

1. DATOS GENERALES DEL PROYECTO

Código:	CIVABI-010213
Centro de Investigación:	Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad
Programa:	BIOTECNOLOGÍA Y RECURSOS GENÉTICOS
Título del Proyecto:	ESTUDIO DEL EFECTO EN LOS GENES DE DEFENSA (PR) POR LA APLICACIÓN DEL EXTRACTO DEL AJI ROCOTO Y (Capsicum annum) SOLIMANILLO EN UN CULTIVO DE TOMATE (Lycopersicon esculentum l)
Grupo de Investigación:	Biodiversidad y Recursos Genéticos
Area de Conocimiento:	Ciencias de la Vida
Línea de Investigación:	Biodiversidad y Recursos Genéticos
Tipo de Investigación:	Aplicada
Campo :	Tecnologías
Investigador Principal :	PABLO WILSON AREVALO MOSCOSO
Proyectos Vinculados :	ESTUDIO DE LA VARIACIÓN DEL ACIDO SALICÍLICO EN RELACIÓN AL AUMENTO DEL GEN PR POR LA APLICACIÓN DEL AGUA ACTIVADA ELECTROQUIMICA (SEA) EN CULTIVO DE TOMATE (LYCOPERESICON
Duración del Proyecto :	12 Meses
Localización del Proyecto :	Cuenca
Fecha de ingreso :	27/09/2013 15:42

2. ANTECEDENTES

El tomate de mesa (*Solanum lycopersicum*) es una de las hortalizas más ampliamente cultivadas a nivel mundial, representa un alto porcentaje de las plantas comerciales cultivadas en nuestro país. El cultivo de tomate tiene una gran acogida entre los consumidores aunque su producción se ve afectada por una gran cantidad de plagas, entre las que se incluyen bacterias, virus, hongos e insectos. El cultivo de esta hortaliza ha tenido un creciente desarrollo en los últimos años, aunque se ha visto mermado en un considerable porcentaje por la falta de programas adecuados de sanidad agrícola y control de plagas. El control de enfermedades básicamente se lo realiza con la aplicación de agroquímicos que, si bien brindan un control efectivo también afectan a la salud de los consumidores, contribuyendo así a la contaminación de los terrenos de cultivo.

En los últimos años se desarrollan estudios para establecer sustancia o compuestos con gran poder biocida para aplicar en cultivos, caracterizados por ser amigables a su entorno como es el caso del agua activada electroquímicamente SA, que es un solución de gran poder biocida como lo establecen varios estudios en el campo de la salud, industrial y la agricultura donde se destaca el poder biocida.

Nuestro trabajo desarrollado en el 2011 en un cultivo de tomate de mesa aplicando el SA a presentado buenos resultados considerando que existen algunos mecanismos en las plantas para evitar la infección de las plagas. Estos sistemas de infección son los denominados activos y pasivos. (Zhang; H; Xie; X; Xu; Y; Wu; N, 2004). Los sistemas activos se caracterizan por presentar una serie de eventos bioquímicos que activan y desactivan genes desencadenando la expresión de los mismos, los cuales se denominan genes de defensa (Ooijen, A, Burg, Cornelissen, & Takken, 2007). Dentro de los sistemas activos se encuentra los denominados genes PR. Se afirma, por ejemplo que las proteínas PR ofrecen una resistencia contra el oomicete *Phytophthora infestans* en tabaco al provocar la desintegración de su pared celular evitando así su desarrollo (Woloshuk, Meulenhoff, Sela-Buurlage, Sela-Buurlage, Elzen, & Cornelissen, 1991). Un mayor conocimiento sobre los genes PR, han permitido el desarrollo de plantas resistencia a enfermedades y que se adapten en ambiente adversos. (Edreva, 2005). Por lo que es de suma importancia estudiar la regulación y expresión de estos genes de defensa, puesto que muchas de las características deseadas comercialmente se encuentran en plantas susceptibles, por ende las más afectadas. Si el agua activada SEA es un agente que activa a estos genes PR en el tomate estaremos en frente de una solución muy importante para disminuir las pérdidas en los cultivos iniciando.

3. JUSTIFICACIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es uno de los productos más importantes cultivados en el Ecuador. A pesar de la expansión que ha tenido este producto en el país y a la tecnificación de su cultivo, esta planta sigue siendo atacada por una gran variedad de patógenos. Los cuales acaba con gran parte de la producción de esta hortaliza, provocando pérdidas a los agricultores y escasez en el mercado. Para combatir enfermedades como el La cenicienta, es necesario generar tecnologías viables que permitan minimizar el problema de una manera eficaz. Es importante que estas tecnologías sean económicamente viables, para que el costo de su desarrollo no altere el precio final del producto. Estas tecnologías además deben ser seguras para que no afecten a la salud de los productores y consumidores y al medio ambiente.

Es por ello, que la investigación biotecnológica ha incursionado en el estudio de las técnicas para el análisis de expresión génica. Estas técnicas consisten en determinar los niveles basales de mRNA de cualquier gen o familia génica para cuantificar la cantidad de proteína que se produce (Gachon, et al., 2004) en función del mRNA presente. El conocimiento de estos niveles de expresión es de gran interés, pues son útiles para deducir los procesos fisiológicos que involucran a las células y determinar su normal funcionamiento.(Gachon, et al., 2004).

Conociendo el patrón de expresión génica, basado en la cantidad de transcrito detectado, podemos determinar si el comportamiento de la planta estudiada, es influenciado por un factor biótico o abiótico y de qué manera este afecta al desarrollo de planta, en consecuencia, a la producción.

La respuesta SAR va acompañada por el incremento en la expresión de un gran número de genes de proteínas PR, tanto en tejidos locales como distales. Las primeras PRs descritas se detectaron en plantas de tabaco sometidas a una infección con TMV de tipo incompatible (HR)(Gianinazzi et al., 1970; van LOn y van Kammen, 1970). En la actualidad ya han sido caracterizadas numerosas PRs en diferentes especies vegetales y se clasifican en 17 familias. La mayoría de las PRs se inducen bajo la acción de moléculas señalizadoras de la respuesta defensiva tales como el ácido salicílico (Shah, 2003).

Uno de los grupos de proteínas PR más importantes es el grupo de las PR-1, PR-b1 las cuales constituyen aproximadamente el 2% de las proteínas totales de la hoja. Sin embargo, estas proteínas son interesantes desde el punto de vista bioquímico, ya que su función es aún desconocida (Edreva, 2005). Estudios previos sobre estas proteínas han reportado actividad antifúngica e inhibitoria contra *Phytophthora infestans* (Niderman, et al., 1995), lo cual puede ser de importancia para estudios de resistencia.

El control de plagas en el cultivo de tomate es un aspecto muy importante a tener en cuenta, pues el uso indiscriminado de plaguicidas en la agricultura es perjudicial, tanto para los agricultores como para los consumidores. Es así que, el uso de nuevas sustancias que sean capaz de activar la respuesta defensiva natural de las plantas puede generar una producción más limpia. El conocimiento de este tipo de regulación hace posible establecer que nuevas sustancias cumple dos funciones en un cultivo como biocida y con un activador de defensas en la planta aspecto que buscamos determinar en el presente estudio.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

VALORAR EL EFECTO EN LOS GENES DE DEFENSA (PR) POR LA APLICACIÓN DE EXTRACTO DE AJI (*Capsicum annum*) EN UN CULTIVO DE TOMATE

4.2 Objetivos Especificos

- 1 Preparación de extracto de ají
- 2 Establecer la actividad biocida en laboratorio ante tres patógenos de los cultivos de tomate
- 3 Determinar los niveles de expresión de los genes PR (por ejemplo PR1b1 y PR2b) presentes en las plantas de cada tratamiento
- 4 Analisis de los resultados.

5. ESTADO DEL ARTE

El tomate es una fruta nativa de las Américas, en el siglo 16; las semillas fueron llevadas a Europa y favorablemente aceptadas en los países mediterráneos, con el tiempo se ha incorporado en la dieta mundial.

Conociendo de antemano que nuestro país posee una diversidad de regiones aptas para el cultivo hortícola en general y del tomate en particular, se sabe que su producción, en determinadas épocas del año, no llega a abastecer la demanda interna del producto, obligando a adquirir bienes semi-elaborados en el mercado externo (Velázquez, 2000).

A pesar del incremento de la superficie cultivable, su producción se ha visto disminuida especialmente por el ataque del patógeno, que impide el desarrollo normal de la planta. (BACA, 2008)

Uno de los métodos que más se utilizan para contrarrestar estos males es el uso de agroquímicos. Estos productos representan un papel muy importante en la reducción de los daños económicos en los cultivos. Sin embargo los microorganismos causantes de enfermedades fitopatógenos, en muchos casos generan resistencia, y consecuentemente se incrementan las dosis de productos agroquímicos, sin embargo, la toxicidad elevada de algunos de ellos, su persistencia en el medio y su mal uso han llevado a un replanteamiento de las estrategias de control de plagas (Ramón, 2007). Por ello, actualmente se desarrollan nuevos agentes para este fin como es el uso de agentes de control biológico y sustancias químicas que combinan su poder biocida y la inocuidad para con el entorno y la población. (BACA, 2008)

Hasta hace unas cuatro décadas, los rendimientos de los cultivos en los sistemas agrícolas dependía de los recursos internos, del reciclado de la materia orgánica, de los mecanismos de control biológico y del régimen de las lluvias. Los rendimientos agrícolas eran modestos pero estables. La producción se aseguraba sembrando más de un cultivo o variedad, en el espacio y en el tiempo, como un seguro contra las explosiones de plagas o la severidad del clima. Los aportes de nitrógeno se lograban rotando los principales cultivos con leguminosas. Al mismo tiempo las rotaciones suprimían a los insectos plaga y enfermedades al quebrar efectivamente el ciclo de vida de éstas.

La agroecología provee las bases ecológicas para la conservación de la biodiversidad en la agricultura, además del rol que ella puede jugar en el restablecimiento del balance ecológico de los agro ecosistemas, de manera de alcanzar una producción sustentable. La biodiversidad promueve una variedad de procesos de renovación y servicios ecológicos en los agro ecosistemas; cuando estos se pierden, los costos pueden ser significativos. (Altieri and Nicholls)

En esencia, el comportamiento óptimo de los sistemas de producción agrícola depende del nivel de interacciones entre sus varios componentes. Las interacciones potenciadoras de sistemas son aquellas en las cuales los productos de un componente son utilizados en la producción de otro componente malezas utilizadas como forraje, estiércol utilizado como fertilizante, o rastrojos y malezas dejadas para pastoreo animal. Pero la biodiversidad puede también subsidiar el funcionamiento del agro ecosistema al proveer servicios ecológicos tales como el reciclaje de nutrientes, el control biológico de plagas y la conservación del agua y del suelo.

La agroecología enfatiza un enfoque de ingeniería ecológica que consiste en ensamblar los componentes del agro ecosistema, de manera que las interacciones temporales y espaciales entre estos componentes se traduzcan en rendimientos derivados de fuentes internas. Las sinergias en agro ecosistemas como la producción de sustancias químicas para estimular componentes deseados y suprimir componentes indeseables como sustancias aleloquímicas, repelentes, etc. (Altieri and Nicholls)

6. METODOLOGÍA

Para realizar la investigación diseñamos un experimento en campo para lo cual se procederá a realizar un cultivo de tomate en invernadero.

El cultivo se lo realizara en un área de 300 m² cada uno, ubicado en el sector de Umancay en el cantón Paute a 35 Km de la ciudad de Cuenca cuyos predios perteneciente a la Universidad Politécnica Salesiana, en los cuales se procederá a realizar 18 hileras en las que se ubicaran 622 planta en el cultivo bajo invernadero las hileras de los bordes no se consideraran para el estudio para disminuir el erro del experimento.

Por los cual nuestra investigación se lo realizara en una población de 436 planta en el cultivo bajo invernadero en el que se procederá a aplicar una solución del extracto, cada 7 días.

Luego del proceso de trasplante se procederá a dejar a que las plantas se adapten por unos 15 días en su entorno para proceder a la aplicación de los tratamiento, y a tomar las muestras de las cuales se extrae el ADN, y determinar la expresión genética PR, como la concentración de ácido salicílico.

El proceso de toma de muestra se procederá a despojar de las cuatro hileras de cada tratamiento como del cultivo bajo invernadero, la materia vegetal para posterior formar una sola muestra la que se procederá a extraer el ADN, de igual manera de procede con la muestra del ácido salicílico. Las muestras se procederá a tomar en intervalos de 6, 24 y 48 horas, de cada tratamiento de acuerdo a la experiencia de trabajos sobre la expresión genética. Estas muestras se procederán a realizar con una frecuencia de 30 días luego de una aplicación.

Con respecto a las pruebas debemos establecer que se lo realizaran en el laboratorio de la Universidad.

Con estos datos procederemos a analizarlos para establecer si se cumple o no nuestra hipótesis siendo esta información de gran importancia para establecer e iniciar nuevas investigaciones.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. LUIS L. VÁZQUEZ MORENO. Manejo Integral de las plagas. 2008. Ciudad de La Habana : Palcograf, 2008. ISBN ISBN 978-959-05-0543-0.
2. JENNNY GUSTAVSSON CHRISTEL CEDERBERG and ROBERT VAN OTTERDIJK ALEXANDRE MEYBECK. Perdidas y desperdicio de alimentos en el mundo [online]. Alemania : FAO, 2011. [Accessed 19 July 2013]. ISBN 978-92-5-307205-7. Available from: <http://www.fao.org/docrep/016/i2697s/i2697s.pdf>
3. ELMER L. COOPER, L. DEVERE BURTON. AGROCIENCIA: FUNDAMENTO Y APLICACIONES. 4. CENGAGE LEARNING, MX - CENGAGE, 2009.
4. DE OLIVEIRA NOBRE AZEVEDO, A.S. Assessment and Simulation of Atrazine as Influenced by Drainage and Irrigation: An Interface Between RZWQM and ArcView GIS [online]. Iowa State University, 1998. Available from: <http://books.google.com.ec/books?id=ShjyNwAACAAJ> Cited by 0007
5. PIMENTEL, David and LEVITAN, Lois. Pesticides: Amounts Applied & Amounts Reaching Pests. BioScience. February 1986. Vol. 36, no. 2, p. 86¿91. a9h.
6. FAO. FAOSTAT. [no date]. Cited by 0010
7. NEBEL, Bernard J. and RICHARD T. WRIGHT. CIENCIAS AMBIENTALES. Sexta. México : PRENTICE HALL, 1999. ISBN 970-17-0233-6. Cited by 0209
8. Tomato genome sequence bears fruit¿: Nature News & Comment. [online]. [Accessed 30 July 2013]. Available from: <http://www.nature.com/news/tomato-genome-sequence-bears-fruit-1.10751>
9. Secuencian el genoma del tomate | bioBlogia. [online]. [Accessed 30 July 2013]. Available from: <http://www.bioblogia.com/2012/05/secuencia-el-genoma-del-tomate/>
10. BARONE, Amalia, CHIUSANO, Maria Luisa, ERCOLANO, Maria Raffaella, GIULIANO, Giovanni, GRANDILLO, Silvana and FRUSCIANTE, Luigi. Structural and Functional Genomics of Tomato. International Journal of Plant Genomics. 2008. Vol. 2008, p. 1¿12. DOI 10.1155/2008/820274.
11. VAN LOON, L. C. and VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiological and Molecular Plant Pathology. 1999. Vol. 55, no. 2, p. 85¿97. Cited by 1165
12. EDREVA, Aglika. Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. Gen Appl Plant Physiol. 2005. Vol. 31, no. 1-2, p. 105¿124. Cited by 0149
13. MARTIN HEIL and RICHARD M. BOSTOCK. Induced Systemic Resistance (ISR) Against Pathogens in the Context of Induced Plant Defences. Annals of Botany [online]. 2002. Vol. 89. [Accessed 30 July 2013]. Available from: <http://aob.oxfordjournals.org/content/89/5/503.full.pdf>
14. KAVROULAKIS, N. Cytological and Other Aspects of Pathogenesis-related Gene Expression in Tomato Plants Grown on a Suppressive Compost. Annals of Botany. 21 June 2006. Vol. 98, no. 3, p. 555¿564. DOI 10.1093/aob/mcl149. Cited by 0014
15. TORNERO, Pablo, GADEA, José, CONEJERO, Vicente and VERA, Pablo. Two PR-1 genes from tomato are differentially regulated and reveal a novel mode of expression for a pathogenesis-related gene during the hypersensitive response and development. Molecular plant-microbe interactions. 1997. Vol. 10, no. 5, p. 624¿634. Cited by 0098
16. FERNANDO XAVIER RIVAS ROMERO. Análisis de la expresión del gen PR-1 , mediante la técnica de PCR en tiempo real (RT-PCR), en tomate (Solanum lycopersicum) infectado con Phytophthora infestans [online]. Pregrado. Sangolquí : i ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO, 2010.[Accessed 30 July 2013]. Available from: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/2640/1/T-ESPE-030038.pdf>
17. Bioinformática. Wikipedia, la enciclopedia libre [online]. 2013. [Accessed 30 July 2013]. Available from: <http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Bioinform%C3%A1tica&oldid=68702719>

18. PCR en tiempo real - Wikipedia, la enciclopedia libre. [online]. [no date]. [Accessed 30 July 2013]. Available from: http://es.wikipedia.org/wiki/PCR_en_tiempo_real
19. SIGMA. Spectrum Plant Total RNA kit [online]. [Accessed 30 July 2013]. Available from: http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/General_Information/spectrum_tb.pdf
20. ROCHE APPLIED SCIENCE. Relative Quantification [online]. 2001. [Accessed 30 July 2013]. Available from: <http://www.gene-quantification.de/roche-rel-quant.pdf>
21. VANDESOMPELE, Jo, DE PRETER, Katleen, PATTYN, Filip, POPPE, Bruce, VAN ROY, Nadine, DE PAEPE, Anne and SPELEMAN, Frank. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*. 2002. Vol. 3, no. 7, p. research0034.
22. HOOGEWIJS, David, HOUTHOOFD, Koen, MATTHIJSSENS, Filip, VANDESOMPELE, Jo and VANFLETEREN, Jacques R. Selection and validation of a set of reliable reference genes for quantitative sod gene expression analysis in *C. elegans*. *BMC Molecular Biology*. 2008. Vol. 9, no. 1, p. 9. DOI 10.1186/1471-2199-9-9.

8. RESULTADOS ESPERADOS

El Desarrollo de este proyecto busca determinar que el extracto de ají no solo es un excelente fungicida y bactericida como lo demuestran estudios realizados, si no que puede ser utilizado en el campo agrícola como un agente biocida para los cultivos de tomate y que cumple una función adicional que es de activar las defensas de las planta permitiendo a esta protegerse de los patógenos y alcanzando mayor producción en los cultivos.

9. TRANSFERENCIA DE TECNOLOGÍA Y/O SOCIALIZACIÓN DE RESULTADOS DE INVESTIGACIÓN

Esta tecnología será transferida, a los estudiantes de la carrera de Ingeniería Ambiental y Ing. biotecnología de los recursos naturales. mediante su participación en el proyecto, con el trabajo en campo y laboratorio. Se dictarán charlas dirigidas a los estudiantes y ciudadanía en general para dar a conocer los resultados alcanzados y se establecerá contactos con agricultores de la zona dedicados al cultivo de tomate, que estén interesados en la aplicación de esta tecnología en sus cultivos

10. IMPACTOS DEL PROYECTO

deberían realizar con más profundidad y obtener nuevos resultados.

¿ El proyecto incidirá en el desarrollo del agro y contribuirá al mejoramiento de las condiciones del cultivo de tomate, se protege el medio ambiente, y consecuentemente, las condiciones de los agricultores.

¿ Se pretende evitar el uso exagerado de fungicidas y productos químicos altamente tóxicos, mediante el uso de tecnologías alternativas, para el manejo de cultivos.

El proyecto beneficiará al proceso enseñanza-aprendizaje de los estudiantes de Ingeniería Biotecnología de la Universidad Politécnica Salesiana, ya que se involucran directamente en el proyecto a estudiantes.

Los costos de la sustancia son económicos

Se elimina el riesgos de daños al agricultor además protegemos al consumidor final por menor cantidad de residuos químicos en el producto

11. INFORMACIÓN DE COFINANCIADORES (en caso de que existieran)