salicílico con el fin de observar la posible estimulación de la producción *in vitro* de metabolitos secundarios, específicamente diterpenos de interés medicinal como ácido *mulin-11,13-dien-20-oico*, *13 $\alpha$ -hidroxiazorellano*, *13 $\beta$ -hidroxiazorellano*, ácido *mulinólico*, *azorellanol*, ácido *mulin-11,13-dien-18-acetoxi-16,20-dioico*, entre otros. Por otro lado, otro de los objetivos de este seminario de título fue analizar la expresión de genes que se conoce que participan en la síntesis de diterpenos en especies relativamente emparentadas a *Azorella trifurcata*. Se esperaba evaluar si los genes candidatos seleccionados, *pirofosfato de ent-copalilo sintasa* y *ent-kaureno sintasa*, se encontraban expresados en hojas silvestres de *Azorella trifurcata*. Para ello, se diseñaron partidores basados en secuencias de ARNm de dos genes seleccionados (del clado filogenético *Asterids*, al cual pertenece *Azorella trifurcata*) que así permitieran ver la posible expresión de alguno de estos genes analizando por medio de la técnica de RT-PCR. Para ello se estandarizó la extracción de ARN de hojas de *Azorella trifurcata* para luego purificar y clonar un fragmento amplificado exitosamente con los partidores diseñados, con el fin de reconocer la identidad de la secuencia clonada y asociarlo a algún gen candidato involucrado en la biosíntesis de diterpenos.



## 1.5 Objetivo General

Estandarizar y evaluar la producción de diterpenos de interés medicinal en cultivos *in vitro* líquidos de células en suspensión de *Azorella trifurcata* aplicando los elicitores ácido jasmónico, ácido salicílico y salicilato de metilo, y estudiar la expresión de dos genes involucrados en vías metabólicas de síntesis de diterpenos.

## 1.6 Objetivos Específicos

- Establecer el cultivo *in vitro* líquido de suspensiones celulares provenientes de callos de *Azorella trifurcata* aplicando los elicitores ácido jasmónico, ácido salicílico y salicilato de metilo.
- Evaluar la producción de diterpenos en cultivos líquidos de suspensiones celulares de *Azorella trifurcata* sometidos a los elicitores mediante análisis de cromatografía en capa fina (TLC).
- Diseñar los oligonucleótidos y analizar la expresión de los genes *ent-kaureno sintasa* y *pirofosfato de ent-copalilo sintasa*, involucrados en vías metabólicas de síntesis de diterpenos en hojas de *Azorella trifurcata*.
- Clonar e identificar la secuencia de un gen de *Azorella trifurcata* involucrado en la biosíntesis de diterpenos.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Material biológico.**

Se utilizaron muestras de *Azorella trifurcata* traídas desde Icalma (IX Región de la Araucanía, Chile) las que se trasplantaron a macetas cultivadas en el patio del Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias. Tejido de brotes nuevos se emplearon para el cultivo *in vitro*, y para la extracción de ARN. Por otro lado se usaron células de *Escherichia coli DH5α* quimiocompetentes las cuales se utilizaron para clonar un fragmento de un gen de la planta.

### **2.2 Reactivos.**

Se utilizaron reactivos de calidad apropiada para desarrollar las técnicas de biología molecular requeridas. Estos productos se obtuvieron de empresas y marcas registradas tales como Promega, Invitrogen, Fermentas, Thermo Fisher Scientific, New England BioLabs Inc., Sigma-Aldrich e Integrated DNA Technologies.

### **2.3 Plásmidos**

**pCR8 ® /GW/TOPO ® (Invitrogen):** Vector de clonamiento o vector de entrada de tipo Gateway ® que permite el clonamiento de productos de PCR amplificados con la enzima Taq ADN polimerasa. El clonamiento está mediado por la enzima Topoisomerasa asociada al vector. Luego del clonamiento el gen o secuencia de interés queda flanqueado por los sitios de recombinación attL1 y attL2 que hacen posible la recombinación del gen de interés a un vector de destinación. Además el vector posee dos secuencias M13 forward y reverse las cuales también flanquean al gen o fragmento, las cuales permiten realizar la secuenciación del fragmento o gen ligado a la región intermedia del vector utilizando los partidores específicos para esas

regiones del vector. El vector pCR8 posee un origen de replicación pUC y resistencia a espectinomicina (Thermo Fisher Scientific, 2015).

## 2.4 Partidores

Los partidores empleados en este seminario de título fueron sintetizados en IDT ® DNA Technologies. Los partidores liofilizados fueron resuspendidos en agua nanopura y se mantuvieron a una concentración de 250 µM a -20 °C. Para las reacciones de PCR se utilizaron alícuotas de partidores 10 µM.

**Tabla 2: Partidores utilizados en el seminario de título.** La letra F hace referencia al partidor sentido mientras que la letra R denota al partidor en antisentido.

Gen Objetivo	Partidores	Secuencia (5' → 3')	Tm partidor (°C)	Fragmento esperado (pb)
ent-kaureno sintasa (ent-k)	ent-k:F	TGGGTAGCTATGGTACCTTC	56,7	1000
	ent-k:R	TCACGATGTATGGCTTGGCA	56,8	
pirofosfato de ent-copalilo sintasa (ent-c)	ent-c:F	GGCTGATGGTTCGTGGGG	58,9	500
	ent-c:R	CAGCCGATCAACTGCCCA	58,2	

## 2.5 Obtención y esterilización de explantes de *Azorella trifurcata*.

Para cada procedimiento de esterilización se tomó tejido de *Azorella trifurcata* y se lavó vigorosamente con agua. Luego se cortó cada explante de manera transversal con un bisturí, y se eliminaron las hojas más grandes que salen de la base para sólo dejar los brotes más jóvenes, los cuales se encuentran principalmente al centro de cada explante. Esto se hace cuidadosamente para no dañar los brotes centrales ni el

meristema. Teniendo los explantes listos, se mantuvieron en agua destilada a temperatura ambiente para que no perdieran su humedad hasta realizar el proceso de esterilización. Posteriormente los explantes se esterilizaron usando un procedimiento estandarizado en *A. compacta* (Machacan, 2013), el cual consta de la aplicación de una dilución de hipoclorito de sodio (NaClO, 25 g/L), solución del fungicida (CAPTAN, 20 g/L), y agua destilada estéril. Se introdujeron los explantes en la solución de fungicida (CAPTAN, 20 g/L) durante 15 minutos, luego se eliminó todo el CAPTAN para posteriormente lavar los explantes tres veces con agua destilada estéril (15 minutos cada lavado), luego se eliminó el agua y se mezclaron con hipoclorito de sodio (NaClO, 25 g/L) para ser agitados en el agitador durante 15 minutos y finalmente se les eliminó esta solución para lavarlos dos veces con agua destilada estéril durante 15 minutos cada lavado. Todos los procedimientos en el agitador se realizaron a 150 rpm (esterilización y lavados), y todo los procesos de esterilización y lavado fueron realizados en tubos Falcon de 50 mL, con aproximadamente 30 mL de cada una de las soluciones usadas en este procedimiento (agua estéril, hipoclorito de sodio y CAPTAN).

## **2.6 Cultivo *in vitro* de *Azorella trifurcata*.**

Se hicieron placas de Petri con medio MS semisólido el cual se produjo utilizando como base el medio nutritivo Murashige-Skoog (MS) con vitaminas en una concentración de 2,21 g/L en agua destilada; luego se suplementó con 0,1 g/L de mio-inositol y 30 g/L de sacarosa; posteriormente se ajustó el pH a 5,8 y se agregó agar-agar 10 g/L. Luego se autoclavó a 120 psi durante 25 minutos. En el caso de la producción de MS líquido, la única diferencia fue no agregar agar-agar. Se hicieron placas con medio MS semisólido sin hormonas y también con 2,4D. Las placas suplementadas con 2,4D se prepararon luego de la esterilización del medio. Para ello,

se agregaron 50 µL de esta hormona (stock líquido 1 mg/mL) por cada 50 mL de medio en tubos Falcon de 50 mL, lo que permitió en este caso producir dos placas de Petri (25 mL cada una) con medio MS a una concentración de 1 mg/L de 2,4D. Se realizaron placas además con 0,1 mg/L y 0,5 mg/L de 2,4D. Posteriormente, en condiciones asépticas se tomó cada explante y se cultivaron en las placas Petri conteniendo el medio de cultivo MS semisólido sin hormonas por dos semanas con un fotoperiodo de 16 horas día/8 horas noche, a una intensidad luminosa de 1600 lux. Al pasar las dos semanas los explantes se trasladaron a placas con 2,4D (1mg/L), se dejaron por cuatro semanas en oscuridad hasta la aparición de callos. Cuando aparecían atisbos de hongos en algún explante, con mucho cuidado se removía el medio con el explante contaminado con un bisturí esterilizado en mechero sin flujo laminar. Si los hongos se encontraban esporulando, no se rescató el tejido, por lo que todos los días fue necesario estar observando el estado de los explantes. Las placas con hongos en etapa de esporulación o con más de un explante contaminado se eliminaron. A la quinta semana de cultivo de los callos en medio MS 2,4D (1mg/L), todos los callos en buen estado se trasladaron a placas Petri con medio MS con 2,4D a una concentración de 0,1 mg/L, luego a la sexta semana, los callos se cambiaron de medio a placas con MS con 2,4D a una concentración de 0,5 mg/L. Se dejaron los callos a esta concentración hasta realizar los cultivos líquidos. Todos los cultivos fueron guardados a 19°C basándose en trabajos realizados por Machacan, 2013.

## **2.7 Cultivo de callos de *Azorella trifurcata* en medio líquido con la aplicación de elicitores.**

Con los callos en medios semisólidos (0,5 mg/L de 2,4D) se realizaron cultivos líquidos en medio MS líquido con 2,4D (1 mg/L) en 4 matraces de 250 mL, agregando un volumen final de 50 mL de medio MS c/u, mantenidos en agitación a 150 rpm por

dos semanas (con el fin de aclimatar las células en el medio líquido conteniendo la hormona), a una temperatura de 19°C en oscuridad basado en los experimentos realizados por Machacan, 2013 y Miyasaka y cols.,1985. Los elicitores se agregaron luego de realizar los cultivos de aclimatación por dos semanas haciendo subcultivos de callos en medio líquido como se describe más adelante. Para realizar los subcultivos se centrifugaron las células en suspensión y los callos a 4000 rpm a 4°C, el sobrenadante se recolectó en tubos Falcon de 50 mL para hacer las extracciones orgánicas (indicadas más adelante). Se utilizó salicilato de metilo el cual fue disuelto en etanol dejándolo a una concentración de 0,0178 M en 50 mL. En el caso del ácido salicílico, el compuesto sólido fue disuelto en agua destilada estéril dejando un stock de 0,0178 M en 50 mL y el ácido jasmónico (Sigma-Aldrich) se diluyó en metanol dejando la solución a 50 mg/mL en 2 mL. El ácido jasmónico se ajustó a una concentración 50 µM en los matraces con 50 mL de medio de cultivo basado en Gadzovska y cols., 2006. En el caso de los matraces conteniendo ácido salicílico y salicilato de metilo se dejaron a una concentración final de 200 µM en 50 mL de medio MS líquido basado en Rodas y cols., 2015. Se hicieron experimentos de incubación con los elicitores por una semana (Medio 1: Ácido Jasmónico 50 µM; Medio 2: Ácido Salicílico 200 µM; Medio 3: Salicilato de metilo 200 µM), y dos semanas (Medio 4: Ácido Jasmónico 50 µM; Medio 5: Ácido Salicílico 200 µM; Medio 6: Salicilato de metilo 200 µM). Los controles fueron: una semana sólo con 2,4D (1mg/L) (Medio 7; control sin elicitores una semana) y dos semanas sólo con 2,4D 1 mg/L (Medio 8; control sin elicitores dos semanas). Luego de transcurrido el tiempo en cada caso, se almacenó el medio líquido (esta vez sin centrifugar) en tubos Falcon de 50 mL para realizar las posteriores extracciones orgánicas detalladas más adelante. Cada tubo Falcon de 50

mL con medio líquido proveniente de los cultivos de células en suspensión se almacenó a 4°C hasta realizar posteriormente las respectivas extracciones orgánicas.

## **2.8 Extracción y análisis en TLC (cromatografía en capa fina) de compuestos orgánicos provenientes de los cultivos líquidos de *Azorella trifurcata*.**

En cada una de las muestras obtenidas en el paso anterior se procedió a la extracción de compuestos orgánicos mediante acetato de etilo. Se mezcló un volumen de solvente (acetato de etilo), con un volumen de la muestra (50 mL) y se agitaron suavemente, se recolectó la fase orgánica. Este proceso se realizó tres veces de manera de obtener la mayor cantidad de compuestos provenientes del medio de cultivo. Se recolectó el volumen obtenido el cual se vertió en un balón de destilación de 250 mL y se concentró cada muestra en un rotavapor al vacío. Este procedimiento se realizó con los líquidos recolectados de callos cultivados por dos semanas con 2,4D. Los cultivos líquidos fueron posteriormente tratados por una semana y dos semanas con los mismos elicitores y recolectados. Junto a ello se incluyeron como controles de una y dos semanas con 2,4D aquellos sin tratar con los elicitores. Los extractos fueron analizados en TLC en placas de gel de sílice (adsorbente polar), en una fase móvil de acetato de etilo:éter de petróleo (1:4, v/v) y fueron revelados utilizando ácido sulfúrico.

## **2.9 Extracción de ARN y síntesis de ADNc de hojas de *Azorella trifurcata*.**

### **2.9.1 Extracción de ARN de hojas de *Azorella trifurcata*.**

Se tomó tejido de la planta trasplantada en el patio de la Facultad de Ciencias la misma semana que estas fueron traídas desde Icalma. Rápidamente se llevó suficiente tejido de hojas al laboratorio en una bolsa hermética, y se almacenaron en pequeños sobres de aluminio cuantificando 150 mg de tejido en la pesa digital. Al tener listo cada sobre con muestras éstas se guardaron en nitrógeno líquido de manera de evitar la degradación del ARN, luego se guardaron a -80°C hasta realizar la posterior extracción

de ARN. Al momento de realizar la extracción se sacaron las muestras en nitrógeno líquido y se llevaron a la campana de extracción del laboratorio (debido a que el reactivo de extracción, TRIzol® (Thermo Fisher Scientific), es tóxico) y se molió en un mortero estéril y frío en presencia de nitrógeno líquido. Luego de tener un polvo fino del tejido de hojas, se agregó 1 mL de TRIzol® (Thermo Fisher Scientific) y se mezcló con la muestra molida hasta producir un líquido viscoso homogéneo. Posteriormente, se recolectó todo el líquido en un tubo Eppendorf de 2 mL y se esperó 5 minutos para permitir la completa disociación del complejo nucleoproteico. A continuación se agregaron 200 µL de cloroformo y se agitó el tubo vigorosamente por al menos 15 segundos y se dejó la mezcla a temperatura ambiente por 3 minutos. Luego se centrifugó la mezcla a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. Luego se extrajo cuidadosamente la fase superior en la cual exclusivamente se encuentra el ARN y se guardó en un tubo Eppendorf de 1,5 mL. Posteriormente, se le agregó a la solución recogida 500 µL de isopropanol, se agitó y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Se centrifugó a 12.000 x g a 4 °C por 10 minutos. Enseguida se eliminó el sobrenadante de manera de dejar sólo el precipitado de ARN en el fondo del tubo el cual se lavó con 1 mL de etanol 75%. Se agitó en vortex para luego centrifugarla a 7.500 x g por 5 minutos a 4°C. Finalmente se descartó todo el etanol y se dejó el precipitado de ARN secando por 5 minutos a temperatura ambiente, evitando que se secase completamente. El precipitado de ARN se disolvió en agua nanopura tratada con DEPC (pH 5.0) resuspendiendo el ARN con la pipeta un número considerable de veces para luego ser guardado a -80°C hasta su posterior uso.



### **2.9.1.1 Cuantificación y Análisis de ARN total de hojas de *Azorella trifurcata*.**

Se realizó en primer lugar la medición de concentración y pureza del ARN extraído de la muestra por medio de la utilización del espectrofotómetro NanoDrop® (ND-1000 UV-Vis). En cuanto a la determinación de la presencia de contaminantes en la muestra se analizaron los cocientes de absorción  $A_{260}/A_{280}$  (el cual permite evaluar la contaminación por proteínas en la solución) y  $A_{260}/A_{230}$  (el cual permite evaluar la contaminación por polifenoles y polisacáridos). Para ambos cocientes se considera comúnmente un resultado cercano a 2 lo que determina que la muestra se encuentra pura. Paralelamente para evaluar la integridad del ARN total se realizó una electroforesis en un gel de agarosa 1% (p/v), en donde se cargó 1  $\mu$ g de ARN considerando el dato obtenido de concentración de la muestra en el paso anterior.

### **2.9.2 Síntesis de ADNc de hojas de *Azorella trifurcata*.**

#### **2.9.2.1 Tratamiento de la muestra con DNasa I.**

Las muestras de ARN total obtenidas se trataron con DNasa I antes de realizar el RT-PCR (transcripción reversa), con el fin de eliminar la posible contaminación con ADN genómico. Se trataron 7  $\mu$ g de ARN total con 1  $\mu$ L de DNasa I (Fermentas), 1  $\mu$ L de inhibidor de ARNasa (Fermentas) y 2  $\mu$ L de buffer de DNasa/MgCl<sub>2</sub> 10X (Fermentas). Esto se realizó completando un volumen total de 20  $\mu$ L con agua DEPC. Esta mezcla se incubó a 37°C por 35 minutos en el termociclador. Transcurrido ese tiempo, se transfirió rápidamente a hielo y se agregó 1  $\mu$ L EDTA (50 mM). Luego la muestra se calentó a 65°C por 10 minutos en el termociclador.

#### **2.9.2.2 Síntesis de ADNc por medio de Transcripción Reversa.**

Se utilizó el sistema ImProm-II Reverse Transcription (Promega). Se tomaron 9.5  $\mu$ L de ARN total tratado con DNasa I y se mezclaron en un tubo de PCR (0,2 mL) con 3  $\mu$ L del partidor Oligo-AP (5'TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGCTTCG3'). Luego se

incubó la solución anterior a 70°C por 5 minutos, posteriormente se pausó el programa de RT-PCR en el termociclador para incubar la mezcla en hielo por 5 minutos. En seguida se agregó 11 µL de agua DEPC, 3 µL de la enzima de RT (transcriptasa reversa) ImProm-II, 10 µL de buffer ImProm-II 5X, 1 µL de inhibidor de RNasa (Fermentas), 10 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM) y 2,5 µl de dNTPs (10 mM) así completando un volumen total de 50 µl. Finalmente se colocó el tubo de reacción en el termociclador prosiguiendo el programa de RT-PCR. Con esto se obtuvo 50 µL de ADNc listo para utilizarse, los cuales se guardaron a -20°C hasta su uso.

## **2.10 Elaboración de partidores.**

Se realizó una búsqueda de secuencias de ARNm correspondiente a enzimas conocidas que participan en rutas de biosíntesis de diterpenos en plantas utilizando la base de datos en NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), seleccionando aquellas emparentadas a *Azorella*. Teniendo las secuencias para cada gen, se alinearon respectivamente utilizando la aplicación AlignX del programa Vector NTI Advance ® v.11 en donde se buscaron regiones de amplificado de entre 500 pb a 1 kb. Se procuró que las regiones seleccionadas para elaborar los partidores tuvieran al menos un 90% de homología entre todas las secuencias, de manera de tratar de asegurar mayores posibilidades de unión al ADNc de *Azorella trifurcata*. Las secuencias fueron seleccionadas teniendo en cuenta que la región 3' del partidor poseyera una homología perfecta entre todas las secuencias (al menos 3 nucleótidos) con el fin de que cada partidor poseyera mayor estabilidad en el momento de síntesis de los nucleótidos en el tratamiento con ADN polimerasa. Se procuró no superar la longitud de 18-20 nucleótidos en cada partidor y una T<sub>m</sub> no inferior a los 55°C. Los detalles de esta sección (los genes analizados y detalles del alineamiento) se describen en la sección *Resultados* de este seminario de título.

## **2.11 PCR convencional utilizando ADNc como molde.**

### **2.11.1 PCR con Taq ADN Polimerasa.**

Las reacciones de PCR realizadas en este trabajo se efectuaron en un volumen total de 25  $\mu$ L incluyendo 0,125  $\mu$ L (1U) de OneTaq HotStart ADN polimerasa (New England BioLabs), 5  $\mu$ L del buffer de la OneTaq HotStart ADN polimerasa (New England BioLabs), 0,5  $\mu$ L dNTPs (10 mM), 0,5  $\mu$ L de cada solución de partidor 10  $\mu$ M (en sentido y antisentido) por reacción para el respectivo gen a amplificar y 1  $\mu$ L de ADNc como molde completando hasta un volumen final de 25  $\mu$ L con agua nanopura en tubos de 0,2 mL. Además, se agregó a cada reacción de PCR un control negativo (carente de ADNc) y un control sin RT agregando 1 $\mu$ L (ARN tratado con DNasa I). Este último control permite verificar que los partidores no estén amplificando ADN genómico. No se realizaron controles positivos debido a que los partidores utilizados se utilizaron por primera vez en un molde de ADNc proveniente de esta especie de planta. Los programas utilizados para PCR convencional se muestran en la Tabla 3 mostrada más adelante.

### **2.11.2 PCR con Pfu ADN polimerasa.**

La reacción se realiza con 5  $\mu$ L de buffer 10X que incluye  $MgSO_4$ , 1  $\mu$ L de dNTPs 10 mM, 1  $\mu$ L de cada partidor (sentido y antisentido), 0,25  $\mu$ L de enzima Pfu ADN polimerasa (Thermo Scientific) y 1 $\mu$ L de ADNc, esto en un volumen total de 50  $\mu$ L llenando con agua nanopura. Este protocolo se realizó para tener ADN en geles de agarosa para realizar los cortes en los geles que contuvieran el producto de PCR amplificado por esta enzima en específico con el fin de tener una mayor fidelidad en la síntesis de nucleótidos para luego enviar a secuenciar el fragmento. Los productos de PCR amplificados con esta enzima fueron tratados con OneTaq ADN polimerasa luego de purificarse utilizando el mismo protocolo de reacción que se usa para la reacción

con esta enzima cambiando el stock de dNTPs por dATPs, a la misma concentración, tratando entre 250 a 300 ng de ADN por 30 minutos a 72°C en el termociclador. El protocolo de utilización de Pfu ADN polimerasa es diferente al de OneTaq ADN polimerasa en el termociclador por lo que en la Tabla 3 se describen las diferencias entre los protocolos.

**Tabla 3: Programas de PCR**

**1.- PCR con Taq ADN polimerasa:**

Paso (1-5)	Temperatura (°C)	Tiempo (mm:ss)	Número de ciclos
1) Denaturación inicial	94	05:00	1
2) Denaturación	94	00:40	35 (de paso 2 a 4)
3) Hibridación	Tm-5	00:40	-----
4) Extensión	68	00:50	-----
5) Extensión final	68	10:00	1

**2.- PCR con Pfu ADN polimerasa:**

Paso (1-5)	Temperatura (°C)	Tiempo (mm:ss)	Número de ciclos
1) Denaturación inicial	95	03:00	1
2) Denaturación	95	00:30	35 (de paso 2 a 4)
3) Hibridación	53	00:30	-----
4) Extensión	72	01:00	-----
5) Extensión final	72	15:00	1

\*Aquí se utiliza la hibridación de 53°C ya que se estableció que es la mejor temperatura para hibridar y luego amplificar el fragmento amplificado con los partidores de *ent-kaureno sintasa*.

### 3.- RT-PCR:

Paso (1-4)	Temperatura (°C)	Tiempo (mm:ss)	Número de ciclos
1) Incubación inicial	70	05:00	1
2) Hibridación	25	05:00	1
3) Extensión	42	60:00	1
4) Inactivación	70	15:00	1

#### 2.12 Electroforesis de ácidos nucleicos (ADN y ARN) en geles de agarosa.

Todos los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa de concentración 1,5% (p/v), para observar el ARN se utilizó geles al 1% (p/v). Para los geles que se cortarían de modo de purificar una banda se utilizó una concentración del 1% para mejorar el rendimiento de este proceso. Se utilizó Gene Ruler de 100 pb y 1 Kb como marcador de tamaño de banda en pares de bases (pb) 1Kb (Fermentas). Los geles fueron preparados utilizando buffer TAE 1X (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM, pH 8.0) como disolvente de la agarosa. Al momento de cargar las muestras en el gel estas se mezclaron con buffer de carga (Azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25% y glicerol 80%) en una proporción 1:5 (buffer de carga:muestra de PCR). Posteriormente, se realizó la electroforesis utilizando una diferencia de potencial de 90V durante 55 minutos para ADN y 70V para RNA por 40 minutos. Luego, se tiñó cada gel utilizado durante 15 minutos en una solución de Bromuro de etidio, para posteriormente ser visualizados con un transiluminador UV (GeneGenius Classic de SynGene) y fotografiados utilizando el software GenSnap. Además para cuantificar la concentración de ADN de las muestras (en el proceso de purificación), se utilizó el programa ImageJ el cual permite analizar los geles ya observados a la luz UV y

comparar con el ladder (estándar) para tener un valor aproximado de la cantidad de ADN presente en la muestra purificada.

### **2.13 Purificación y concentración de un producto de PCR de interés.**

El ADN fue purificado desde geles de agarosa 1% utilizando el kit ADN Wizard® (Promega) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Como las concentraciones de producto de PCR al purificar los geles que se purificaron no produjeron concentraciones altas de ADN lo que se realizó fue realizar un proceso de concentrado en SpeedVac®, este sistema trabaja con un sistema de vacío el cual mediante el uso de temperatura elimina el solvente y deja concentrado el ADN (u otro compuesto orgánico) que se quiere utilizar. Se empleó el tercer grado de mayor temperatura que permite la máquina, realizándolo por dos horas hasta dejar el tubo de 1,5 mL con el ADN purificado concentrado para realizar el protocolo de ligación con el vector.

### **2.14 Ligación del fragmento en el vector pCR8 y transformación en células de *Escherichia coli* DH5α.**

El producto de PCR concentrado en el paso anterior fue clonado en el vector pCR8 utilizando el protocolo de clonamiento pCR8/GW/TOPO® TA (Kit de Clonamiento de Invitrogen). Este vector cuenta con una enzima de tipo topoisomerasa unida covalentemente al sitio de clonamiento múltiple que posee la capacidad de ligar las hebras de ADN generadas mediante PCR con el vector. Luego de que la clonación ocurre, la enzima se desliga del vector. En la reacción se utilizaron 100 ng del fragmento purificado, 1 µL de vector (50 ng), 1 µL de solución salina (0,2 M de NaCl y 0,01 M de MgCl<sub>2</sub>) y agua nanopura hasta completar un volumen total de 6 µL. Luego, la reacción se incubó a temperatura ambiente por tres horas para posteriormente transformar células de *E. coli* Dh5α quimiocompetentes. Teniendo las bacterias competentes en hielo, lo que se hizo fue tomar 2 uL de la reacción con el vector y se



adhirieron al tubo de bacterias competentes para luego mezclar convirtiendo el tubo, luego se incubaron 30 minutos en hielo. Posteriormente se realizó el shock térmico de estas células a 42°C por 45 segundos en un baño termostático (sin agitar) e inmediatamente se pusieron en hielo. Se agregaron 500 µL de medio LB líquido (bajo cámara de flujo estéril) y se incubó el tubo una hora a 37°C con agitación. Finalmente las células se plaquearon en medio LB sólido con espectinomicina 100 µg/mL y se incubaron toda la noche a 37°C. Se plaquearon por tubo tres placas con espectinomicina con 50, 100 y 200 µL del cultivo líquido, lo mismo se realizó para otras tres placas con medio LB semi-sólido sin espectinomicina. Además se realizó un control con células quimiocompetentes crecidas en medio LB sin haberles realizado el tratamiento con el vector con el fragmento de PCR purificado. Se identificaron colonias crecidas las cuales se comprobaron si estaban exitosamente transformadas mediante la realización de PCR de colonias. Aquellas colonias positivas para este PCR se crecieron en medio LB líquido en tubos Falcon de 15 mL y se les extrajo ADN plasmidial como se describe en el proceso de Miniprep en las secciones siguientes.

### **2.15 Producción de células de *Escherichia coli* DH5α quimiocompetentes.**

Para obtener células de esta bacteria (DH5α) capaces de ser transformadas por el ingreso del vector pCR8, se realizó el protocolo de producción de células quimiocompetentes. Se creció un preinóculo de células en 5 mL de medio LB líquido durante la noche, luego se tomó 1 mL de este cultivo y se inoculó en 100 mL de medio LB líquido. Las células fueron crecidas hasta densidad óptica a 600 nm ( $DO_{600}$ ) de 0,3. Luego el cultivo fue repartido en dos tubos Falcon de 50 mL previamente enfriados y se centrifugó a 3000 x g por 15 minutos a 4°C para precipitar las células. Se descartó el sobrenadante y en cada tubo las células fueron resuspendidas suavemente en 5 mL de buffer CCMB80 a 4°C (KOAc 10 mM pH 7,0, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 80 mM, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 20

mM ,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  10 mM y glicerol a una concentración final de 10 % v/v, pH 6.4). Posteriormente, se añadió más buffer CCMB80 a cada tubo hasta completar 20 mL y se juntó en un solo tubo el total de células resuspendidas. Posteriormente, se centrifugó a  $3.000 \times g$  por 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron nuevamente las células en 5 mL de buffer CCMB80 frío. Finalmente las células se repartieron en tubos Eppendorf en alícuotas de 100  $\mu\text{L}$  por tubo y se guardaron inmediatamente a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su posterior utilización.

### **2.16 PCR de colonias.**

El protocolo utilizado para el PCR de colonias fue realizado en las mismas condiciones que el PCR convencional con Taq ADN polimerasa descrito más arriba. Las diferencias están en que el procedimiento se realizó en la cámara de flujo en donde se tuvo que abrir las placas de Petri que contenían las colonias positivas (candidatas a poseer el fragmento clonado), y en vez de utilizar ADNc como molde, esta vez se tocaba con una punta de pipeta cada colonia y se suspendían las células en cada tubo de reacción.

### **2.17 Purificación de ADN plasmidial.**

Se realizó el cultivo de diez colonias positivas en tubos Falcon de 15 mL con medio LB líquido por una noche. Lo que se realizó fue tocar cada colonia seleccionada e introducirle la punta que había tocado a la colonia, todo esto en la cámara de flujo, al día siguiente teniendo bacterias crecidas en los medios se realizó el procedimiento Axyprep™ (Axygen) siguiendo el protocolo entregado por el fabricante, con esto se obtuvo cuatro tubos con plásmidos purificados a los cuales se les verificó su concentración y presencia analizando las soluciones por medio de electroforesis en un gel de agarosa.



### **2.18 Digestión enzimática de la construcción *pCR8/fragmento* con EcoRI.**

La construcción *pCR8/fragmento* fue digerida con la enzima EcoRI (Fermentas) para verificar la presencia del fragmento clonado en el vector *pCR8* en análisis en geles de agarosa verificando la banda del tamaño esperado. La reacción contenía 100 ng de ADN plasmidial de los clones positivos por PCR de colonia, 1X de buffer proporcionado para EcoRI, 2.5U de EcoRI y agua nanopura hasta completar un volumen final de 20  $\mu$ L. La mezcla fue incubada por 2 horas a 37°C en el termociclador.

### **2.19 Secuenciación y análisis de las secuencias del producto clonado.**

Plásmidos purificados de tres clones independientes (alícuotas de 80 ng cada una) fueron enviadas a secuenciar a Macrogen Co. (USA), utilizando los partidores del fago M13 (-20, forward) y M13 (-40, reverse) para la construcción *pCR8/fragmento*. Todo esto con el fin de conocer la identidad de la secuencia génica clonada. Luego los resultados fueron recibidos y analizados utilizando el programa BLAST en la página oficial de NCBI.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Establecer el cultivo *in vitro* líquido de suspensiones celulares provenientes de callos de *Azorella trifurcata* en presencia de los elicitores.

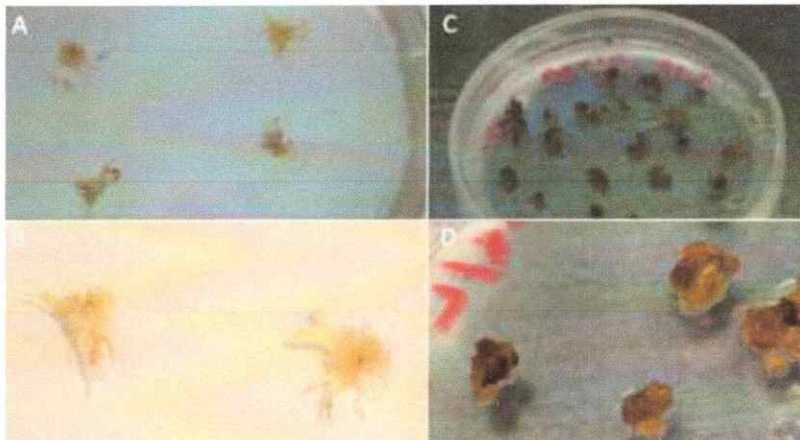
Se realizaron cultivos en medios MS semisólidos utilizando explantes de *Azorella trifurcata* obtenidos diseccionando la parte central de cada brote apical de la planta que fue trasplantada en el patio del Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias. La Figura 5 indica el fenotipo de los brotes utilizados para los experimentos de cultivo *in vitro* y extracción de ARN en este seminario de título:



**Figura 5: Brotes de *Azorella trifurcata* utilizados para cultivo *in vitro* y las extracciones de ARN.** En A y B se observan diferentes perspectivas de diferentes ramas de la planta trasplantada. En el centro marcado con flecha roja se encuentra el meristema central de cada brote, óptimos para realizar los cultivos *in vitro* y la producción de callos. Por otro lado para las extracciones de ARN, todas las hojas, ya sea las más antiguas (flecha blanca) como las más nuevas que provenían del centro fueron tratadas en el protocolo de extracción.

Luego de realizar los cultivos *in vitro* en medio MS semisólido con los explantes tratados de *Azorella trifurcata* se obtuvieron callos en las placas con 2,4D (1mg/L), de manera que fue exitosa la producción de éstos sobre esta especie de *Azorella* utilizando el protocolo probado previamente en *A. compacta* (Machacan, 2013). Tal como se muestra en el trabajo anterior realizado en *A. compacta*, los callos se generaron notoriamente a las cuatro semanas de cultivo en oscuridad a 19°C. La

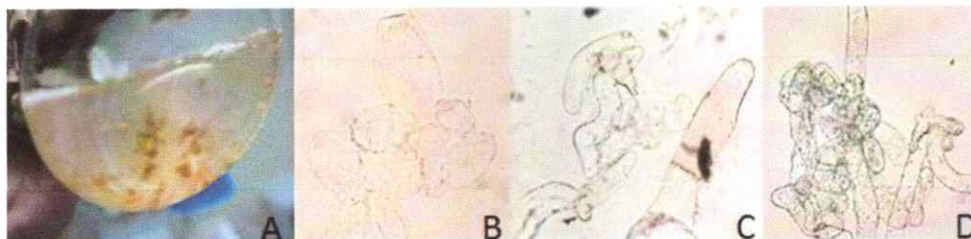
aparición y estructura de los callos en esta especie es muy diferente a la de los obtenidos en *A. compacta*, como se puede ver en la Figura 6 las imágenes, los callos obtenidos son blancos y menos húmedos superficialmente que los vistos en *A. compacta*:



**Figura 6: Cultivos de callos de *Azorella*.** (A) Callos de cuatro semanas en cultivo semisólido de *Azorella trifurcata* (medio MS con 2,4D 1mg/L); (B) Acercamiento de los callos mostrados en A, en donde se puede apreciar mejor su estructura, forma y color; (C) Callos de cinco semanas en cultivo semisólido de *A. compacta* (medio MS con 2,4D 1mg/L) (Machacan, 2013); (D) Acercamiento de los callos mostrados en C, en donde se puede apreciar mejor su estructura, forma y color (Machacan, 2013).

Teniendo los callos generados, estos se utilizaron para la realización de los cultivos líquidos con células en suspensión utilizando los elicitores ácido jasmónico, salicilato de metilo y ácido salicílico (bajo la aplicación de 2,4D 1 mg/L). Como se observa en la Figura 7, las células crecidas de *Azorella trifurcata* en el medio de cultivo bajo la presencia de ácido jasmónico (JA) y 2,4D se dividen exitosamente en las suspensiones celulares, aunque la forma de las células y su agrupación se observa diferente a la de los cultivos realizados sólo con 2,4D utilizando células de *A. compacta* (Machacan, 2013); a su vez estas dos especies de *Azorella* también difieren con

respecto a las células en suspensión vistas en *Arabidopsis thaliana* (Mosciatello y cols., 2013).

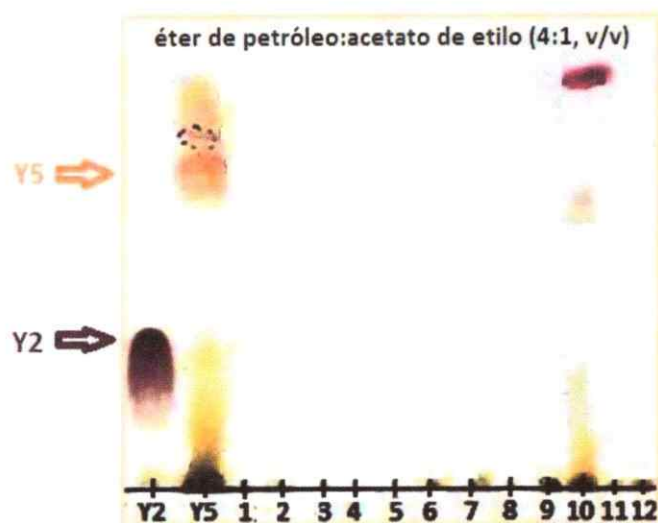


**Figura 7: Cultivos de células en suspensión.** (A) Fotografía de callos en cultivo líquido de *Azorella trifurcata*, (B) Células en suspensión de *Azorella trifurcata* en medio MS con 2,4D (1 mg/L) y ácido jasmónico (50  $\mu$ M) observadas al microscopio óptico, (C) Células en suspensión de *A. compacta* en medio MS con 2,4D (1 mg/L) observadas al microscopio óptico (Machacan, 2013), (D) Células en suspensión de *Arabidopsis thaliana* (Mosciatello y cols., 2013).

### **3.2 Evaluar la producción de diterpenos en cultivos líquidos de suspensiones celulares de *Azorella trifurcata* sometidos a los elicitores mediante análisis de cromatografía en capa fina (TLC).**

Se analizaron los extractos de los cultivos líquidos mediante cromatografía en capa fina (TLC) como se describió en la sección 2.8. En primer lugar se recolectó medio de cultivo con células en suspensión de cuatro réplicas de cultivos que fueron aclimatadas dos semanas en 2,4D (1mg/L) los cuales fueron analizados para observar diferencias o la posible producción de metabolitos secundarios de estas células en las condiciones previas a la aplicación de elicitores. En la Figura 8, del carril 1 al 4 se muestran replicas biológicas de la condición de crecimiento solo con 2,4D por dos semanas y en 5 por una semana con 2,4D donde no se produjeron compuestos orgánicos apolares en al compararlo con los patrones Y2 (*azorellanol*) o Y5 (*ácido mulin-11,13-dien-20-oico*) los cuales son diterpenos que se ha reportado en la literatura que *Azorella trifurcata* sintetiza en estado silvestre. Se observa que en carriles 6, 7, 8 la muestra provenientes

de cultivos con la aplicación de ácido jasmónico 50  $\mu\text{M}$ , ácido salicílico 200  $\mu\text{M}$  y salicilato de metilo 200  $\mu\text{M}$  en tratamientos de una semana en donde tampoco se observan metabolitos secundarios de interés, sino más bien compuestos de mediana o alta polaridad que se quedan estáticos en el desplazamiento de la fase móvil en la parte inferior de la placa cromatográfica. En el carril 10, que corresponde a el extracto tratado con ácido jasmónico 50  $\mu\text{M}$  por dos semanas se observa una gran cantidad de metabolitos de tipo apolar a la altura del diterpeno Y5 Aunque no hay producción de compuestos a la altura de Y2, se observa otro compuesto a una altura superior cerca del final del desplazamiento de la fase móvil. El Rf (cociente entre el desplazamiento del compuesto orgánico y de la fase móvil) para el compuesto de interés en el cultivo de ácido jasmónico 50  $\mu\text{M}$  por dos semanas es de 0,69, mientras que para el diterpeno Y5 el valor de Rf corresponde a 0,73. Dado que ambos Rf debiesen coincidir para asociar los compuestos, sólo se puede decir que poseen polaridad semejante.



**Figura 8:** Análisis por cromatografía en capa fina (TLC) de los extractos de cultivos líquidos. En la imagen se muestran los distintos extractos y también los patrones de diterpenos para realizar la comparación con los extractos de los cultivos, el brillo de la imagen fue ajustado computacionalmente para observar mejor las marcas de compuestos orgánicos en la placa. Y2: azorellanol (patrón), Y5: ácido mulin-

11,13-dien-20-oico (patrón), 1: cultivo líquido proveniente de medio MS y células en suspensión luego de las dos semanas de aclimatación (muestra de callos a la cual no se le aplicaron elicitores); 2, 3 y 4: replica biológica de 1; ; 5: cultivo líquido con una semana en agitación sin la aplicación de elicitor; 6: cultivo de una semana con la aplicación de ácido jasmónico; 7: cultivo de una semana con la aplicación de ácido salicílico; 8: cultivo de una semana con la aplicación de salicilato de metilo; 9: cultivo de dos semanas sin la aplicación de elicitor; 10: cultivo de dos semanas con la aplicación de ácido jasmónico; 11: cultivo de dos semanas con la aplicación de ácido salicílico; 12: cultivo de dos semanas con la aplicación de salicilato de metilo. Todos los cultivos fueron realizados en oscuridad, a 19°C, en 2,4D (1mg/L) y a 150 rpm en el agitador.

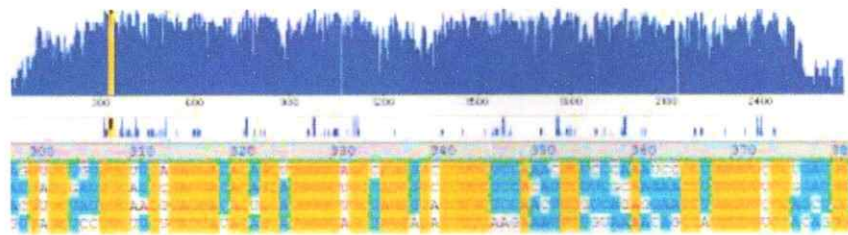
### **3.3 Diseñar los oligonucleótidos y analizar la expresión de los genes *ent-kaureno sintasa* y *pirofosfato de ent-copalilo sintasa* involucrados en vías metabólicas de producción de diterpenos en hojas de *Azorella trifurcata*.**

#### **3.3.1 Diseño de los oligonucleótidos.**

Se realizó la búsqueda de genes conocidos que participan en otras especies de plantas en la producción de diferentes tipos de diterpenos cíclicos, que son específicamente los tipos de diterpenos encontrados en *Azorella trifurcata*. Lo que se encontró en la literatura fue que los genes codificantes para enzimas que sintetizan diterpenos cíclicos son de diversa índole y para diferentes vías de producción de diterpenos. Por lo tanto la búsqueda para realizar los partidores se realizó buscando todos los genes correspondientes a las enzimas *ent-kaureno sintasa*, *pirofosfato de ent-copalilo sintasa*, *casbeno sintasa* y *abietadieno sintasa*; y luego encontrar los ARNm de genes disponibles para especies cercanas al género *Azorella*. Como todas estas enzimas producen diterpenos cíclicos, pero ninguno exactamente con el tipo de anillos encontrados en *Azorella trifurcata* la búsqueda fue realizada "al azar" en este

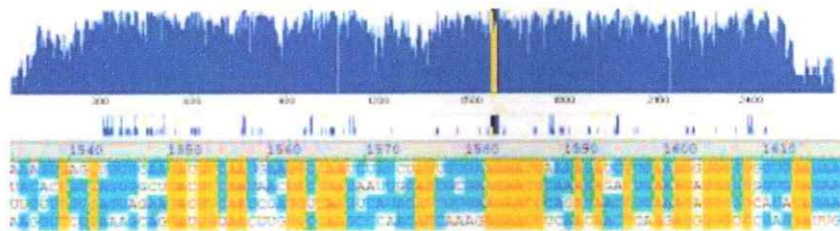
sentido, ya que no existe ningún tipo de referencia con respecto a los pasos de síntesis de diterpenos relacionados a los encontrados en especies del género *Azorella*. Por ello se buscaron en plantas emparentadas logrando ubicar en aquellas del clado filogenético *Asterids* en donde se ubica *Azorella trifurcata*, secuencias de ARNm pertenecientes a los genes de *ent-kaureno sintasa* y pirofosfato de *ent-copalilo sintasa*, genes que codifican para enzimas que participan en la producción de metabolitos intermedios para la síntesis de giberelinas en plantas superiores, las cuales son diterpenos cíclicos. Se encontraron 10 secuencias de ARNm para *pirofosfato de ent-copalilo sintasa* y 4 secuencias para *ent-kaureno sintasa*. Teniendo los archivos de las secuencias de los transcritos de los genes se realizó el alineamiento en el programa AlignX del programa Vector NTI ® Advance, como se explicó en la sección 2.9. El alineamiento mostró regiones de conservación completa, en donde el programa las muestra como regiones amarillas (Figuras 9 y 10). El sistema además entrega regiones celestes las cuales se interpretan como regiones de alta conservación entre las secuencias (Figuras 9 y 10). De esta manera lo que se tomó en cuenta para la confección de los oligonucleótidos fue establecer regiones de amplificación que poseyeran un alto porcentaje de regiones de conservación completa para así asegurar la síntesis de productos de PCR correctos. Como se observa en el alineamiento en las Figuras 9 y 10, se tomaron dos regiones por cada gen que amplificaran alrededor de 1000 pb en el caso de *ent-kaureno sintasa* y en el caso de *pirofosfato de ent-copalilo sintasa* alrededor de 500 pb:

**A) ent-kaureno sintasa forward:**



ATG GTCATGTC TC CAGSACACAGC **AGGGG GCGAAGGG GGGG** ACCAAATGCTGC AAAAGAA CCGGCGTC CCAATGTC

**B) ent-kaureno sintasa reverse:**



ACGCTGGGCGGG AAGA TCCAAAT AA **AGCCAAAGCCAAACAGCGGG** AGAACGCAAGGAACTGAAAAG TGCGGT GGGGASAA

**Figura 9: Alineamiento de secuencias encontradas para ent-kaureno sintasa mostrando la región donde se confeccionó el partidor forward (A) y reverse (B). El alineamiento fue realizado utilizando secuencias pertenecientes a especies pertenecientes a órdenes del clado filogenético Asterids (*Marrubium vulgare*, *Salvia clarea*, *Salvia miltiorrhiza f. alba* y *Plectranthus barbatus*).**

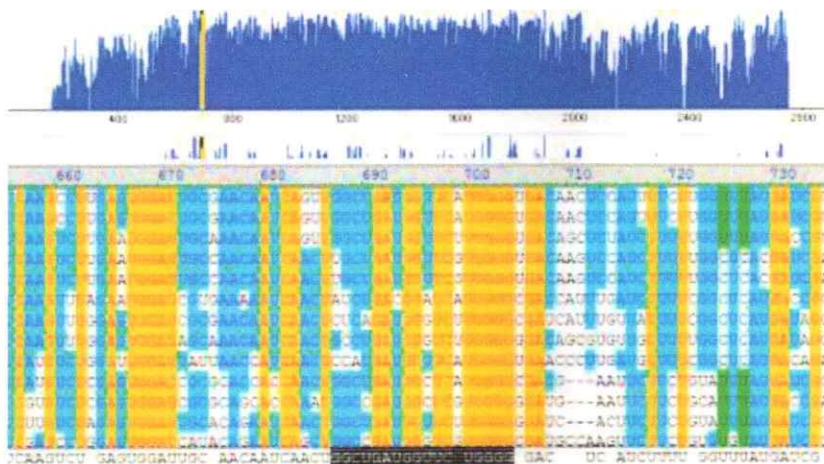
Como se observa en la Figura 9 del alineamiento realizado, las regiones seleccionadas fueron las más adecuadas dado que otras regiones del gen presentaban una menor identidad entre las especies alineadas. Para el diseño y selección de los partidores también se determinó que la Tm no fuese menor a 55°C, en este sentido este partidor genera una Tm de 56,7°C para el partidor forward y de Tm de 56,8°C para



el partidore reverse, calculado mediante la herramienta proporcionada por la página web oficial de Integrated DNA Technologies Inc.

En este caso como se observa en la Figura 10, también como en los anteriores partidores se procuró obtener la región 3' con una conservación completa entre las secuencias lo que se observa en amarillo en el alineamiento. Además, se realizó un reemplazo en la región que no presentaba conservación, la base número 13, reemplazando el espacio por la base G. Las Tm específicas se encuentra en la sección 2.4 de este seminario de título y aunque se observa en los partidores reverse una menor identidad entre las especies alineadas y comparadas, como primera aproximación se diseñaron directamente los oligos consenso en espera de tener éxito. Si ello no resultase satisfactorio, se diseñarían oligos degenerados.

**A) difosfato de ent-copalilo sintasa forward:**



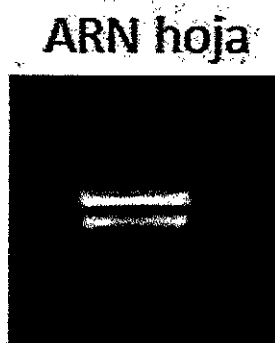
### B) difosfato de ent-copalilo sintasa reverse:



**Figura 10:** Alineamiento de secuencias encontradas para *difosfato de ent-copalilo sintasa* mostrando la región donde se confeccionó el partidor forward (A) y reverse (B). El alineamiento fue realizado utilizando secuencias pertenecientes a especies provenientes de órdenes del clado filogenético *Asterids* (*Andrographis paniculata*, *Helianthus annuus*, *Scoparia dulcis*, *Lactuca sativa*, *Nicotiana silvestris*, *Rosmarinus officinalis*, *Solanum lycopersicum*, *Salvia clarea*, *Salvia miltiorrhiza f. alba*, *Salvia miltiorrhiza*, *Stevia ovata* y *Stevia rebaudiana*).

### 3.3.2 Análisis de expresión génica.

En primer lugar se realizó la extracción de ARN en la cual se demostró una integridad óptima del ARN para realizar el proceso de producción de ADNc analizando los valores descritos en la sección 2.9.1.1 utilizando el equipo Nanodrop. Además, se comprobó la integridad del ARN mediante electroforesis en gel de agarosa, cargando 1 µg de ARN (Figura 11):



**Figura 11:** ARN de *Azorella trifurcata* en un gel de agarosa. Se cargó 1 µg de ARN en el gel para realizar la electroforesis. Se observan las dos bandas características correspondientes a las subunidades ribosomales de las células vegetales al observar a la luz ultravioleta el ARN proveniente de las hojas de esta planta.

Posteriormente, se realizó la síntesis de ADNc utilizando la muestra de ARN de hojas de *Azorella trifurcata* a la cual se le realizó el tratamiento con DNasa I y se comprobó si se realizaba la síntesis de posibles productos de PCR en el ARN tratado con DNasa I (control) como también al ADNc obtenido. En estos experimentos se utilizaron los partidores anteriormente mencionados confeccionados para los genes en reacciones de PCR convencional. Primero se probaron temperaturas de annealing de 51°C para las reacciones conteniendo los partidores de *ent-kaureno sintasa* y en el caso de los partidores de *pirofosfato de ent-copalilo sintasa* a 52°C, debido a que la Tm de estos últimos partidores es levemente más elevada. El protocolo de PCR utilizado se describe en la sección 2.11. En la Figura 12 se pueden observar los resultados de la amplificación utilizando como molde ADNc proveniente de ARN de la planta, ARN tratado con DNasa I (control negativo que comprueba que el tratamiento con DNasa I eliminó todo el posible ADN genómico habido en la muestra) y agua (control negativo de la reacción):

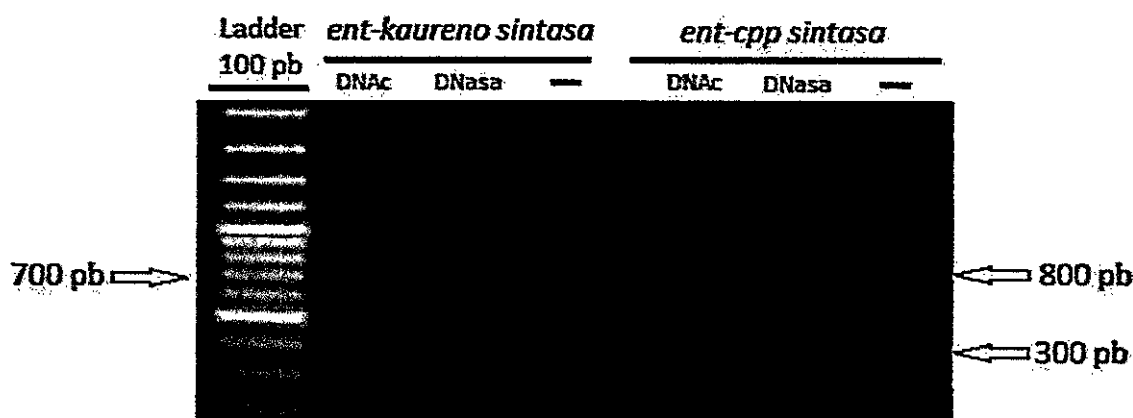
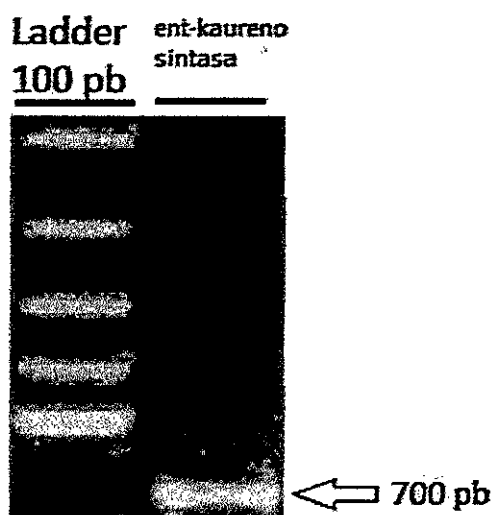


Figura 12: Amplificación de un fragmento de la región codificante de *ent-kaureno* y *pirofosfato de ent-copalilo sintasa* de *Azorella trifurcata*. Se realizaron reacciones de amplificación donde *ADNc* corresponde al ADNc de *Azorella trifurcata* como molde para la reacción, *DNasa*: se utilizó como molde ARN tratado con DNasa I y (-) corresponde al control negativo en donde no hubo molde para la reacción de PCR.

Como se observa en la Figura 12, hay un fragmento de amplificación para *ent-kaureno sintasa* de alrededor de 700 pb de tamaño, y en el caso de los partidores de *pirofosfato de ent-copalilo sintasa* se produjeron dos fragmentos poco nítidos a la altura de los 300 pb y 800 pb. Se intentó mejorar las reacciones con diferentes temperaturas de annealing (48°, 50°C y 54°) para estos partidores, sin embargo no se observó ningún aumento en la nitidez de estos, por lo que la temperatura que estos partidores amplificaron mejor fue a la de 52°C. En cuanto al fragmento de 700 pb utilizando los partidores de *ent-kaureno sintasa* se comprobó que la síntesis de producto de PCR se realizó mejor a los 53°C de temperatura de annealing como se observa en la Figura 13:



**Figura 13:** Gel de agarosa que muestra el amplificado de 700 pb utilizando los partidores de *ent-kaureno sintasa*. Amplificación de PCR utilizando ADNc, en las mismas condiciones anteriores, sólo difiriendo en que el annealing se realizó a 53°C.

### **3.4 Clonar e identificar la secuencia de un gen de *Azorella trifurcata* involucrado en la biosíntesis de diterpenos.**

Fue de interés conocer la secuencia del fragmento de 700 pb producido utilizando los partidores confeccionados para el gen de *ent-kaureno sintasa* y así evaluar si realmente se logró estudiar la expresión de un gen involucrado en la síntesis de diterpenos en *A. trifurcata*. Para esto se realizó la purificación del fragmento amplificado, de manera de obtener en la solución el producto de PCR sin los característicos oligómeros de partidores que quedan en la parte inferior de los geles. Además, la síntesis del producto de PCR esta vez, se realizó con Pfu ADN polimerasa la cual es una enzima que posee una alta fidelidad en la síntesis de ADN y así obtener una secuencia lo más fidedigna posible al compararla en la base de datos de secuencias en NCBI. En la Figura 14 se observa el fragmento purificado con el protocolo Wizard ® sintetizado con Pfu ADN polimerasa:

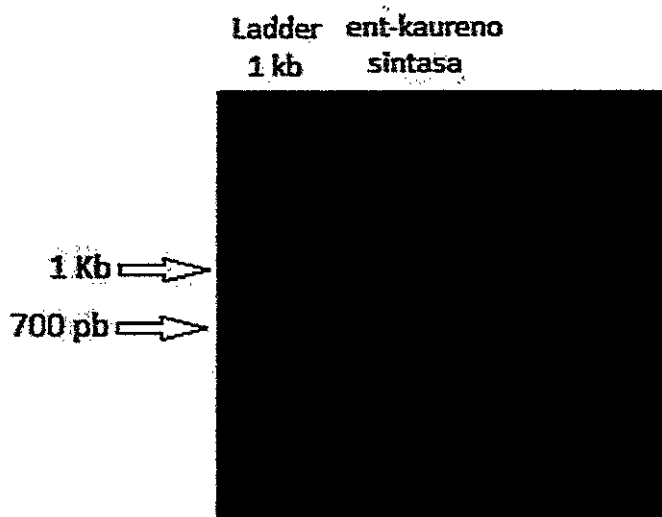
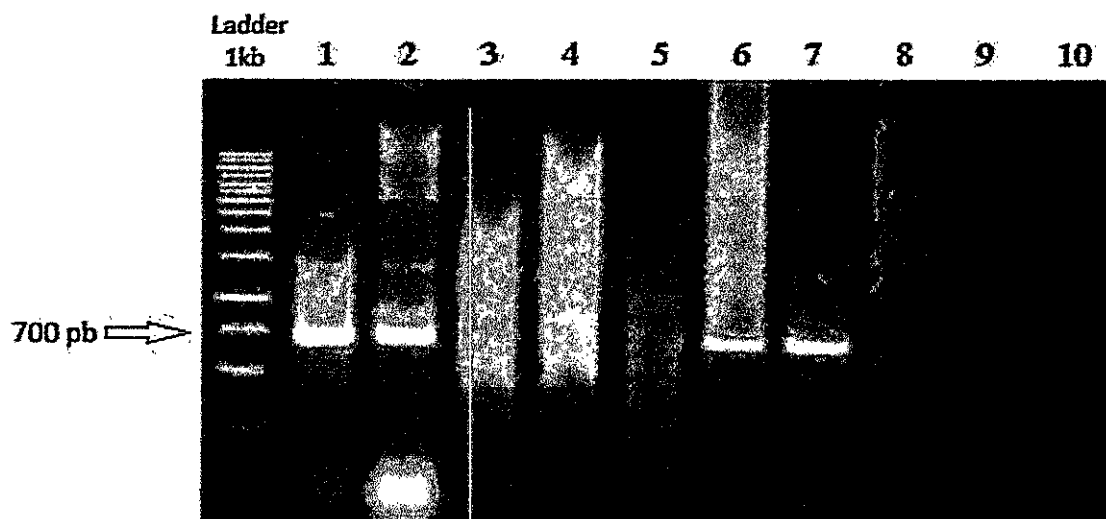


Figura 14: Purificación del fragmento de *ent-kaureno sintasa* amplificado. Se observa en el gel que el fragmento de 700 pb se encuentra íntegro después de la purificación con el protocolo de columnas Wizard.

Luego de obtener la solución con el fragmento purificado se procedió a concentrar la muestra en el sistema SpeedVac para realizar la ligación del vector pCR8 con el fragmento de 700 pb, posteriormente se realizó la transformación de las bacterias quimiocompetentes con la mezcla de ligación que contenía el vector y el fragmento de 700 pb, después de un día se observó el crecimiento de colonias positivas en medios LB semisólidos conteniendo espectinomicina como factor de selección. Para comprobar si las colonias contenían dentro del vector el fragmento incógnito se realizó PCR de colonias, por lo que se seleccionaron 10 colonias de las placas que contenían crecimiento de estas y se observó que en 4 de las 10 seleccionadas hubo amplificación del fragmento de 700 pb utilizando los partidores de *ent-kaureno sintasa*, como se observa Figura 15:



**Figura 15: PCR de colonias transformadas con pcr8/fragmento *ent-kaureno sintasa*.** Diez colonias de *E. coli* crecidas en especinomicina fueron seleccionadas y el fragmento de 700 pb se amplificó mediante PCR de colonias. Se produjeron cuatro resultados positivos conteniendo el fragmento de 700 pb dentro del vector contenido en las bacterias quimiocompetentes transformadas.

Como se observa en la Figura 15 las reacciones realizadas con las colonias 1, 2, 6 y 7 produjeron el fragmento característico de 700 pb entre otros de mayor tamaño. Posteriormente, se realizó la purificación del plásmido pCR8/fragmento mediante el protocolo de Miniprep (descrito en la sección 2.16.) de las colonias 1, 2, 6 y 7

La Figura 16A muestra en un gel de agarosa la purificación plasmidial de las cuatro colonias. Se observan tres bandas características, la más fuerte (2800 pb) que se presenta en la parte inferior, una intermedia y otra que se presenta en la parte superior del gel, el tamaño correspondiente al vector pCR8 es de 2817 pb. La Figura 16B muestra la digestión de los plásmidos purificados con la enzima de restricción EcoRI para observar la liberación del fragmento de 700 pb:

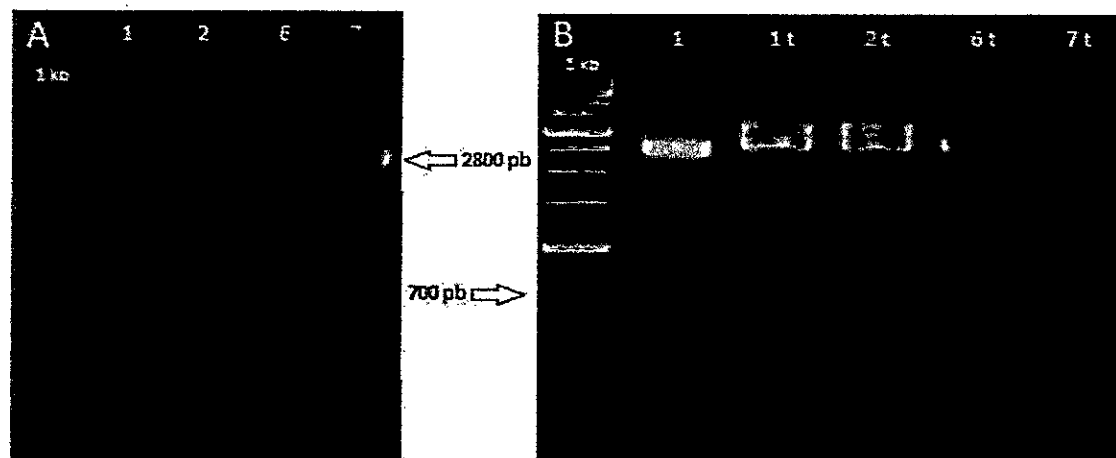


Figura 16: Geles de agarosa conteniendo plásmidos purificados de pCR8/fragmento *ent-kaureno sintasa*. A) Se cargaron las cuatro muestras (1, 2, 6 y 7) de plásmidos purificados; B) Se cargó la muestra 1 de plásmido no tratado con EcoRI (1), y las cuatro muestras de plásmidos purificados tratados con EcoRI (1t, 2t, 6t y 7t), el ladder corresponde a 1 kb.

Se observan dos bandas de gran intensidad entre los 500 y 600 pb y el de 700 pb que se aprecia muy tenue. Con lo anterior se prosiguió a enviar a secuenciar tres plásmidos en soluciones de 80 ng de cada uno (1, 2 y 6). Así se obtuvieron secuencias correspondientes al fragmento ubicado en el sector de inserción del vector pCR8 entre las dos regiones que se ubican secuencias de reconocimiento por EcoRI, además de las secuencias en donde hibridan los partidores M13 (sentido) y M13 (antisentido). Los resultados en los tres packs de reacciones de secuenciación arrojaron la identidad de la secuencia amplificada la cual al ser puesta en el sistema BLAST de NCBI, generó los siguientes resultados:

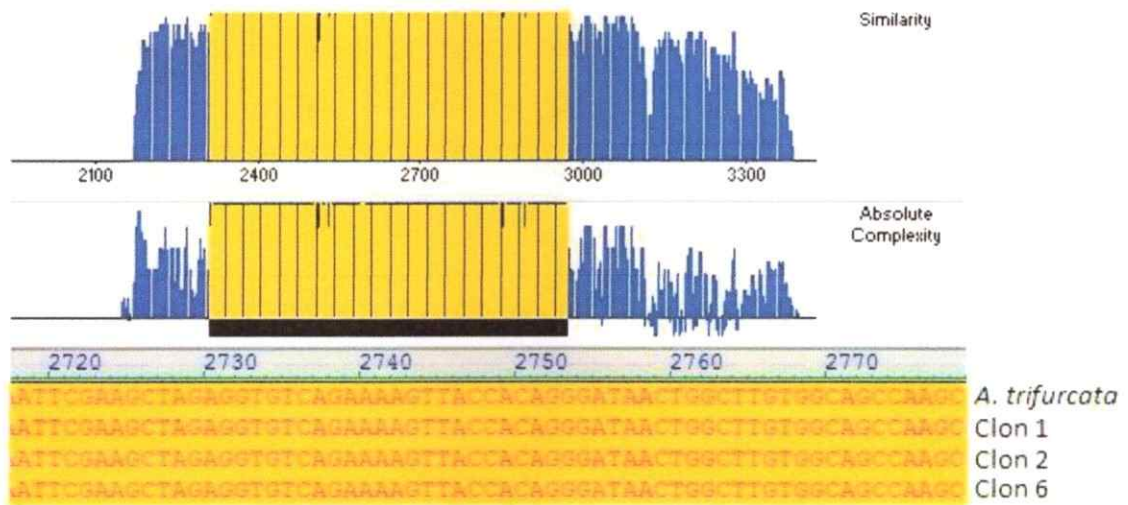


Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
<a href="#">Azorella trifurcata 26S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1214	1214	56%	0.0	99%
<a href="#">Azorella lycopodioides 26S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1212	1212	56%	0.0	99%
<a href="#">Mulinum sp. Hufford s.n. 26S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1206	1206	56%	0.0	99%
<a href="#">Huanaca acaulis 26S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1197	1197	56%	0.0	99%
<a href="#">Azorella trifoliolata 26S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1190	1190	56%	0.0	99%
<a href="#">Dickinsia hydrocotyloides 26S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1177	1177	56%	0.0	99%
<a href="#">Azorella selago 26S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1171	1171	56%	0.0	99%
<a href="#">Spananthe paniculata 26S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1166	1166	56%	0.0	98%
<a href="#">Conium maculatum voucher Aust 166 26S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1164	1164	56%	0.0	98%
<a href="#">Polyscias quilfoylei 26S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1164	1164	56%	0.0	98%
<a href="#">Meryta sinclairii 26S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1164	1164	56%	0.0	98%

**Figura 17: Alineamiento *in silico* de las secuencias entregadas por la secuenciación.** Al realizar un alineamiento usando el algoritmo BLASTn de NCBI se observó un 99% de identidad de los clones 1, 2, y 6 con un fragmento del gen ribosomal 26S de *Azorella trifurcata*, entre otros de la misma subfamilia.

Como se observa en los resultados entregados por BLASTn, la secuencia con el mayor puntaje de identidad corresponde al gen de la *subunidad ribosomal 26S* correspondiente a *Azorella trifurcata* y no arroja ningún resultado correspondiente a genes relacionados con la síntesis de diterpenos. Es interesante destacar que en su mayoría, todos los resultados del alineamiento corresponden al mismo gen de diferentes plantas de la subfamilia *Azorelloideae*.

Con respecto al tamaño del fragmento clonado y secuenciado se comprueba que posee exactamente 660 pb, y las tres secuencias obtenidas presentan un 100% de identidad nucleotídica (Figura 18):



**Figura 18: Alineamiento entre las secuencias obtenidas de los tres clones y el gen de la subunidad ribosomal 26S de *Azorella trifurcata*.** Se alinearon en el programa AlignX las tres secuencias obtenidas de los clones 1, 2 y 6 y la secuencia que entrega el mejor puntaje del alineamiento, es decir el gen de la subunidad ribosomal 26S de *Azorella trifurcata* (3260 pb).

Como se observa en el alineamiento, sólo se amplificó una parte del gen, y mediante este proceso, al alinear las tres secuencias obtenidas de la secuenciación, con el gen al cuál pertenecería el fragmento clonado, se observa que las tres secuencias coinciden con 660 pb en un 99,8% con la secuencia del gen completo conocida, ubicada en la base de datos de NCBI. Con esto se demuestra que la secuencia a la cual pertenecía la banda de 700 pb es del gen de la subunidad ribosomal 26S de *Azorella trifurcata* y no con el gen *ent-kaureno sintasa*, posiblemente por inespecificidad de los partidores diseñados.

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1 Establecer el cultivo *in vitro* líquido de suspensiones celulares provenientes de callos de *Azorella trifurcata* en presencia de elicitores.

Como se observó anteriormente, la formación de callos en explantes de *A. trifurcata* se realizó de forma exitosa utilizando el protocolo de estimulación por 2,4D (1 mg/L) en oscuridad el cual fue previamente estandarizado para *A. compacta* de manera exitosa (Machacan, 2013). Sin embargo, se observó que la estructura de los callos de la especie tratada aquí difieren de gran manera con los callos obtenidos por Machacan en 2013, de hecho fue posible observar en los callos obtenidos para *Azorella trifurcata* que se produjo nula coloración del tejido a las cuatro semanas luego de cultivo en 2,4D (1mg/L), este presentándose blanco en su totalidad, a diferencia de los callos obtenidos en *A. compacta* los cuales su coloración fue café (Machacan, 2013). Esto puede deberse a la falta de luz al realizar los cultivos en oscuridad, lo que propiciaría que el tejido perdiera coloración verde característica de las hojas. Sin embargo, el hecho de que en *A. compacta* se hayan obtenido callos con coloración café a pesar de haber sido estos crecidos bajo la ausencia de luz, indicaría que existen otras características que le confieren diferente composición química a los callos de ambas *Azorella*. Con respecto al uso de 2,4D para la generación de callos, es conocido que como auxina esta hormona sintética es la más efectiva produciendo tejido indiferenciado en forma de callo, en donde se ha comprobado que estimula procesos de síntesis de ADN, la cual a su vez aumenta el grado de división celular y además genera un cambio completo en el metabolismo celular, lo cual causa en definitiva una rápida multiplicación de las células sometidas a esta hormona lo que se observa directamente en la formación de callos, produciendo células indiferenciadas (Addae y cols., 2014; Yajima y cols., 1979). El uso de esta hormona para la inducción de la

proliferación celular fue iniciada en base al uso en *Daucus carota* (especie de la familia *Apiaceae*, al igual que *A. trifurcata*) para inducir embriogénesis somática y suspensiones celulares (Chen y Punja, 2002). Las células en cultivo líquido se pueden aprovechar en procesos biotecnológicos de producción de metabolitos secundarios que son normalmente producidos por las plantas en sus estados silvestres (Vanisree y cols., 2004).

#### **4.2 Evaluar la producción de diterpenos en cultivos líquidos de suspensiones celulares de *Azorella trifurcata* sometidos a los elicitores y su análisis mediante cromatografía en capa fina (TLC).**

Como es sabido actualmente, los elicitores aplicados, ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA), son utilizados en especies vegetales de interés productivo para la producción *in vitro* de metabolitos secundarios dependientes de la vía de activación de genes de respuesta a estrés biótico o abiótico por parte de las células vegetales (Gadzovska y cols., 2007; Rodas y cols., 2015). Se estableció la utilización de ácido salicílico en los experimentos realizados en cultivos líquidos de células en suspensión producidas a partir de callos a una concentración de 200  $\mu\text{M}$  basándose en trabajos efectuados en células de *Capsicum chinense*, en donde a esta concentración del elicitador se producían los mejores resultados para efectuar la producción de la enzima *fosfolipasa D* (Rodas y cols., 2015). Esto es importante analizarlo debido a que la vía de activación de la síntesis de los fosfolípidos juega un rol importante en la defensa de las plantas contra agentes estresantes bióticos o abióticos (Rodas y cols., 2015). Por lo tanto se pensó que la utilización del elicitador ácido salicílico podría estimular células indiferenciadas de *Azorella* para la producción de metabolitos secundarios como se ha reportado en otras plantas que producen compuestos orgánicos con actividad biológica (Rodas y cols., 2015; Zerbe y cols., 2013). Por otro lado, el salicilato de metilo es

considerado como la fitohormona inactiva ya que se forma por metilación del ácido correspondiente que es el elicitor y en caso de estrés las plantas liberan el compuesto activo para actuar como segundo mensajero. Por esta característica el éster fue usado como control negativo en este trabajo y utilizado a la misma concentración que el ácido salicílico (Seskar y cols., 1998). Ahora refiriéndonos específicamente al ácido jasmónico el cual se utilizó en este trabajo a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  al igual que en experimentos en células en suspensión de *Hypericum perforatum* L. (Gadzovska y cols., 2007), se demostró en ese organismo que activa sistemas de síntesis de metabolitos secundarios en células indiferenciadas, en donde se estimularon las vías metabólicas de síntesis de *naptodiantronas* y *fenilpropanoides*, así relacionando a este elicitor con la respuesta a estrés por parte de las células vegetales, específicamente jugando un rol en su defensa contra herbívoros y patógenos (Gadzovska y cols., 2007). Lo que se observa particularmente en este caso es que el ácido jasmónico estimula la rápida actividad transciente de enzimas encargadas de la síntesis de compuestos del metabolismo secundario (Gadzovska y cols., 2007). Por lo tanto la utilización de ácido jasmónico en células de *Azorella* fue una aproximación interesante debido a la conocida acción de este elicitor en estimular la producción de compuestos que juegan un rol en la defensa natural de la planta contra herbívoros o patógenos en donde en la mayoría de los casos este tipo de metabolitos tienen importancia médica al igual que algunos de los metabolitos secundarios encontrados en *Azorella* como los son los diterpenos. Cabe pensar que la posible función que los diterpenos que las plantas del género *Azorella* producen tengan que ver con las especiales cualidades fisiológicas que estas plantas poseen al vivir constantemente en territorios complicados ambientalmente, ya sea a altas o bajas temperaturas o la fuerte exposición al sol que generalmente presentan, en este sentido suena interesante pensar que los diterpenos

que estas plantas producen quizás les confieren capacidades protectoras contra estos ambientes tan hostiles, lo que debiese demostrarse en futuras investigaciones.

Por otro lado, en ninguno de los cultivos en donde se utilizó ácido salicílico se produjo de manera notoria o cuantificable algún compuesto apolar o terpenoide. No obstante se apreció en la TLC una mancha de Rf semejante a un compuesto de interés encontrado en *Azorella trifurcata* silvestre, Y5 o ácido mulin-11,13-dien-20-oic el extracto cultivado 2 semanas con ácido jasmónico 50  $\mu\text{M}$ , lo que podría sugerir que esta molécula podría ser un buen elicitador para la producción de terpenos u otros compuestos apolares interesantes en células indiferenciadas de *A. trifurcata*. Sin embargo, no se pudo demostrar la correspondencia entre el patrón Y5 y el producto incógnito, debido a problemas técnicos en la cromatografía en fase reversa lo que hubiera proporcionado la capacidad de asociar las masas moleculares del patrón y los compuestos incógnitos. Debido a esto se hace necesario realizar experimentos futuros utilizando ácido jasmónico como elicitador para producir más cantidad de los compuestos orgánicos producidos en este cultivo y luego comprobar la identidad de estos, ya que uno de los problemas principales fue el bajo rendimiento de los compuestos apolares obtenidos, sobretodo del que está a la altura del diterpeno Y5 los análisis por TLC de los cultivos líquidos. Por otro lado, a una semana de cultivo con ácido jasmónico 50  $\mu\text{M}$  no se produjeron compuestos de tipo apolar, sólo los de polaridad alta (que se observó que no avanzaron con la fase móvil). Las razones no son simples de establecer, sin embargo una posible explicación es que la síntesis de los compuestos apolares vistos en la cromatografía requiere para su producción la generación de enzimas en un tiempo más largo en las células en suspensión las cuales tardarían más en llegar a



producir cantidades considerables de metabolitos secundarios apolares como se observó en la cromatografía.

#### **4.3 Diseñar los oligonucleótidos y analizar la expresión de genes *ent-kaureno sintasa* y *pirofosfato de ent-copalilo sintasa* involucrados en vías metabólicas de producción de diterpenos en hojas de *Azorella trifurcata*.**

La selección de los genes *ent-kaureno sintasa* y *pirofosfato de ent-copalilo sintasa* se realizó principalmente por la abundante información disponible en NCBI con respecto a secuencias de ARNm que existían para estos dos genes en otras plantas del clado *Asterids*, aun sin saber si estos estarían involucrados en la síntesis de los diterpenos de interés farmacológico encontrados en *A. trifurcata*. Lo anterior aún no es posible descartar debido a la falta de conocimiento en la ruta de biosíntesis de los diterpenos en plantas del género *Azorella*. Con respecto a los partidores confeccionados para amplificar fragmentos de los genes *ent-kaureno sintasa* y *pirofosfato de ent-copalilo sintasa*, estos se llevaron a cabo mediante el alineamiento de secuencias de genes de especies emparentadas con *Azorella trifurcata* del grupo *Asterids*, ya que no existe información con respecto a genes que estén involucrados en la biosíntesis de diterpenos dentro del género *Azorella*. El diseño se basó en seleccionar regiones con el mayor porcentaje de identidad. Ello fue más difícil de lograr con los partidores, en el caso de los de *ent-kaureno sintasa* en donde un 80% del partidor reverse mantenía el consenso y en el caso del partidor forward sólo un 38% (aquí nos referimos a regiones amarillas, de conservación completa, no parcial), aunque guardaban una alto % de GC en el 3' en ambas regiones para la confección de los partidores. Por otro lado en la confección de los partidores para *pirofosfato de ent-copalilo sintasa* también se procuró que en el partidor reverse y forward hubiese un alto porcentaje de consenso en la región 3', sin embargo el consenso sólo se mantuvo en

un 72% en el partidior forward y en el reverse un 44% con respecto a la totalidad de los nucleótidos, lo que claramente influyó en la inespecificidad de los partidiores elaborados. Se observó que el mejor amplificado de los experimentos de PCR fue el que se producía utilizando los partidiores para el gen *ent-kaureno sintasa*, observando un fragmento de 700 pb, aunque se esperaba un fragmento de alrededor de 1kb. Por otro lado se observaron dos fragmentos, uno de 800 y otro de 300 pb, poco nítidos utilizando los partidiores de *pirofosfato de ent-copalilo sintasa* los cuales se descartaron para realizar la clonación y secuenciación ya que además, se esperaba amplificar un fragmento de alrededor de 500 pb según la información del alineamiento de secuencias obtenidas provenientes de especies del clado *Asterids*.

Los partidiores de *ent-kaureno sintasa*, si bien amplificaron un fragmento nítido y específico (Figura 12), este no correspondió al gen *ent-kaureno sintasa* luego de analizar su secuencia mediante BLASTn en la base de datos de plantas. Los resultados de la secuenciación en las tres clones purificados enviados a secuenciar generaron resultados que no se esperaban, ya que la secuencia correspondía a un tamaño de 660 pb y su identidad al gen de la *subunidad ribosomal 26S* de *Azorella trifurcata*, lo que son resultados que no permiten afirmar que los partidiores confeccionados funcionaron con respecto al objetivo de este seminario de título. Probablemente las secuencias tomadas desde el alineamiento para confeccionar los dos partidiores de *ent-kaureno sintasa*, coincidieron muy fuertemente con una secuencia del gen al cual se le atribuyen los resultados de la secuenciación, lo que de manera muy improbable generó un amplificado correspondiente a este gen no esperado. Dentro de las posibles razones de estos resultados se encuentra el hecho de que en el alineamiento se encontraron varias regiones celestes las que indican que



las secuencias no poseían conservación completa, lo que claramente disminuyó la probabilidad de que los partidores fuesen altamente específicos para los genes estudiados. Otro hecho importante de analizar fue el tratamiento de los plásmidos con EcoRI para los 4 clones obtenidos (1, 2, 6 y 7), en donde además de la banda de 660 pb se produjeron tres bandas más de tamaños menores a 600 pb, lo que se contempló en la Figura 16B, las cuales a priori se sabía que no podían aparecer debido a que como se purificó sólo un fragmento de 700 pb, no podían haber otros fragmentos que se ligaran dentro del vector. Con respecto a este hecho se realizó un análisis *in silico* con la secuencia de 660 pb obtenida de la secuenciación (correspondiente al gen de la subunidad ribosomal 26S de *A. trifurcata*) y se encontró que la secuencia posee dos sitios de reconocimiento por la enzima de restricción EcoRI (en las posiciones de corte 404 y 527 de la secuencia), lo que apoyaría fuertemente el hecho de que se hayan producido diversas bandas en el gel al tratar los plásmidos purificados con la enzima. Para mejorar este tipo de experimentos se debieran enviar a sintetizar partidores degenerados y establecer condiciones de PCR más estrictas que las realizadas en este seminario de título para obtener fragmentos correspondientes realmente a genes que estén involucrados en la síntesis de diterpenos en *A. trifurcata* u otras plantas del género.

Actualmente se han descubierto aspectos interesantes en la biosíntesis de diterpenos en otras especies del clado *Asterids* como *Marrubium vulgare*, en donde se han estudiado recientemente las posibles rutas de síntesis de diterpenos (Zerbe y cols., 2014). Específicamente se han identificado genes de clase I y II, correspondientes a *diterpeno sintasas* (diTPS) involucradas en la síntesis de diterpenos específicos con actividad biológica, las cuales se ha demostrado que en diferentes combinaciones al

ser expresadas en microorganismos modelo generan diterpenos con cualidades medicinales encontrados en esta especie (Zerbe y cols., 2014). Estos nuevos descubrimientos en plantas del clado *Asterids* podrían ayudar a que también genes emparentados con los encontrados en estos organismos puedan ser descubiertos en el género *Azorella* los cuales también puedan tener un papel importante en la síntesis de diterpenos con interés medicinal que se han descubierto en *Azorella trifurcata* u otras especies del género. Se ha encontrado que las rutas biosintéticas posibles para la producción de diterpenos a partir del pirofosfato de geranilgeranilo (GGPP) son múltiples y actualmente existe cierta claridad con respecto a que a partir de la utilización del GGPP como sustrato por parte de la enzima *pirofosfato de ent-copalilo sintasa* la cual sintetiza *ent-CPP* y sólo se deriva a la producción por medio de la enzima *ent-kaureno sintasa* a *ent-kaureno* el cual principalmente deriva a la síntesis de giberelinas y no de diterpenos con actividad biológica, esto específicamente en *Marrubium vulgare*, lo que se ha demostrado por medio de técnicas de complementación génica en donde se observó que no cabía la posibilidad de que esta ruta produjera también diterpenos de interés medicinal (Zerbe y cols., 2014). De todas maneras es posible pensar que en especies del género *Azorella* existan diferentes líneas de síntesis que también puedan permitir ramificaciones en la vía de síntesis de diterpenos: *GGPP* → *pirofosfato de ent-copalilo* → *ent-kaureno*, la cual podría poseer un papel en la formación de diterpenos con interés medicinal lo cual al menos dentro del género *Azorella*, ni en especies muy cercanas a ellas, como lo son las plantas de la familia de las *Apiaceae*, no se ha estudiado directamente como en *Marrubium vulgare* u otras especies del clado *Asterids* en donde ya se tiene conocimiento acabado de la ruta de biosíntesis de los diterpenos con interés medicinal encontrados en este tipo de organismos. Sin embargo en otras especies correspondientes al género *Stevia* se ha

demostrado que la vía del *ent-kaureno* no sólo deriva a la producción de giberelinas, sino que también en la producción de otros metabolitos secundarios con características únicas como el steviol el cual se ha reportado que puede servir ya sea como precursor de algunas giberelinas o como metabolito secundario de la planta el cual posee actividad repelente contra insectos (Richman y cols., 1999). De lo anterior se desprende la necesidad de elaborar investigaciones que permitan conocer al transcriptoma de plantas del género *Azorella*, con el fin de realizar posteriormente experimentos parecidos a los realizados en *Marrubium vulgare* en donde se ha dilucidado de gran manera la vía de producción de algunos diterpenos de interés medicinal en este organismo. Estos diterpenos, poseen actividades semejantes a los encontrados en plantas del género *Azorella* como lo son la actividad antihiper glucémica correspondiente al *azorellanol* y al *ácido mulinólico* presentes en *Azorella trifurcata*, sin embargo la estructura de los diterpenos con cualidades medicinales encontrados en *Marrubium vulgare* no se asemeja del todo a la de los diterpenos con actividad biológica encontrados en plantas del género *Azorella*, por lo que es muy posible que los diterpenos tan característicos encontrados en la subfamilia *Azorelloideae* se produzcan por la acción de enzimas desconocidas presentes en este tipo de plantas (Zerbe y cols., 2014). Analizando lo anterior, caben tres posibilidades, primero: que existan modificaciones de las enzimas que generan los diterpenos de interés medicinal en *Marrubium vulgare* que se encuentren también en plantas del género *Azorella* las cuales realicen la síntesis de manera diferente provocando los anillos característicos encontrados sólo en plantas del género *Azorella*, la segunda posibilidad es que existan más bifurcaciones que involucren a rutas descartadas actualmente en la síntesis de diterpenos de interés medicinal que involucren los genes de *ent-kaureno sintasa* y *pirofosfato de ent-copalilo sintasa* o semejantes específicos del género *Azorella*, lo cual

por ahora no se ha demostrado y la tercera posibilidad, que es probablemente la más factible, es que existan enzimas únicas involucradas en la síntesis de los anillos tan característicos que se encuentran en los diterpenos aislados de especies del género *Azorella*, es decir diterpenos principalmente con anillos de tipo *mulinano* y *azollenano*. De este modo como proyección a futuros trabajos realizados con plantas del género *Azorella* se postula la posibilidad de analizar secuencias de genes de especies emparentadas que se puedan encontrar presentes en la base de datos correspondientes a los genes: *milliradieno sintasa*, *kaureno sintasa*, *pirofosfato de copalilo sintasa* u otros, las cuales podrían derivar a la síntesis de diterpenos con interés medicinal como se demostró en *Marrubium vulgare*. Los autores expresaron de manera heteróloga en microorganismos diferentes combinaciones de estos genes produciendo diterpenos de interés medicinal normalmente sintetizados en *Marrubium vulgare*, lo que fue una aproximación experimental muy interesante realizada por este grupo de investigación (Zerbe y cols., 2014). Lo anterior también se puede realizar en plantas del género *Azorella* para dilucidar las vías que generan diterpenos de interés medicinal, en este caso estudiando en un futuro las secuencias génicas y enzimas producidas en plantas del género *Azorella*. Dentro de las alternativas mencionadas, la que más podría generar resultados favorables para encontrar genes que estén involucrados en la biosíntesis de los diterpenos que se han encontrado en plantas de la subfamilia *Azorelloideae* es la idea de realizar transcriptómica, técnica que ha sido utilizada en otras especies que también producen diterpenos con interés medicinal en donde ha permitido conocer los genes involucrados en la biosíntesis de estos compuestos, lo que ha permitido posteriormente dilucidar los pasos específicos de síntesis de diterpenos con interés medicinal y las modificaciones que estos presentan para poseer sus actividades biológicas correspondientes (Zerbe y cols., 2014).

## 5. CONCLUSIONES

La realización del protocolo de esterilización y cultivo de explantes utilizado previamente a este seminario de título en *A. compacta* resultó ser exitoso en *Azorella trifurcata* para generar callos y células indiferenciadas en suspensión de este organismo.

El compuesto orgánico ácido jasmónico es un posible elicitor de la síntesis de metabolitos secundarios en cultivos líquidos que posean células indiferenciadas en suspensión de *Azorella trifurcata* bajo la estimulación por la auxina 2,4D.

El fragmento de ADNc clonado y secuenciado utilizando partidores para el gen *entkaureno sintasa* pertenecía al gen de la *subunidad ribosomal 26S* de *Azorella trifurcata*, así estos partidores no se pudieron utilizar para realizar los análisis de expresión génica con respecto al gen mencionado ni ninguno que tuviera que ver con la biosíntesis de diterpenos.

## 6. PROYECCIONES

Se necesita realizar estudios más precisos al analizar los genes que tengan que ver con el metabolismo de diterpenos con actividad biológica en plantas del género *Azorella* utilizando técnicas moleculares más avanzadas, como transcriptómica, la cual podría dar información específica con respecto a transcritos de genes, para así realizar experimentos guiados a las secuencias propias de la especie estudiada y no depender de alineamientos de secuencias génicas provenientes de especies no tan cercanas a *Azorella trifurcata* en el árbol filogenético, como se realizó en este seminario de título. Con la información existente en NCBI se podrían estudiar otras rutas de biosíntesis alternativas existentes que no se estudiaron en este seminario de título (específicamente algunos genes de diTSP de clase I y II) que estén involucrados en la síntesis de diterpenos con cualidades medicinales en donde se conozca a fondo su ruta de biosíntesis.

Con miras a futuras investigaciones con el organismo *Azorella trifurcata* u otros del género, específicamente desde el punto de vista biotecnológico se debiesen proyectar más estudios que analicen la capacidad del compuesto ácido jasmónico a actuar como un elicitador eficiente para producir uno o más diterpenos de interés medicinal que sean capaces de ser sintetizados por este tipo de plantas, o de usar otras condiciones que generen estrés en la planta como exceso de luz, temperaturas bajas, etc. Además, como se discutió anteriormente, existen alternativas modernas que han permitido en plantas del clado *Asterids* dilucidar específicamente los pasos del metabolismo secundario que generan la biosíntesis de diterpenos con actividad biológica. De esta manera sería interesante realizar experimentos que involucren técnicas moleculares

que permitan entender qué enzimas y genes específicos generan los tan característicos anillos diterpénicos encontrados en plantas del género *Azorella*. Todo esto con proyecciones futuras de poder llevar a la producción farmacológica o a gran escala los diterpenos encontrados en plantas del género *Azorella*, los cuales se podrían en un futuro comercializar como medicinas naturales en el mercado mundial de productos naturales.

## 7. REFERENCIAS

**APG II (2003)**, An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants, The Angiosperm Phylogeny Group, Botanical Journal of the Linnean Society, V. 141, No. 4, pp. 399-436.

**Addae F, Arkorful E, Tengey TK (2014)**, The effect of 2,4-D on callus induction using leaf lobe of sweet potato as a source of explant, International Journal of Agronomy and Agricultural Research (IJAAR), Vol. 5, No. 1, pp. 16-22.

**Andersson L. (2006)**, Relationships of the Genus *Azorella* (Apiaceae) and Other Hydrocotyloids Inferred from Sequence Variation in Three Plastid Markers, Taxon, Vol. 55, No. 2, pp. 270-280.

**Araya J, Neira I, da Silva S, Mortara R, Manque P, Cordero E, Sagua H, Loyola A, Bórquez J, Morales G & J González (2003)**, Diterpenoids from *A. compacta* (Umbelliferae) active on *Trypanosoma cruzi*. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 98(3):413-418.

**Areche C., Cejas P., Thomas P. y San-Martín A. (2009)**, Triterpenoids from *Azorella trifurcata* (Gaertn.) Pers and their effect against the enzyme acetylcholinesterase, Quim. Nova, Vol. 32, No. 8, 2023-2025.

**Areche C., Sepulveda B., San Martín A., García-Beltrán O., Simirgiotis M. y Cañete A. (2014)**, An unusual mulinane diterpenoid from the Chilean plant *Azorella trifurcata* (Gaertn) Pers, Org. Biomol. Chem., 12, 6406.

**Arroyo M. T. K., Cavieres L. A., Peñaloza A. y Arroyo-Kalin M.A. (2003)**, Positive Associations between the Cushion Plant *Azorella monantha* (Apiaceae) and Alpine Plant Species in the Chilean Patagonian Andes, Plant Ecology, Vol. 169, No. 1, pp. 121-129.



**Asakawa Y, Ludwiczuk A, Hashimoto T (2013)**, Cytotoxic and Antiviral Compounds from Bryophytes and Inedible Fungi, *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*, 2013, Vol 7, No 2, 73-85.

**Borquez J, Loyola L, Morales G, San Martin A, Roldan R, Marquez N & E Muñoz (2007)**, Azorellane Diterpenoids from *Laretia acaulis* inhibit Nuclear Factor-kappa B Activity. *Phytotherapy Research* 21:1082-1086.

**Brückner y Tissier (2013)**, High-level diterpene production by transient expression in *Nicotiana benthamiana*, *Plant Methods* 9:46.

**Caniard A., Zerbe P., Legrand S., Cohade A., Valot N., Magnard J., Bohlmann J. y Legendre L. (2012)**, Discovery and functional characterization of two diterpene synthases for sclareol biosynthesis in *Salvia sclarea* (L.) and their relevance for perfume manufacture. *BMC Plant Biology* 12:119.

**Chen, A.H. (1985)**, Study on application of diosgenin-I. Analysis of diosgenin constituent of plants from Taiwan. *Science Monthly* 43: 79-85.

**Chen W. P., Punja Z. K. (2002)**, Transgenic herbicide- and disease-tolerant carrot (*Daucus carota* L.) plants obtained through *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Reports*, 20, 929-935.

**Choi, K.T., D.C. Yang, y J.C. Park. (1989)** Characterization of cell line of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Mayer) transformed by *Agrobacterium tumefaciens*. In S. Lyams, and G. Takeda (eds.), Proc. Of the 6th Internatl. Congr. of Sabrao, Tokyo, pp. 519-522.

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

**de Moraes J, de Oliveira RN, Costa JP, Junior ALG, de Sousa DP (2014)**, Phytol, a Diterpene Alcohol from Chlorophyll, as a Drug against Neglected Tropical Disease Schistosomiasis Mansoni. PLoS Negl Trop Dis 8(1): e2617

**Eisenreich W, Rieder C, Grammer C, Hebler G, Adam K, Becker H, Arigoni D y Bacher A (1999)**, Biosynthesis of a Neo-epi-verrucosane Diterpene in the Liverwort *Fossombronia alaskana*: A Retrobiosynthetic NMR Study, J. Biol. Chem. 1999, 274:36312-36320.

**Flora Chilena (2015)**, *Azorella trifoliolata*, Ficha de la especie, dirección web: <http://www.florachilena.cl/especies.php?id=478> (visitado el 08/12/2015)

**Fotógrafo Anónimo 1**, dirección web:

<http://s014.radikal.ru/i326/1109/79/4e2971acf150.jpg> (visitado el 08/12/2015)

**Fotógrafo Anónimo 2**, dirección web:

[http://www.alpinegardensociety.net/image\\_files/onlineshow/sizedAzorella%20trifurcata13804.jpg](http://www.alpinegardensociety.net/image_files/onlineshow/sizedAzorella%20trifurcata13804.jpg) (visitado el 08/12/2015)

**Fotógrafo Anónimo 3**, dirección web:

[http://f.share.photo.xuite.net/feng588699/1f702f7/17145734/1097454449\\_l.jpg](http://f.share.photo.xuite.net/feng588699/1f702f7/17145734/1097454449_l.jpg) (visitado el 08/12/2015)

**Fotógrafo Anónimo 4**, dirección web:

<https://www.flickr.com/photos/andreaskay/6921309421/in/photostream/lightbox/> (visitado el 08/12/2015)

**Fuentes N, Sagua H, Morales G, Borquez J, San Martin A, Soto J & L Loyola (2005)**, Experimental Antihyperglycemic Effect of Diterpenoids of *Llaretia A. compacta* (Umbelliferae) Phil in Rats. Phytotherapy Research 19:713-716.

**Ijoma G. (2007)**, Isoprenoids/Terpenes (Secondary Metabolites): Biosynthesis and commercial applications, A Term Paper for Microbial Biochemistry Department of

Biotechnology, Faculty of Applied and Computer Sciences, Vaal University of Technology.

**Gadzovska S, Maury S, Delaunay A, Spasenoski M, Joseph C y Hagege D (2007),** Jasmonic acid elicitation of *Hypericum perforatum* L. cell suspensions and effects on the production of phenylpropanoids and naphthodianthrones, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Volume 89, Issue 1, pp. 1-13.

**Gardner C. (2013),** Southern Chile: Volcanoes & Monkey Puzzles "A Greentours Tour Report".

**Gershenzon J y Dudareva N (2007),** The function of terpene natural products in the natural world (review), *Nature Chemical Biology*, V. 3 No. 7.

**Hanahan D. (1983),** Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids, *J. Mol. Biol.* 166, 557-580

**Hill, A. F. (1965),** Botánica Económica, plantas útiles y productos vegetales. Ed. Omega. 1-616.

**Hussain MS, Fareed S, Ansari S, Rahman M, Ahmad IZ, M Saeed (2012),** Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *J Pharm Bioall Sci*; 4:10-20.

**Loyola L, Bórquez J, Morales G, Araya J, González J, Neira I, Sagua H & A San-Martín (2001),** Diterpenoids from *Azorella yareta* and their trichomonocidal activities. *Phytochemistry* 56(2):177-180.

**MacMillan, J., y Beale, M. (1999),** Diterpene biosynthesis. In: *Comprehensive Natural Products Chemistry: Isoprenoids Including Steroids and Carotenoids*, Vol. 2. pp. 217–243. Cane, D.E., Ed., Pergamon, Oxford.

**Machacan D. (2013)**, Cultivo *in vitro* de *A. compacta*, Informe de Unidad de Investigación, Laboratorio de Biología Molecular Vegetal/Laboratorio de Productos Naturales, Universidad de Chile.

**Martínez S. (1989)**, El género *Azorella* (Apiaceae-Hydrocotyloideae) en la Argentina, *Darwiniana*, T. 29, No. 1/4 (1989), pp. 139-178.

**Martínez, S. (1993)**. Sinópsis del género *Azorella* (Apiaceae, Hydrocotyloideae), *Darwiniana* 32:171-184.

**Miyasaka H., Nasu M., Yamamoto T. y Yoneda K (1985)**, Production of ferruginol by cell suspension cultures of *Salvia miltiorrhiza*, *Volumen 24*, Sección 9, páginas 1931-1933.

**Morales P., Kong M., Pizarro E., Pasten C., Morales G., Borquez J., y Loyola L. (2003)**, Effect of Azorellanone, a Diterpene From *Azorella yareta Hauman*, on Human Sperm Physiology, *Journal of Andrology*, Vol. 24, No. 3

**Moscatiello R, Baldan B & L Navazio (2013)**, Plant Cell Suspension Cultures. *Methods in Molecular Biology* 953:77-93.

**Muñoz M. y Serra M. S. (2006)**, Estado de Conservación de las Plantas de Chile, Ministerio del Medio Ambiente, Gobierno de Chile.

**Rashid K, Ibrahim K y Hamza S (2011)**, Effect of Some Biotic and Abiotic Elicitors on Phenolic Acids and Diterpenes Production from Rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) Leaf and Callus Analyzed by High Performance Liquid Chromatography (Hplc), *Vol.14 (3)*, pp.104-109.

**Richman AS, Gijzen M, Starratt AN, Yang Z, Brandle JE (1999)**, Diterpene synthesis in *Stevia rebaudiana*: recruitment and up-regulation of key enzymes from the gibberellin biosynthetic pathway, *Plant J. (4)*:411-21.

**Ridley S y Ridley J (1979)**, Interaction of Chloroplasts with Inhibitors: Location of Carotenoid Synthesis and Inhibition during Chloroplast Development, *Plant Physiol.* 63, 392-398

**Rodas B A, Muñoz J A, Vazquez F, Hernandez S M T (2015)**, Salicylic-acid elicited phospholipase D responses in *Capsicum chinense* cell cultures, *Plant Physiology and Biochemistry* 1-6.

**Rojo L, Benítez J, Lopez J, Rojas M, Diaz P, Ordoñez J & E Pastene (2009)**, Antioxidant capacity and polyphenolic content of twelve traditionally used herbal medicinal infusions from the South American Andes. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 8(6):498-508.

**Sakato, K. y M. Misawa (1974)**, Effects of chemical and physical conditions on growth of *Camptotheca acuminata* cell cultures, *Agri. Biol. Chem.* 38: 491-497.

**Salgado F, Areche C, Sepúlveda B , Simirgiotis M , Fátima C, Quispe C, Quispe L, Cano T (2014)**, A new mulinane diterpenoid from the cushion shrub *A. compacta* growing in Perú, *Phcog Mag* 2014;10:543-8

**Seskar M, Shulaev V y Raskin I (1998)**, Endogenous Methyl Salicylate in Pathogen-Inoculated Tobacco Plants, *Plant Physiol.* 116: 387-392.

**Tata S. K., Jung J., Kim Y., Choi J., Jung J., Lee I., Shin J. S., Ryu S. (2015)**, Heterologous expression of chloroplast-localized geranylgeranyl pyrophosphate synthase confers fast plant growth, early flowering and increased seed yield, *Plant Biotechnology Journal*, pp. 1-11.

**Thermo Fisher Scientific (2015)**, pCR™8/GW/TOPO® TACloning Kit with One Shot® TOP10 E. coli, Catalog number: K2500-20.

**Tsay, H.S (1999)**, Tissue culture technology of medicinal herbs and its application of medicinal herbs and its application in Taiwan, In C.H. Chou, G.R. Waller, and C.



Reinhardt (eds.), *Biodiversity and Allelopathy: from Organisms to Ecosystems in The Pacific*. Academia Sinica, Taipei, Taiwan, pp. 137-144.

**Tsay, H.S., W.D. Chang, C.C. Chen, and Y.S. Chang (1994)**, The production of imperatorin from *Angelica dahurica* var. *formosana* by cell suspension culture. *J. Agric. Assoc. China*. 168: 32-48

**Van Hengal, A.J., M.P. Harkes, H.J. Witchers, P.G.M. Hesselinc, y R.M. Buitglaar (1992)**, Characterization of callus formation and camptothecin production by cell lines of *Camptotheca acuminata*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 28: 11-18.

**van Klink J, Becker H, y Perry N (2005)**, Biosynthesis of irregular diterpenes in *Anisotome lyallii* by head-to-head coupling of geranyl diphosphate, *Org. Biomol. Chem.*, 3, 542–545.

**Vanisree M, Lee C, Lo S, Nalawade S, Lin C, y Tsay H (2004)**, Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures, *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45: 1-22

**Yajima Y, Yasuda T y Yamada Y (1980)**, Induction of DNA synthesis by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid during callus induction in Jerusalem artichoke tuber tissues, *Physiol. Plant.* 48: 564-567.

**Zerbe P, Hamberger B, Yuen MM, Chiang A, Sandhu HK, Madilao LL, Nguyen A, Hamberger B, Bach SS, Bohlmann J (2013)**, Gene discovery of modular diterpene metabolism in nonmodel systems. *Plant Physiol* 162: 1073–1091.

**Zerbe, P., Chiang, A., Dullat, H., O'Neil-Johnson, M., Starks, C., Hamberger, B. and Bohlmann, J. (2014)**, Diterpene synthases of the biosynthetic system of medicinally active diterpenoids in *Marrubium vulgare*. *Plant J*, 79: 914–927.

**Zuloaga, F. O., Morrone, O. & M. J. Belgrano. (2008)**, Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur. <http://www.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina/FA.asp>