



ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE EXTRACTOS DE HOJA Y CÉLULAS DESDIFERENCIADAS DE CIRIÁN (*Crescentia alata* Kunth) Y ENSAYO PRELIMINAR DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *fls*.

Jannette Alonso Herrada, 2010

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue analizar la composición de los extractos provenientes de hojas y células desdiferenciadas de cirián y el análisis preliminar de la expresión del gen *fls* que codifica para la enzima flavonol sintasa. Se germinaron *in vitro* semillas de cirián. Estas plántulas sirvieron como fuente de explantes para generar el cultivo de células desdiferenciadas a partir de tallo. La combinación 2,4-D [0.22 mg/L], TDZ [1.10 mg/L] y CIN [0.22 mg/L] resultó ser idónea para el establecimiento de un sistema de producción y propagación de callo friable. Se evaluaron los extractos de callo y hoja por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). El perfil cromatográfico reveló una gran variedad de compuestos pertenecientes al grupo de los fenilpropanoides, flavonoides y terpenos en hoja, así como de iridoides y fenilpropanoides en callo. Para el análisis de expresión, se aisló ARN total de callo, hoja, tallo y raíz de plántulas cultivadas *in vitro* y *ex vitro*, obteniéndose un rendimiento de 66 a 114 µg de ARN/g de tejido congelado. Se amplificó un fragmento del gen *fls* que codifica para la enzima flavonol sintasa con oligonucleótidos diseñados a partir de secuencias conservadas de varias especies. Este fue utilizado como sonda para la hibridación en los análisis Southern y Northern-blot; el análisis Southern-blot indicó al menos una copia del gen dentro del genoma de cirián, mientras que el análisis Northern-blot indicó un mayor nivel de expresión del gen *fls* en hoja *ex vitro*, esto sugiere que la expresión del gen *fls* en cirián ocurre en tejido especializado.



ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE EXTRACTOS DE HOJA Y CÉLULAS DESDIFERENCIADAS DE CIRIÁN (*Crescentia alata* Kunth) Y ENSAYO PRELIMINAR DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *fls*.

Jannette Alonso Herrada, 2010

ABSTRACT

The aim of this study was to analyze the composition of the extracts from leaves and undifferentiated cells of cirian and preliminary analysis of the *fls* gene expression that encodes for the enzyme flavonol synthase. Seeds of cirian were germinated *in vitro*, these seedlings served as explants source to generate the undifferentiated cells culture from stem. The culture medium with 2.4-D [0.22 mg / L] + TDZ [1.10 mg / L] + CIN [0.22 mg / L], proved to be ideal for establishing a system of production and propagation of friable calli. The calli and leaf extracts were subjected to analysis by high performance liquid chromatography (HPLC), the chromatographic profile revealed a variety of compounds belonging to the group of phenylpropanoids, flavonoids and terpenes in leaf and iridoids and phenylpropanoids in callus. For expression analysis, total RNA was isolated from callus, leaf, stem and root of seedlings grown *in vitro* and *ex vitro*, resulting in a yield of 66 to 114 g RNA / g frozen tissue. Amplified a fragment of the *fls* gene encoding the enzyme flavonol synthase primers designed from conserved sequences of various species. This was used as a hybridization probe for Southern and Northern-blot. Southern-blot analysis indicated at least one copy of the gene into the genome of cirian, while Northern-blot analysis indicated the highest level of *fls* gene expression in leaf *ex vitro*, this suggests that the *fls* gene expression in cirian occurs in specialized tissue at specific stage of development.