

ACTIVACIÓN DE GENES DE DEFENSA EN PLANTAS DE TOMATE DE MESA *Lycopersicon Esculentum L.*, A TRAVÉS DE LA APLICACIÓN DE SUSTANCIAS QUÍMICAS Y NATURALES

ACTIVATION OF DEFENSE GENES IN TOMATO PLANTS, *Lycopersicon Esculentum L.*, THROUGH THE APPLICATION OF CHEMICAL AND NATURAL SUBSTANCES

Inés Malo¹, Giovanni Bernacchia² y Pablo Arévalo¹

¹Universidad Politécnica Salesiana, Grupo de Investigación y Valoración de la Biodiversidad. Calle Vieja 12-30 y Elia Liut. Cuenca, Ecuador.

² Dipartimento Scienze della Vita e Biotecnologie, Via Borsari 46. Università di Ferrara, Italia. Present address Universidad Politécnica Salesiana, Grupo de Investigación y Valoración de la Biodiversidad. Calle Vieja 12-30 y Elia Liut. Cuenca, Ecuador.

Autor para correspondencia: imalo@ups.edu.ec

Manuscrito recibido el 22 de enero de 2015. Aceptado, tras revisión, el 2 de junio de 2015.

Resumen

Lycopersicon esculentum L. es una planta cuyo cultivo en el país, tanto a cielo abierto como en invernadero, está sujeto a la utilización de agroquímicos para que sea económicamente rentable, puesto que se ve afectado por una gran variedad de plagas y condiciones ambientales adversas. El consumo de tomate de mesa se encuentra muy difundido en nuestro país debido a su sabor, bajo contenido calórico y propiedades antioxidantes. Para luchar contra las enfermedades de las plantas, se han aplicado una gran variedad de sustancias; cabe señalar que el uso ancestral de extractos vegetales ha sido reemplazado por la utilización de sustancias químicas en grandes extensiones de cultivos.

Para el presente trabajo, se escogieron tres genes WRKY, que codifican como factores de transcripción, y que presentan mayores niveles de expresión en las hojas de tomate. Se evaluó la activación de los genes SIWRKY 8, SIWRKY 23 y SIWRKY 39, una vez transcurridas 24 y 48 horas de la aplicación tanto de una sustancia de origen vegetal como extracto (T 1), de una sustancia química (T 2) y de un fungicida de venta comercial (T 3). Las plantas de tomate de mesa fueron cultivadas bajo condiciones controladas. Una vez aplicados los tratamientos, se procedió a la extracción del ARN, se utilizó PCR en tiempo real y cuantificación relativa para el análisis de la expresión de los genes citados. Con los resultados obtenidos, se realizó el análisis estadístico ANOVA y la prueba HSD de Tukey para discriminar la efectividad de los tratamientos.

De los genes WRKY analizados, únicamente SIWRKY 23 se activa alcanzando un valor Fold Change de 4 a las 24 horas con el tratamiento de agroquímico. Estos resultados informan la expresión de genes de defensa inducidos por sustancias con acción biocida y la posibilidad de caracterizar otras sustancias que puedan producir esta activación sobre plantas de tomate.

Palabras claves: tomate, WRKY, factores de transcripción, RT-PCR.

Abstract

Lycopersicon esculentum L. is a plant whose cultivation in the country—both open and greenhouse cultivation—is subject to the use of agrochemicals to make it economically viable, since it is affected by a great variety of pests and adverse environmental conditions. Tomato consumption is widespread in our country because of its taste, for being low in calories, and its antioxidant properties. A diversity of substances has been used to control plant illnesses, it is worth mentioning that ancestrally the use of vegetable extracts has been replaced by the use of chemicals in large extensions of crops.

For this work, three WRKY genes were chosen, which act as transcription factors, and have higher expression levels in tomato leaves. Gene activation of SIWRKY 8, SIWRKY 23 y SIWRKY 39 was assessed 24 and 48 hours after the application of: substances of plant origin (T 1), electrolytic chemical (T 2) and a commercial fungicide (T 3). The tomato plants were grown under controlled laboratory conditions. Once the treatments were applied, RNA was extracted, real time PCR was performed and also, relative quantification was used to analyze the expression of the aforementioned genes. These results were analyzed statistically using ANOVA and Tukey's HSD test to discriminate the effectiveness of each treatment.

From the analyzed WRKY genes, only SIWRKY 23 showed and activation reaching a Fold Change value of 4 at 24 hours with the agrochemical treatment. These results provide evidence for the expression of induced defensive genes by substances of biocide activity and the possibility to characterize other substances that may cause this activation in tomato plants.

Keywords: tomato, WRKY, transcription factors, RT-PCR

Forma sugerida de citar: Malo, I., G. Bernacchia y P. Arévalo. 2015. **Activación de genes de defensa en plantas de tomate de mesa *Lycopersicon Esculentum L.*, a través de la aplicación de sustancias químicas y naturales.** La Granja: Revista de Ciencias de la Vida. Vol. 21(1): 61-68. ISSN: 1390-3799.

1. Introducción

El cultivo de tomate de mesa en nuestro país requiere de alternativas viables, mediante el uso de sustancias tanto de origen natural como químico, que sean amigables con el entorno y a su vez ofrezcan la capacidad de activación comprobada del sistema de defensa de las plantas para un eficaz manejo de plagas.

El tomate de mesa, *Lycopersicon esculentum* L., es una planta dicotiledónea de la familia de las Solanáceas, originaria del occidente de América del Sur. Tiene relevancia su cultivo comercial y las diferentes variedades para mesa e industria (Van Loon *et al.*, 1998). Su fruto es consumido en todo el mundo, tanto fresco como procesado industrialmente.

Constituye uno de los alimentos presentes en la dieta de los ecuatorianos, por ser bajo en calorías y poseer propiedades antioxidantes. Su cultivo en el país está sujeto al uso de agroquímicos, para que sea sustentable comercialmente. Las causas más comunes del crecimiento deficiente de las plantas y de la destrucción de cosechas son los fitopatógenos, el clima desfavorable, las malezas, las plagas y los insectos.

Según datos entregados por el Instituto Nacional de Estadística y Censos, INEC, al Sistema de Información Nacional de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca, la producción registrada en nuestro país durante el período 2006-2012 es de 381 865 toneladas; y en el año 2012, de 62 956 toneladas, correspondiente a una superficie sembrada de 3115 hectáreas y una superficie cosechada de 3077 hectáreas (Kavroulakis *et al.*, 2006).

De este hecho, deriva el interés por buscar y rescatar el uso de sustancias alternativas, que no representen peligros potenciales, tanto para el agricultor como para el consumidor, y que, a la vez, sean factibles de utilizar a gran escala.

De entre las Solanáceas, el tomate es el más intensamente investigado, tanto en estudios genéticos como en genómicos. (Pérez y Hurtado, 2002).

El desarrollo de enfermedades de las plantas sigue las mismas etapas del desarrollo de las enfermedades tanto de los animales como la del hombre. (Hodson y Bryant, 2012), por lo común, tan complejo. Las plantas poseen mecanismos de defensa preexistentes al ataque de patógenos y también mecanismos inducidos. Las defensas preexistentes pue-

den ser de tipo estructural, que está representado tanto por barreras físicas de la pared celular como por las bioquímicas, debido a compuestos tóxicos o metabolitos secundarios, con propiedad antimicrobiana presentes, tanto en forma activa o como precursores inactivos, almacenados en organelas (García Pineda y Lozoya Gloria, 2004).

En la defensa inducida o activa, las células del hospedero deben tener la capacidad de distinguir, mediante receptores de membrana, entre las señales propias y las generadas por un patógeno denominados elicitors (Van Loon y Van Strien, 1999).

Los factores de transcripción con motivo Trp-Arg-Lys-Tyr (WRKY) deben su nombre a la región de sesenta aminoácidos del dominio WRKY que tiene una secuencia conservada en la región N-terminal. Poseen afinidad a secuencias de ADN, tipo W-box (C/T) TGAC(C/T), que se encuentra en la región promotora de muchos genes. Estos factores regulan la transcripción y expresión de genes inducidos por patógenos, senescencia, ácido absísico (ABA), ácido giberélico (GA), ácido salicílico (SA), y desempeñan un papel importante, tanto en la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas como en la respuesta a muchas clases de estrés biótico y abiótico.

Los genes WRKY serían activados por cascadas, de señalización de MAPKs y kinasas, proteicas, dependientes de calcio (Eurogentec). Se han identificado 81 genes WRKY para *Solanum lycopersicum* SIWRKY, clasificados en tres grupos principales, de los cuales el segundo grupo se encuentra dividido en cinco subgrupos. El grupo I conforma dos dominios WRKY, que contienen, cada uno, un motivo C₂H₂ de dedo de zinc. El grupo II contiene un dominio simple WRKY, que incluye un motivo C₂H₂ de dedo de zinc, que puede dividirse, a su vez, en cinco subgrupos (II-a, b, c, d, e, respectivamente). El grupo III contiene un dominio simple, con un motivo C₂HC de dedo de zinc (Edreva, 2005).

El desarrollo de técnicas moleculares para el análisis de la expresión génica; es decir, la determinación efectiva de la producción de ARNm, que posteriormente será traducido a la proteína específica, permite avanzar en la investigación sobre la fisiología y la defensa de las plantas. La PCR cuantitativa, qPCR o PCR en tiempo real, será la técnica utilizada en el presente estudio para la determinación de los niveles de expresión génica en las plantas de tomate de mesa. Esta técnica es una variante de la PCR

tradicional, en la cual se amplifican y cuantifican, simultáneamente, los genes de interés, con la ayuda de cebadores específicos complementarios a secuencias de interés, y un fluoróforo intercalante que al ser excitado por una longitud de onda apropiada emite fluorescencia, que es medida en cada ciclo de amplificación (Barone *et al.*, 2008).

2. Materiales y métodos

2.1 Obtención del material vegetal

Se elaboraron semilleros a partir de semillas certificadas de tomate de mesa, las cuales al llegar al estado de plántulas fueron trasplantadas y sembradas en un sustrato natural de humus; se esperó hasta que tuvieran una edad aproximada de 60 días y una altura promedio de 15 centímetros (Figura 1). Las plantas fueron mantenidas en una cámara de crecimiento a temperatura constante de 20°C, iluminadas durante 16 horas y con control de la humedad, mediante riego.



Figura 1. Cultivo de plantas de tomate en condiciones controladas de laboratorio.

2.2 Extracción y cuantificación de ARN

Para la extracción de ARN, se utilizó el Kit Plant Total RNA de la casa Sigma. Se pesaron, aproximadamente, 100 mg de un pool de hojas, correspondientes a cada tratamiento de las plantas, las cuales fueron molidas con la adición de nitrógeno líquido en un mortero, agregando *Buffer* de lisis para luego pasar a tubos cónicos de 1.5 ml.

Los restos celulares fueron separados por centrifugación y el ARN se capturó en una columna, mediante una solución de unión que prevé que el ADN genómico y polisacáridos taponen la columna. El ADN genómico residual se lavó con soluciones, y el ARN purificado se eluyó en agua libre de

ARNasa. Se pudo obtener hasta 100 μ g de ARN total, a partir de 10 mg de tejido vegetal, en un tiempo de 30 minutos, una vez que el tejido fue molido.

El rendimiento típico es de 20-60 μ g y depende tanto del tipo de tejido como del estado de desarrollo. Se realizó tratamiento con DNasa I, para la remoción del ADN genómico que puede estar coeluido junto al ARN, previo a la aplicación de la PCR en tiempo real (Stephenson, 2012).

Se midió la concentración de ARN en el equipo Qubit 2.0 Fluorometer de Invitrogen y la intensidad de la fluorescencia obtenida es proporcional a la concentración. (Mingyu *et al.*, 2012).

2.3 Síntesis de ADN complementaria ADNc

Para la síntesis de ADN complementario se utilizó el Kit Transcriptor Universal cDNA Master, de la casa comercial ROCHE, el mismo que provee los componentes necesarios para la síntesis de ADNc, incluyendo los cebadores hexámeros, nucleótidos, soluciones tampón y enzimas, suplementadas en dos volúmenes que minimizan los errores de pipeteo.

Se utiliza como template, el ARN obtenido del paso anterior, esta es una reacción de transcripción inversa. El cebador es un oligo dT que contiene, exclusivamente, Timina la cual se hibridará a la cola poli-A del ARNm. Es importante estandarizar las cantidades de ARNm, para que las cantidades producidas de ADN complementario sean un reflejo del ARNm inicial. (Rocha Life).

2.4 Reacción de PCR en tiempo real

Para la reacción de PCR en tiempo real, se utilizó el Kit FastStart Essential DNA Green Master de la casa comercial ROCHE.

Se analizan los datos en la fase de amplificación constante (fase logarítmica lineal), mediante cuantificación relativa, comparando los niveles de expresión entre el gen de interés y un gen de referencia denominado constitutivo o “housekeeper”.

El sistema utilizado emplea el colorante SYBR Green, que se intercala entre el ADN y fluoresce una vez unido al ADN. La cantidad de pigmento incorporado es proporcional a la cantidad de blanco generado. El colorante emite su fluorescencia a

520 nm.

Para comprobar la especificidad de la reacción se analiza la curva de fusión o "melting curve", el ensayo se considera válido si produce un pico único bien definido (Rivas y Proaño, 2010).

Los genes de la actina AC y del factor de elongación EF se utilizaron como referencia por la estabilidad de su expresión.

2.5 Sustancias aplicadas a las plantas

Se trabajó con tres sustancias preparadas en base acuosa para aplicar, mediante nebulización a las plantas de tomate, conforme al modelo experimental elaborado.

Tratamiento 1: preparado a partir de una cocción de la planta cola de caballo (*Equisetum arvense*) y posterior dilución en proporción 1:3.

Tratamiento 2: agua con una concentración de cloro de 400 ppm.

Tratamiento 3: fungicida comercial, cuyo principio activo es Myclobutanyl 125 g/l, aplicado en la concentración sugerida por el fabricante.

3. Resultados

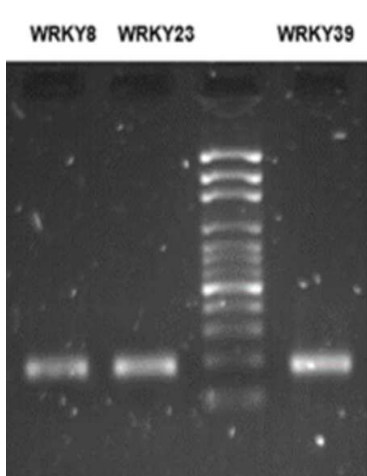


Figura 2. Gel de agarosa al 1,5%, en donde se pueden observar los fragmentos amplificados de los genes SIWRKY8, SIWRKY23 y SIWRKY39, los cuales se encuentran dentro del tamaño esperado, 200 bp, al compararlos con el marcador de peso molecular de 100 pb.

Una vez realizadas las reacciones de amplificación, mediante PCR en tiempo real, se verificó la presencia de amplicones de los tamaños previstos, mediante la migración de los productos de las reacciones finales, en un gel de agarosa al 1,5 % (Figura 2).

Para el tratamiento 1, correspondiente a una solución acuosa del extracto de la planta *Equisetum arvense*, conocida en nuestro medio como cola de caballo; luego de las 24 horas, no se aprecia activación ostensible para los genes SIWRKY (Figura 3).

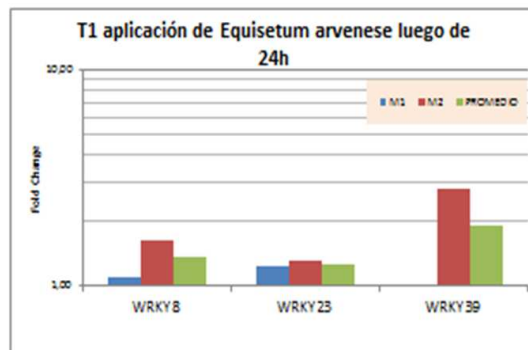


Figura 3. Análisis de expresión de los genes SIWRKY8, SIWRKY23 y SIWRKY39, 24 horas después de la aplicación de una solución, que contiene extracto de la planta *Equisetum arvense*.

Luego de 48 horas, la activación de los genes SIWRKY 8 y SIWRKY 23 se incrementa levemente (Figura 4).

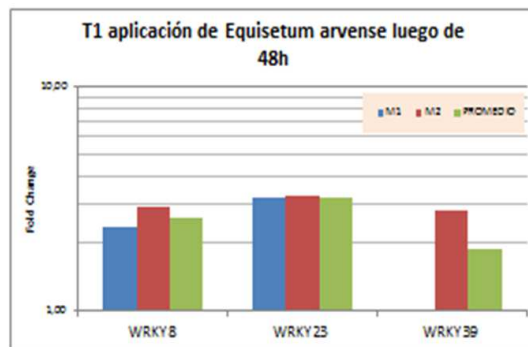


Figura 4. Análisis de expresión de los genes SIWRKY8, SIWRKY23 y SIWRKY39, 48 horas después de la aplicación de una solución que contiene extracto de la planta *Equisetum arvense*.

Al considerar el tratamiento 2, se observa que los genes WRKY no se activan visiblemente (Figura 5).

Luego de 48 horas, los niveles de activación permanecen bajos (Figura 6).

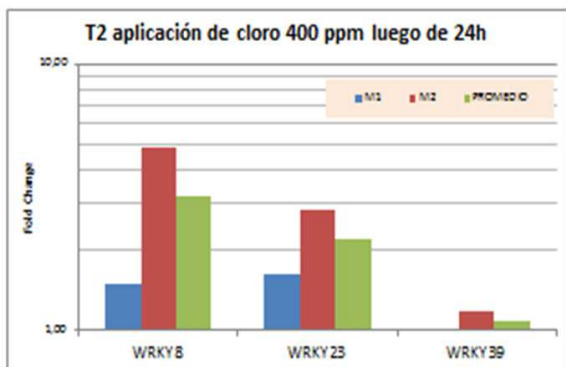


Figura 5. Análisis de expresión de los genes SIWRKY8, SIWRKY23 y SIWRKY39, 24 horas después de la aplicación de una solución, que contiene 400 ppm de cloro.

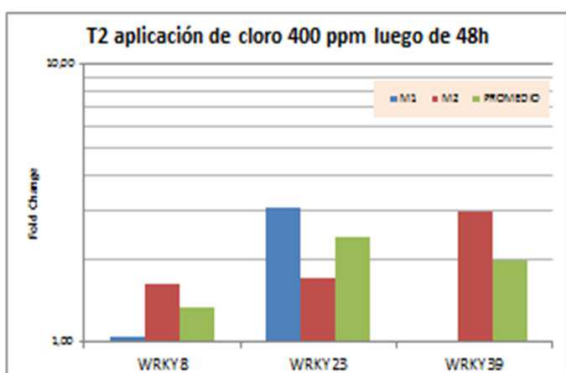


Figura 6. Análisis de expresión de los genes SIWRKY8, SIWRKY23 y SIWRKY39, 48 horas después de la aplicación de una solución que contiene 400 ppm de cloro.

En el tratamiento 3, luego de 24 horas no existe activación considerable de todos los genes (Figura 7). Luego de 48 horas, los niveles de activación permanecen bajos (Figura 8).

Luego de analizar los resultados, surgen los siguientes interrogantes: ¿Los tres tratamientos aplicados están activando, de igual manera o no, los genes analizados? y ¿cuál de los tratamientos es el que genera mayor activación. Para determinar si existe una diferencia significativa entre los tres tratamientos, se aplicó el diseño experimental completamente al azar: un factor y tres niveles con una réplica.

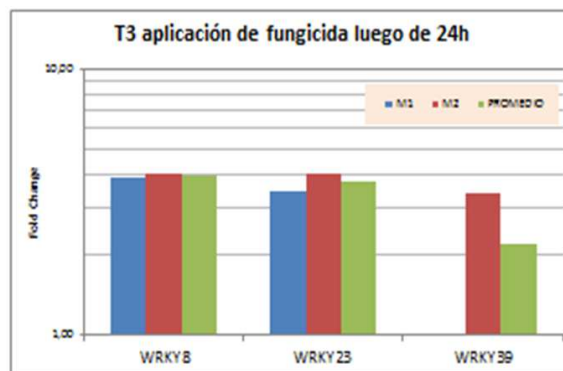


Figura 7. Análisis de expresión de los genes SIWRKY8, SIWRKY23 y SIWRKY39, 24 horas después de la aplicación de una solución que contiene el fungicida myclobutanil.

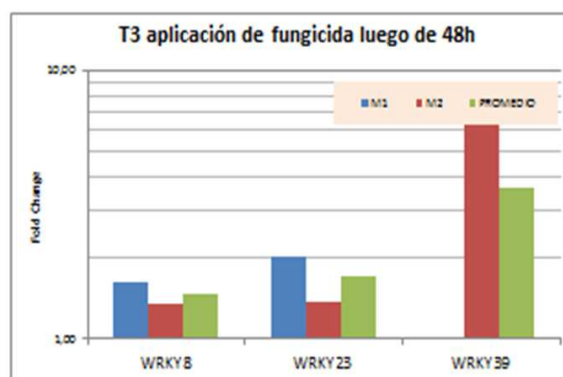


Figura 8. Análisis de expresión de los genes SIWRKY8, SIWRKY23 y SIWRKY39, 48 horas después de la aplicación de una solución que contiene el fungicida myclobutanil.

3.1 Resultados de los tratamientos a las 24 horas

Para el gen SIWRKY 8, de acuerdo con el diseño estadístico, se obtiene un valor de $p = 0,293$ que es mayor al valor de $\alpha = 0,05$, estableciendo que no son altamente significantes. Los tres tratamientos presentan estadísticamente un comportamiento similar.

Se realizó un análisis similar para el gen SIWRKY23, cuyo valor de $p = 0,042$ es menor al valor de $\alpha = 0,05$, por lo cual son altamente significantes; es decir, los tres tratamientos tienen un comportamiento diferente estadísticamente.

Para el gen SIWRKY 39, $p = 0,679$ que es mayor al valor de $\alpha = 0,05$, por lo que no son altamente significativas; es decir, los tres tratamientos tienen un comportamiento similar, estadísticamente.

3.2 Resultados de los tratamientos a las 48 horas

Para el gen SIWRKY 8, de acuerdo con el diseño estadístico, obtenemos un valor de $p = 0,06$, que es mayor al valor de $\alpha = 0,05$; por lo que no son altamente significativos, teniendo estadísticamente un comportamiento similar los tres tratamientos.

Para el gen SIWRKY23, se obtuvo un valor de $p = 0,197$, por lo que tampoco son altamente significativos; es decir, tienen un comportamiento similar, estadísticamente, los tres tratamientos.

Para el gen SIWRKY 39, se obtuvo un valor $p = 0,739$, que es mayor al valor de $\alpha = 0,05$; por lo que no es significativo; es decir, tienen un comportamiento similar, estadísticamente, los tres tratamientos.

4. Conclusiones

Los genes WRKY codifican factores transcripcionales que intervienen en una gran variedad de procesos en las plantas, entre ellas las respuestas abióticas al estrés. Se observó que de los tres genes probados, solamente SIWRKY23 presenta una respuesta diferente a los tres tratamientos colocados, luego de las 24 horas.

Se han reportado estudios sobre los genes WRKY en varias plantas, entre ellas: *Arabidopsis*, arroz, pino, tomate, sometidas a estímulos bióticos y abióticos; por lo que correspondería al tema que se está estudiando, llegar a definir los genes que son controladas por estos factores.

5. Agradecimientos

A la Universidad Politécnica Salesiana, Laboratorio de Ciencias de la Vida, por las facilidades brindadas para el uso del laboratorio de Biotecnología Vegetal; al Programa de Biotecnología de la Universidad de Guayaquil por el asesoramiento brindado; al MSc. Ing. Pablo Arévalo, por su ayuda en el análisis estadístico de los datos obtenidos en el presente

trabajo. A la Dra. Morena De Bastiani, Departamento Scienze della Vita e Biotecnologie. Università di Ferrara, Italia, por la asistencia técnica para el desarrollo de la qPCR.

Referencias

- Barone, A., M. Chiusano y M. Ercolano. 2008. **Structural and Functional Genomics of Tomato**. International Journal of Plant Genomics, ID: 820274.
- Edreva, A. 2005. **Pathogenesis-Related Proteins: Research Progress in the Last 15 Years**. Gen. Appl. Plant Physiology, 31(1-2): 105-124.
- Eurogentec. **qpcr guide**.
- García Pineda, E. y E. Lozoya Gloria. 2004. **Genes de resistencia a enfermedades en plantas**. Revista Mexicana de Fitopatología, 22(3).
- Hodson, M. y J. Bryant. 2012. **Functional biology of plants**. Wiley-Blackwell.
- Kavroulakis, N., K. Papadopoulou, S. Ntougias, G. Zervakis y E. C. 2006. **Cytological and Other Aspects of Pathogenesis-related Gene Expression in Tomato Plants Grown on a Suppressive Compost**. Annals of Botany, 98(3): 555-564.
- Mingyu, Z., Z. Zhengbin, C. Shouyi, Z. Jinsong y S. Hongbo. 2012. **WRKY transcription factor superfamily: structure, origin and functions**. American Journal of Biotechnology, págs. 8051-8059.
- Pérez, J. y G. Hurtado. 2002. **Guía del cultivo de tomate**. Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal, San Salvador.
- Rivas, F. y K. Proaño. 2010. **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***. Tesis del Laboratorio de Biotecnología, Escuela Politécnica del Ejército.
- Rocha Life. **Transcriptor Universal cDNA Master User Manual**.
- Stephenson, F. H. 2012. **Cálculo en biología molecular y biotecnología: guía de matemáticas para el laboratorio**. Elsevier, Barcelona, segunda edición.

Van Loon, L., P. A. H. M. Bakker y C. M. J. Pieterse. 1998. **Systemic Resistance Induced by Rhizosphere Bacteria**. Annual Review of Phytopathology, 36: 453–483.

Van Loon, L. C. y E. A. Van Strien. 1999. **The families of pathogenesis related proteins**. Physiological and Molecular Plant Pathology, 55: 85–97.