



Dirección de Investigación

Subdirección de Programación y Evaluación

Proyecto de Investigación 2018

Unidad:	Saltillo	División:	Agronomía	Departamento:	Horticultura
Tema estratégico (ANA/PEP):					
Línea de investigación:	Producción Innovadora y sustentable de ornamentales frutillas y otras				
Título del proyecto:	Efecto de la estimulación de enzimas y estrés oxidativo inducido sobre la concentración de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga y antioxidantes en fresa cultivar "Albión"				
Presupuesto solicitado (Máximo \$75,000)	\$75,000.00	El proyecto es:	Nuevo	Continuación	<input checked="" type="checkbox"/>
Tipo de investigación:	Básica	<input checked="" type="checkbox"/>	Aplicada	<input type="checkbox"/>	Tecnológica
e-mail del responsable	jagf252001@gmail.com				
Vinculación:	Si	<input checked="" type="checkbox"/>	No	<input type="checkbox"/>	
Fondos concurrentes:	<input type="checkbox"/>				
Cooperante(s):	Productor de Fresa en Huachichil Coahuila				
Entidad (es):	Coahuila	Municipio (s):	Saltillo		
Localidades:	Saltillo-Huachichil				
A realizar durante el(los) año(s):	2018-2019				

Participantes		Adscripción (Clave Depto.)	Expediente No.	Firma
Responsable	Dr. José Antonio González Fuentes	Horticultura	3587	
Colaborador:				
Colaborador:	Dr. Rubén López	IAA	1195	
Colaborador:				
Colaborador:	Dra. Susana González Morales	Horticultura	100062	
Colaborador:				
		Grado por obtener	Matrícula	Firma
Tesista:	Jaime Andrés Vargas	Licenciatura		
Programa Docente:				
Tesista:				
Programa Docente:				
Tesista:				
Programa Docente:				

	Vo. Bo.	Autoriza
Firma y sello		
Nombre	Dr. Víctor Manuel Reyes Salas Jefe de Departamento	Dr. Armando Robledo Olivo Subdirector de Programación y Evaluación

• Cada Jefe de Departamento deberá dejar copia para su archivo

1.-Título del proyecto

Presupuesto solicitado:

Efecto de la estimulación de enzimas y estrés oxidativo inducido sobre la concentración de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga y antioxidantes en fresa cultivar “Albión”

\$ 75,000.00

(Setenta y cinco mil pesos)

2.- Introducción

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFAs por sus siglas en inglés) Omega 3, también conocidos como (n-3) son de gran interés para la salud humana ya que proveen protección contra enfermedades cardiovasculares, así como ayuda para un buen desarrollo del feto (Napier *et al.*, 2010; Saravanan *et al.*, 2010). Como el cuerpo humano sintetiza estos ácidos grasos en nula o poca cantidad la ingesta en dieta es necesaria (Naiper *et al.*, 2010). Los ácidos grasos con más utilidad para la salud, que brindan protección cardiovascular, son el ácido eicosapentaenoico (EPA; 20:5 Δ) y el ácido docosahexaenoico (DHA; 22:6 Δ) (Mozaffarian and Wu 2011), provenientes principalmente de aceite de pescados marinos (Ruiz-López *et al.*, 2014). Estos ácidos EPA y DHA en plantas se sintetizan en bajas cantidades a partir del ácido alfa linoleico (ALA; 18:3 Δ) como se muestra en la figura 1 (Ruiz-López *et al.*, 2014). ALA es también un ácido graso relacionado con beneficios cardiovasculares y a diferencia de EPA y DHA la fuente principal de este son los vegetales como semillas de soya, nueces, y aceite de canola (Pan *et al.*, 2012).

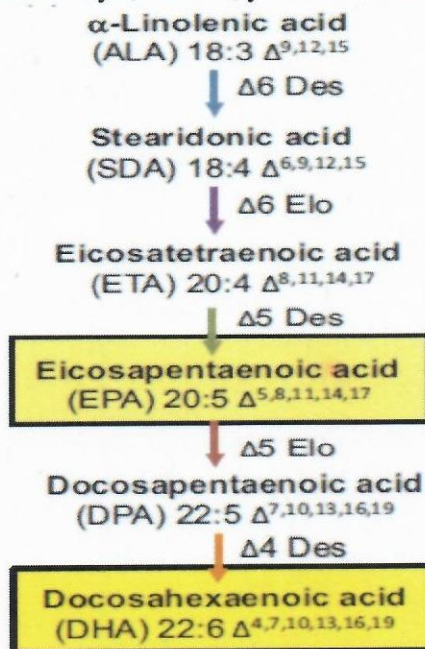


Figura 1. Biosíntesis de EPA y DHA en *Camelina sativa* (Tomado de Ruiz-López *et al.*, 2014)

El incremento en la demanda de EPA y DHA proveniente de peces marinos incrementa la presión de sobre-pesca situando en riesgo la fauna marina (Cressey, 2009). Aunado a esto y a la preocupación de contaminación del ambiente marino se ha intensificado la búsqueda de nuevas fuentes de Omega-3 (Tocher 2009). En este sentido ALA proveniente de fuentes vegetales se considera una alternativa más asequible (Pan *et al.*, 2012).

Una alternativa para incrementar ácidos grasos en plantas es por medio de estímulos inducidos pudiéndose acortar enormemente los tiempos de obtención. Estos estímulos inducidos se podrían aplicar en cultivos ya establecidos para aumentar su valor nutricional. Se ha demostrado que en algunas plantas como

el tomate y otros vegetales el contenido de ácidos grasos (ALA) en hojas se incrementa debido a la activación de genes de defensa, por medio de una vía de señalización intracelular, en respuesta a heridas mecánicas provocadas que simulan el ataque por herbívoros, similar a la respuesta cuando se usan estimuladores de genes de defensa como oligosacáridos y ácido acetil salicílico (Conconi *et al.*, 1996).

Por medio de estrés oxidativo inducido y controlado se ha demostrado que las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas, además de causar estrés oxidativo celular, también cumplen la función de señalización de estrés, así como segundos mensajeros en las sucesiones de transducción de señales en respuesta al estrés (Mittler 2002). Con el uso de promotores de oxidación controlada, inductores químicos o naturales que funcionan como señalizadores, así como con el uso de ácidos orgánicos, húmicos y fulvicos se ha reportado recientemente que es posible manipular los mecanismos de defensa de las plantas, los niveles de fitoquímicos específicos, de antioxidantes y de vitaminas (Lester, 2006; Dietrich *et al.*, 1999; Kocsy *et al.*, 2001; Benavides-Mendoza, 2002).

La figura 2 tomada de Ruiz-López *et al.*, 2014, ilustra que Acetil CoA derivado de azúcares provenientes de fotosintatos es el precursor de ácidos grasos en plantas. La enzima plastídica piruvato dehidrogenasa provee la mayoría del acetil CoA para la síntesis de ácidos grasos en hojas (Hardwood, 2005). Dos sistemas enzimáticos son usados para la formación 'de novo' de ácidos grasos en plantas, acetyl CoA-carboxilasa (Gurr *et al.*, 2002; Page *et al.*, 1994) y ácido graso sintasa (Hardwood, 1995; Hardwood, 2005). Estas enzimas producen los ácidos grasos saturados de cadena larga palmítico y esteárico siendo el ultimo 2 o 3 veces mayor que palmítico. Una vez sintetizados, estos ácidos grasos de cadena larga formaran ácidos grasos de cadena muy larga >18C como el ácido graso alfa linolénico (ALA; 18:3 Δ) por medio de desaturación (desaturasas), elongación (elongasas) y/o otras modificaciones.

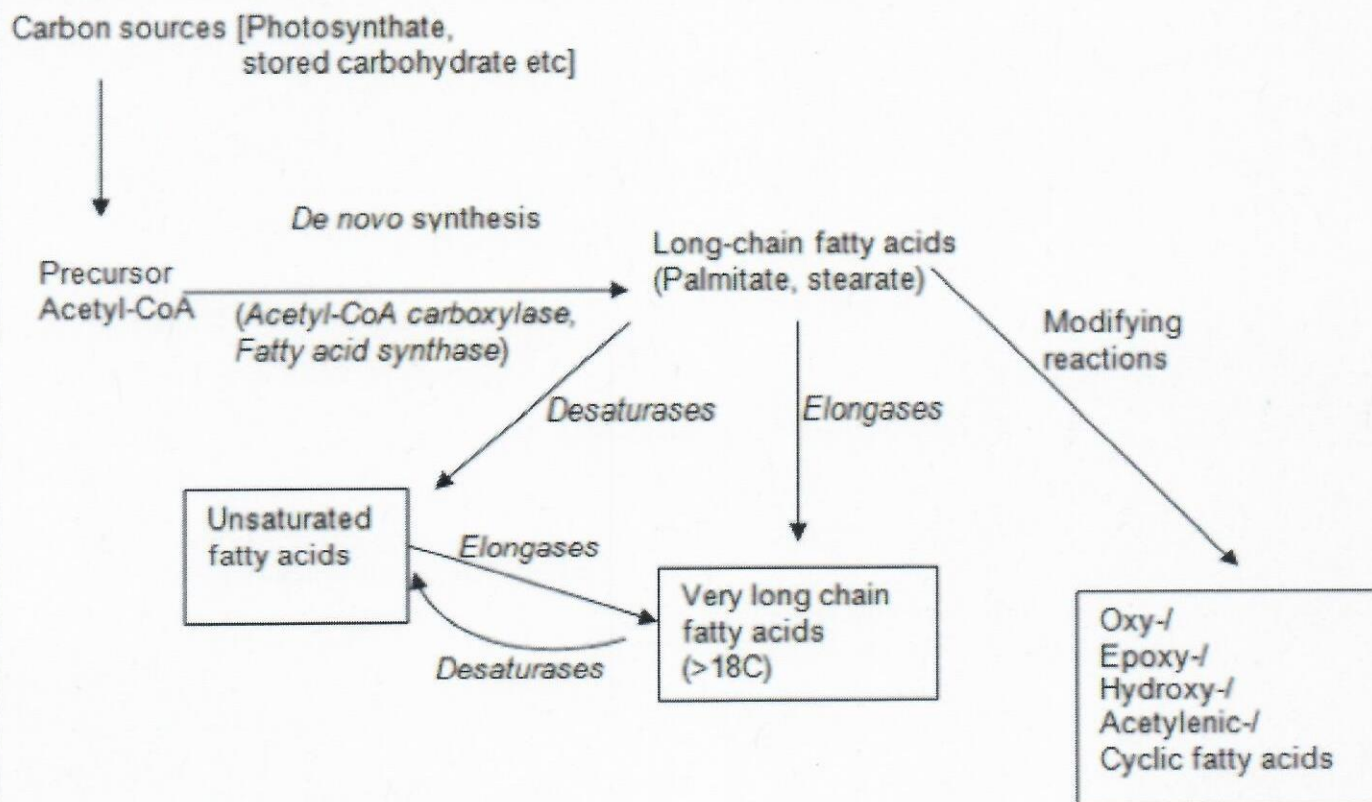


Figura 2. Síntesis de ácidos grasos en plantas (Tomado de Ruiz-López *et al.*, 2014)

De acuerdo a la figura 2 la expresión de la enzima adecuada $\Delta 6$ -desaturasa o elongasa con preferencia por ALA como sustrato, resultaría en niveles más altos de los ácidos grasos de interés (Naiper *et al.*, 2010)

los cuales trascenderían en mayor cantidad si la enzima Acetyl-CoA carboxilasa aumenta. Como la producción de omega-3 ya está presente en fresa, es muy posible que esta vía se pueda intensificar con estímulo de enzimas o estrés oxidativo inducido como se mencionó anteriormente para antioxidantes. Debido a esto en el presente estudio se propone un barrido de tratamientos (Tabla 2) en 2 vertientes. Una por medio de estrés oxidativo inducido controlado, otra por medio de activación de enzimas y sistemas de defensa de la planta.

Objetivos

- Determinar por medio de análisis de PCR si la actividad y cantidad de la enzima acetyl CoA carboxilasa aumenta.
- Estudiar la respuesta, a los tratamientos aplicados, en producción de ácidos grasos y antioxidantes en fresa.

Hipótesis

Al menos uno de los tratamientos inducirá un incremento de la enzima acetyl CoA carboxilasa y de ácidos grasos y/o antioxidantes en fresa cultivar Albión.

3.-Revisión de Literatura

La fruta de fresa es una de las más populares alrededor del mundo. Es un fruto agregado compuesto de un receptáculo agrandado con un alto número de achenios que son la fruta verdadera (Hancock, 1999). Además de su sabor, el alto valor nutritivo y fuente de antioxidantes, la fruta de fresa contiene hasta $780\mu\text{g/g}$ de ácido alfa linolenico (omega 3) en los achenios; de 450 a $100\mu\text{g}/100\text{g}$ de antocianinas y $567\mu\text{g/g}$ de ácido ascórbico (vitamina C) entre otros antioxidantes (Oregon Strawberry Commission, 2014). Por medio de ingeniería molecular se ha tratado de incrementar los contenidos de los ácidos grasos de interés (EPA y DHA) para la salud humana en vegetales a niveles similares a aquellos en peces, pero se ha comprobado que técnicamente es un gran reto (Ruiz-López *et al.*, 2014). En este sentido la modificación por medio de ingeniería genética no ha sido muy prometedora hasta ahora debido a que los niveles obtenidos en plantas transgénicas han sido relativamente bajos, $<5\%$ del total de ácidos grasos (Damunde y Kinney, 2008; Cheng, 2009). Además de que los productos genéticamente modificados requieren varios años en producirse y son costosos (Prado *et al.*, 2014), no son totalmente aceptados por una gran parte de la población a nivel mundial por los posibles riesgos que pudiesen presentar a la salud humana y al medio ambiente (Riechmann, 2004).

4.- Procedimiento Experimental

Material vegetal y arreglo experimental

El experimento en campo se llevó a cabo en un invernadero de producción comercial localizado en Huachicil Coahuila México, en el periodo del 5 de enero 2015 al 30 de marzo 2015. Plantas de fresa (*Fragaria x ananassa*) ya establecidas del cultivar Albión con número similar de coronas serán usadas para el experimento. Las plantas de fresa fueron cultivadas en bloques de fibra de coco como sustrato de crecimiento con dimensiones de 12 x 8 x 100 centímetros de ancho, alto y longitud respectivamente. La densidad de plantación fue de 5 plantas por bloque de fibra de coco.

Las plantas fueron expuestas a la misma solución nutritiva (Tabla 1) en un sistema abierto de acuerdo a la formulación comercial del productor, aplicada por medio de espaguete plástico con diámetro de 4 milímetros y longitud de 70 centímetros conectados a la tubería secundaria de distribución. La capacidad de emisión de los goteros fue de 2 litros por minuto y la frecuencia de riego cada 2 a 4 horas dependiendo del clima en el momento y con un tiempo de riego suficiente para lograr un volumen de drenaje del 15 al 25%.

Tabla 1. Composición de la solución nutritiva utilizada comercialmente por el productor para el cultivo de fresa cultivar Albión en fibra de coco cultivada bajo condiciones de invernadero. La concentración de macro elementos esta reportada en mili equivalentes por litro (Meq/L) y la de micro nutrientes en partes por millón (ppm)

Nutriente	Concentración
Nitrógeno	
NO ₃ -N (Meq/L)	5.5
NH ₄ -N	0
Fosforo H ₂ PO ₄	1
Azufre SO ₄	4.5
Potasio K	3.5
Calcio Ca	5.0
Magnesio Mg	2.5
	2.8
Hierro (ppm)	
Boro	0.6
Manganeso	0.04
Zinc	0.2
Cobre	0.1
Molibdeno	0.05
pH	5.5 – 6.0
Conductividad eléctrica (dS m)	~1.1

Doce tratamientos en forma de aspersión foliar con cuatro repeticiones (Tabla 2) fueron aplicados en un diseño completamente al azar dentro del invernadero. Cada repetición tuvo 5 plantas con un total de 20 por tratamiento y 240 plantas en total por todo el experimento con los 12 tratamientos. Se analizaron al menos 5 frutos por repetición en cuatro cosechas a lo largo del experimento. Los tratamientos vía aspersiones foliares se aplicaron cada 2 semanas por un tiempo de 2 meses.

La aplicación de tratamientos (Figura 3) inicio en plantas con suficiente número de inflorescencias en formación las cuales se etiquetaron antes de antesis para cosechar esos frutos tratados desde formación. La primer y tercer cosecha fue de frutos inmaduros y se realizó 48 horas después de la 3ra y 6ta aplicación de tratamientos ya que el máximo efecto de los estimulantes de enzimas como el ácido salicílico se encuentra en su máxima expresión en este periodo de tiempo después de una aplicación foliar (A. Benavides, comunicación personal).

La segunda y cuarta cosecha fue en frutos maduros después de la 3ra y 6ta aplicación de tratamientos. El experimento en campo finalizo después de un tiempo aproximado de 3 meses a partir del inicio de aplicación de tratamientos.

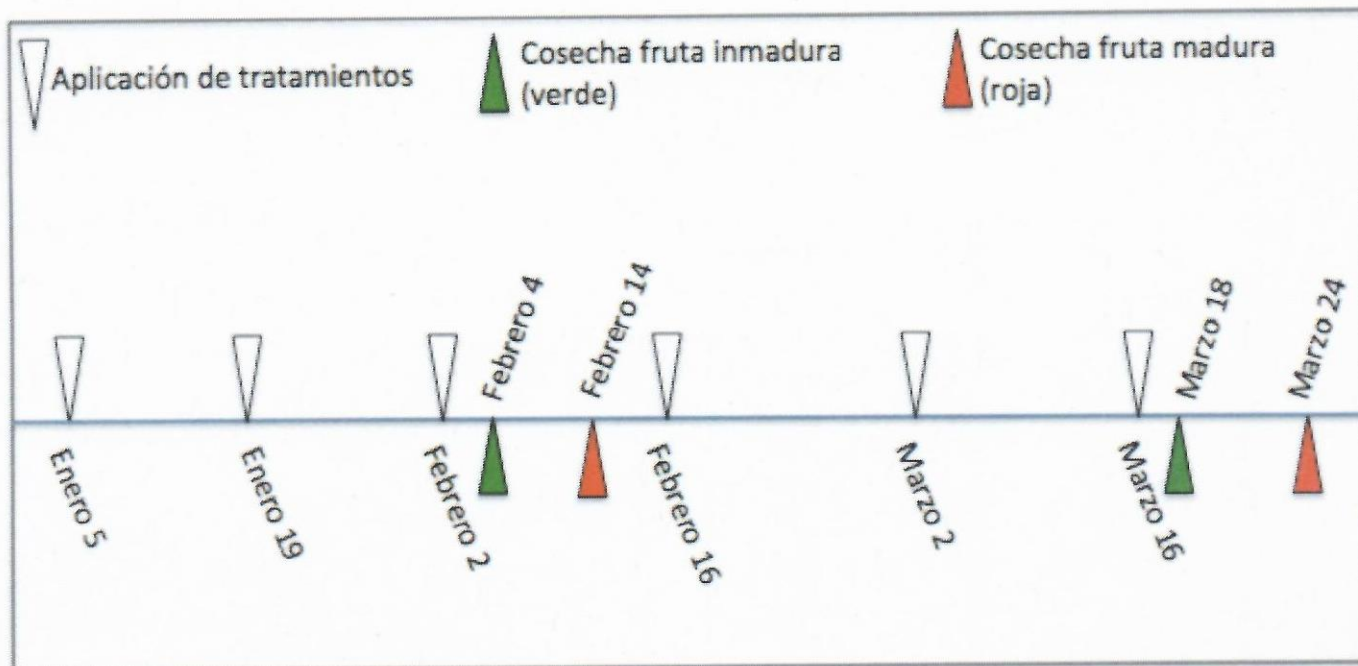


Figura 3. Aplicación de tratamientos (triángulo blanco), cosecha de fruta inmadura (triángulo verde) y madura (triángulo rojo) en plantas de fresa cultivar Albi3n tratadas con 12 diferentes inductores de estr3s y cultivadas en un sistema hidrop3nico abierto bajo condiciones de invernadero.

Cada cosecha de frutos, se realiz3 estrictamente usando guantes de nitrilo e inmediatamente despu3s de cosecha se tom3 el peso fresco. Una vez cosechadas las frutas fueron cortadas en 4 secciones y se colocaron en frascos de pl3stico perfectamente identificados y sellados para su inmediata congelaci3n en nitr3geno l3quido a -190°C . Posteriormente una vez finalizada la cosecha los frutos se trasladaron en una hielera con nitr3geno l3quido a un refrigerador con temperatura controlada a -80°C en el laboratorio de horticultura de la UAAAN para su posterior deshidrataci3n por liofilizaci3n y procesamiento de muestras.

Tabla 2. Tratamientos para estimular estr3s oxidativo y estimulo de enzimas en fresa cultivar Albi3n cultivadas bajo condiciones de invernadero

Tratamiento	Producto	Concentraci3n
Estr3s Oxidativo		
T1	Per3xido de Hidrogeno 50% (34.0147)	10 \cdot M
T2	Per3xido de Hidrogeno 50% (34.0147)	10 \cdot M
T3	Sulfato de Cobre (159.62)	10 \cdot M
T4	Acido glut3mico (Metab3lic)	2g/L M
T5	Sulfato de hierro (151.9)	10 \cdot M

T6	Sulfato de hierro (151.9)	10 ⁻⁴ M
Estimulo enzimático		
T7	Ácido salicílico (138.12)	10 ⁻⁴ M
T8	Ácido salicílico (138.12)	10 ⁻⁴ M
T9	Melaza	20 cm ³ L ⁻¹
T10	Ácidos húmicos y fúlvicos	20 cm ³ L ⁻¹
T11	Algas Marinas	15 cm ³ L ⁻¹
T12	Algas Marinas	30 cm ³ L ⁻¹

Mediciones ambientales

La temperatura y humedad relativa fueron monitoreadas cada 15 minutos por el tiempo del experimento con un datalogger modelo HR1 (HOBBO, inc.). La temperatura máxima del invernadero se ajustó a 28°C y la mínima a 14°C con un promedio de 21°C. La humedad relativa se ajustó entre rangos de 92 y 42 % como máxima y mínima respectivamente con un promedio de 67%. Con las lecturas obtenidas de temperatura y humedad relativa se calculará el déficit de presión de vapor (DPV) el cual debe variar de 0.2 a 2.2 kPa promediando alrededor de 0.72 kPa a lo largo del experimento.

Crecimiento vegetativo.

Evaluaciones de crecimiento vegetativo y fructificación incluirán número final de coronas por planta así como dimensiones finales de altura y ancho de cada planta.

Variables fisiológicas

Dentro de las variables fisiológicas se estudiará fotosíntesis neta y potencial hídrico del tallo. La fotosíntesis neta se evaluará con saturación de luz ($900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y concentraciones de CO_2 de referencia (CO_{2R}) de 50 a $2000 \mu\text{mol mol}^{-1}$ al final del experimento.

El potencial hídrico del tallo se midió a la 1:00 pm en hojas bajas cubiertas por follaje como lo describió Fulton *et al.* (2001) usando una cámara de presión (PMS Instrument company, Albany, OR)

Análisis de PCR

La expresión diferencial del gen de la enzima acetyl CoA carboxilasa se llevará a cabo extrayendo el ARN de las muestras liofilizadas de frutos inmaduros de fresa por medio de la metodología de Trizol (Tri-Reagent, Sigma), se realizará la cuantificación de la expresión mediante la técnica de PCR punto final con un análisis densitométrico (Software ImageJ) de las bandas obtenidas en la electroforesis. Los iniciadores específicos para amplificar el gen se diseñarán con el Software Primer-Blast, se utilizará el gen de actina como control endógeno (Oliveira *et al.*, 2008).

Contenido de ácidos grasos, antocianinas y vitamina C

Para el análisis del contenido de ácidos grasos, antocianinas y vitamina C se utilizará frutos de fresa liofilizados. La extracción de los ácidos grasos a partir de este fruto; así como la determinación de éstos por cromatografía de gases se realizarán de acuerdo a la metodología reportada por Vidrih, *et al.* (2009).

El contenido total de antocianinas se determinará a 520nm usando el método espectrofotométrico de

pH diferencial, se usará como estándar de referencia el pelarginidin-3-glucósido. Los resultados obtenidos se reportarán en miligramos de pelarginidin-3-glucósido contenidos en 100 gramos de peso fresco (Wrolstad *et al.*, 2005).

El método de extracción para la determinación de vitamina C y la cuantificación de este analito se realizará por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) siguiendo el procedimiento reportado por Quian *et al.* (2005).

Análisis estadístico

El experimento se llevó a cabo de acuerdo a un diseño completamente al azar con 4 repeticiones. Los datos se analizaron con ANOVA de una vía usando el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS versión 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Para la separación de medias se usó la prueba simultanea de Tukey, $p < 0.05\%$.

Cronograma de Actividades para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Proceso de muestras en laboratorio	X	X	X	X	X	X	X					
Análisis de datos								X	X			
Escritura de tesis								X	X	X	X	
Presentación de tesis												X
Preparación de manuscrito								X	X	X	X	X

Cronograma de distribución de presupuesto para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Análisis de Laboratorio	50%							50%				

Duración total del proyecto

Año de Inicio	2017	Año estimado de conclusión	2019
---------------	------	----------------------------	------

5.-Productos Esperados

- Dos tesis de licenciatura
- Un artículo científico

6.-Literatura Citada

- Benavides-Mendoza, A. (Compilador). 2002. *Ecofisiología y Bioquímica del Estrés en Plantas*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Horticultura, Buena Vista, Saltillo, Coah. Mexico. 287 paginas
- Cheng, B. 2009. Towards the production of high levels of eicosapentaenoic acid in transgenic plants: the effects of different host species, genes and promoters. *Transgenic Res.* In press DOI 10.1007/s11248-009-9302-z
- Damude, H.G., Kinney, A.J. 2008. Enhancing plant seed oils for human nutrition. *Plant Physiol.* 147, 962-968.
- Dietrich, R.A., K. Lawton, L. Friedrich, R. Cade, M. Willits, and K. Maleck. 1999. Induced plant defense

- responses: scientific and commercial development possibilities. *Novartis Found Symp.* 223, 205-216.
- Gunstone, F.D., Harwood, J.L., Dijkstra, A.J. 2007. (eds.) *The Lipid Handbook (Third Edition)* (Taylor & Francis, Boca Raton, FL).
- Gurr M.I., Harwood, J.L. and Frayn, K.N. 2002. *Lipid Biochemistry (Fifth Edition)* (Blackwells Publishing, Oxford).
- Harwood, J.L. Fatty acid biosynthesis. 2005. In: *Plant Lipids: biology, utilization and manipulation*, pp. 27-66 (D.J. Murphy (ed.), Blackwell Publishing, Oxford)
- Harwood, J.L. 1996. Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta*, 1301, 7-56.
- Kocsy, G., B. Toth, T. Berzy, G. Szalai, A. Jednakovits, G. Galiba. 2001. Glutathione reductase activity and chilling tolerance are induced by a hydroxylamine derivative BRX-156 in maize and soybean. *Plant Sci.* 160, 943-950.
- Lester, G.E. 2006. Environmental regulation of human health nutrients (ascorbic acid, β -carotene, and folic acid) in fruits and vegetables. *Hort Science* 41, 59-64.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7, 405-410.
- Mozaffarian, D. Wu, J.H. 2011. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *J Am Coll Cardiol* 58, 2047-2067.
- Oliveira Jordão do Amaral Daniel, Magalhães de Andrade Lima Marleide, Vilela Resende Luciane and Vanusa da Silva Márcia, 2008. Differential gene expression, induced by salicylic acid and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* infection, in tomato. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 43 (8): 1017-1023.
- Prado, J.R. Segers, G. Voelker, T. Carson, D. Dobert, R. Phillips, J. Cook, K. Cornejo, C. Monken, J. Grapes, L. Tracey, R. Martino-Catt, S. 2014. *Genetically Engineered Crops: From Idea to Product*. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65, 769-90.
- Page, R.A., Okada, S. and Harwood, J.L. 1994. Acetyl-CoA carboxylase exerts strong flux control over lipid synthesis in plants. *Biochim. Biophys. Acta*, 1210, 369-372.
- Quian, M., Finn, C., Schroeder J.M. 2005. Objective Flavor Comparison of Oregon Strawberries and those from other climatic condition. Progress report. 2004-2005. Oregon Strawberry Commission.
- Ruiz-Lopez, N., Halsam, P.R., Naiper, J.A., Sayanova, O. 2014. Successful high-level accumulation of fish oil omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in a transgenic oilseed crop. *The Plant Journal*. 77, 198-208
- Riechmann, J. 2004. Diferentes tipos de riesgo en la manipulación genética agroalimentaria. En: *Transgénicos el haz y el envés, una perspectiva crítica*. Ed. Catarata. España. pp. 90-98. ISBN: 84-8319-201-2.
- Vidrih, R., Filip, S., Hribar, J. 2009. Content of higher fatty acids in Green vegetables. *Czech J. Food Sci.* 27, S125-S129.
- Wrolstad, R.E., Durst, R.W., Lee, J. 2005. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science and Technology*, 16, 423-428.