Descripción: upaoSEGUNDA CONVOCATORIA

FONDO DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN (FAIN)

UPAO 2017

FORMATO 1

**FORMATO DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

SECCION A: DATOS GENERALES

1. Título o nombre del proyecto

Efecto del Sulfato de Esparteina sobre especies de *Meloidogyne* en condiciones de laboratorio e invernadero, Trujillo, Perú

2. Línea de investigación de la Facultad/Área

Control Biológico de Plagas y Enfermedades/ Productos Naturales

3. Unidad académica (Facultad/Escuela profesional/otra)

Departamento Académico de Ciencias

4. Equipo investigador

Investigador principal: Lezama Escobedo Karina

Co investigadores: Lezama Asencio Pedro, Hidalgo Rodríguez, Jose Manuel

Universidad Privada Antenor Orrego

Amaya de Guerra, Julia

Laboratorio de Sanidad Vegetal, Trujillo – Perú

Peraza-Padilla, Walter

Universidad Nacional Heredia, Costa Rica

Estudiante:

*Est. Cancino Padilla, Antonio Abdias (000167243)*

5. Institución y/o lugar donde se ejecutará el proyecto

Laboratorio de Biología y Bioquímica de la Universidad Privada Antenor Orrego

Laboratorio de Sanidad Vegetal, Trujillo, Perú

Laboratorio de Nematología, Escuela de Ciencias Agrarias, Universidad Heredia de Costa Rica

6. Duración (Fecha de Inicio y término)

Enero 2018 – Enero 2019.

SECCIÓN B: PLAN DE INVESTIGACIÓN

1. Planteamiento y formulación del problema

Los nematodos son especies cosmopolitas, afectando la seguridad alimentaria y produciendo una pérdida estimada de 80 mil millones de dólares anualmente (Nicol et al., 2011), y pérdidas económicas entre cercanas al 15 % en promedio (Guzmán et al., 2012), aunque probablemente mucho mayores en otras áreas porque depende también del tipo de cultivo, géneros o especies de los nematodos y las condiciones ambientales (Collange et al., 2012). Además, muchos de estos daños, estarían subestimados porque en la mayoría de casos, se desconoce los umbrales del nematodo que causan daño en los diversos cultivos en varias partes del mundo y la amenaza que estos representan para los mismos (Talavera, 2003).

En Perú, estos organismos ocasionan infestaciones severas en cultivos de la costa, cuyos suelos son propicios para la proliferación de estos organismos (Murga et al., 2012), especialmente en cultivos perennes como la vid, donde originan un daño insidioso (Murga, 2001), reduciendo la producción en diversos cultivos en regiones como Ica, Lima, Ancash y La Libertad (Mullin et al., 1991). Entre los nematodos más nocivos identificados en la región La Libertad, se encuentra el género Meloidogyne (Mullin et al., 1991), que constituye una de las principales plagas agrícolas en una gran variedad de cultivos anuales y perennes (Peraza et al., 2013).

Para poder cultivar exitosamente en terrenos infestados con nematodos, se utilizan frecuentemente plantas resistentes y compuestos químicos tóxicos (Collange et al., 2011). La resistencia ha sido vencida debido a la alta presión de selección, y la mayoría de nematicidas han sido progresivamente prohibidos o altamente restringidos a nivel mundial para proteger la estabilidad ambiental; sin embargo, pequeños y medianos agricultores continúan agregando al suelos estos productos tóxicos por su elevado poder residual al permanecer por décadas en las áreas de cultivo, teniendo incluso efectos nocivos para la salud humana

Por lo tanto, es imperioso el desarrollo de estrategias alternativas de control y una visión integradora para reemplazar a los nematicidas químicos (Martin, 2003), tal como el cuidado en la sanidad vegetal, manejo del suelo, enmiendas orgánicas, fertilización apropiada, control biológico, métodos basados en el calentamiento del suelo, uso de extractos vegetales y la búsqueda de compuestos y metabolitos con actividad nematicida que no representen toxicidad para el ambiente ni los seres vivos (Collange et al., 2012), lo cual se vienen ensayando como una alternativa viable para controlar nematodes sobre todo para el género *Meloidogyne* considerada de mayor impacto económico por su alta disminución de la productividad agrícola nivel mundial, pudiendo alcanzar el 60% en algunos cultivares de hortalizas (Alejo et al., 2006), para la que se está empleando aceites esenciales (Avato, et al. 2016), y extractos acuosos con actividad nematicida y nemastático (Mohd, et al. 2017), a fin de disminuir el uso de nematicidas sintéticos.

Por lo analizado anteriormente y teniendo una megadiversidad en nuestro país es necesario usar nuestros recursos vegetales y sus metabolitos ya caracterizados para solucionar estos problemas agrícolas, por lo cual se ha planteado el siguiente problema de investigación ¿Cuál es el efecto del Sulfato de Esparteína sobre especies de *Meloidogyne* en condiciones de laboratorio e invernadero, Trujillo, Perú?

2. Antecedentes

Los nemátodes son organismos que aunque afectan principalmente raíces puede atacar también tallo, frutos, semillas, privando al vegetal de los nutrientes indispensables para su desarrollo, ya sea de manera directa por la alimentación o de manera indirecta alterando funciones, promoviendo ingreso de otros microorganismos, alterando la estructura del vegetal (Van Megen y co*l*., 2009). Se les considera la principal plaga en los vegetales (Sikora y col., 2006) por las pérdidas en los cultivos provocadas a nivel mundial.

Todas las especies de nematodos fitoparásitos, genera interés científico por su influencia en el crecimiento deficiente de las plantas y la destrucción de cosechas, causando pérdidas anuales entre que oscilan alrededor del US$ 80 billones al año (Jones y col, 2013), dado que son parásitos biotroficos obligados, destacando en magnitud por el daño que ocasionan la familia Heteroderidae, con sus géneros *Meloidogyne, Globodera, Heterodera, Pratylenchus* por su versatilidad en atacar muchas plantas de interés económico, por lo que se debe integrar diversas estrategias de control (Ali, et al., 2017).

A fin de evitar contaminación ambiental y efectos nocivos de los nematicidas sintéticos, se está trabajando con extractos o productos vegetales, principalmente en el Africa, Asia y Europa, tal como el estudio del extracto etanólico de la corteza de la Especie *Terminalia chebula* de la Familia Combretaceae, eficaz como nematicida contra *Meloidogyne* spp., y el ácido 3,4 –dihudrobenzoico aislado de *Camellia sinensis*, *Hibiscus sabdariffa* L. y *Eucommia ulmoides*, efectivos contra *Meloidogyne incognita* (Dang-Minh-Chanh, et al. 2013).

Así mismo se ha realizado el análisis fitoquímico, ensayos nematicidas y efecto nemostático de extractos acuosos de *Ageratum conyzoides* y *Coccinia grandis* sobre larvas J2 y eclosión de huevos de *M. incognita* en condiciones in vitro, obteniendo una tasa de mortalidad de hasta 100% (Mohd, et. al., 2017).

Por otra parte, Avato et. al. (2016) han evaluado in vitro aceites esenciales obtenidos de ecotipos de *Artemisia herba-alba, Citrus sinensis, Rosmarinus officinalis y Thymus satureioides* contra las especies *M. incognita, Pratylenchus vulnus y Xiphinema index*, encontrando una mortalidad de alrededor del 94% de juveniles de *Meloidogyne*, 100% de mortalidad de hembras de *X. index*, y 75% de larvas de *P. vulnus*; demostrando con ello su potencial para formulación de nuevas formulaciones nematicidas.

Por lo tanto, el control de fitonematodes con compuestos en muchas plantas de ecosistemas naturales y agrícolas, constituye una alternativa de valor práctico y económico, y sobre todo sin riesgos de contaminación del ambiente, tal como se ha demostrado con extractos acuosos tanto in vitro como in vivo de malezas: *Conyza bonariensis*, *Senecio brasiliensis*, *Bidens pilosa*, *Amaranthus hybridus*, *Euphorbia heterophylla*, *Raphanus sativus*, *Ipomoea purpurea* y *Brachiaria plantaginea*, las aromáticas *Ruta graveolens* y *Aloysia triphylla*, y la oleaginosa *Brassica napus* aplicadas al suelo para el control de *Meloidogyne incognita*, con mayores porcentajes de mortalidad de J2 con los extractos de *Ruta graveolens*, *Conyza bonariensis*, y *Brassica napus*, incluso in vivo se redujo el número de nódulos en las raíces y observándose mayor crecimiento de plantas, por lo que representa un potencial como alterantiva económicamente viable y ecológicamente correcta para el manejo de *M. incognita* (Kunh, et al. 2016).

A fin de tener variabilidad en el uso de plantas, se ha evaluado también en laboratorio el extracto acuoso de hojas de las plantas medicinales *Curcuma longa*, *Origanum majorana*), *Mentha arvensis*, *Phyllanthus emblica* y *Jatropha curca*, contra eclosion de huevos de J2 de *Meloidogyne incognita*, demostrando que el extracto de *M. arvensis* redujo considerablemente la eclosion de huevos, seguido por *C.longa*, y la máxima mortalidad de juveniles de manera similar ambas especies, aunque todas las especies evaluadas mostraron algún grado de actividad nematicida; concluyendo que estas plantas pueden ser usadas como ingredientes de pesticidas, aunque es necesario determinar el principio activo exacto que muestra esta actividad (Neeraj, et. al., 2017)

Para nuestro país se tienen reportes que, en algunas comunidades de la sierra se emplean extractos acuosos de *Lupinus mutabilis* “tarwi” para eliminar insectos y ácaros (Jacobsen y Mujica, 2006). Para fitonematodes se ha reportado actividad nematicida de extracto acuoso de hojas de *Tagetes filifolia* (Lezama, et al. 2015): así mismo, se ha realizado una prueba piloto para determinar la actividad de extractos acuosos foliares de *Lupinus weberbaueri* y *L. paniculatus* sobre *Meloidogyne* sp., habiéndose encontrado actividad (Lezama, com. Pers.).

Los extractos de tarwi tienen entre sus componentes principales a los alcaloides quinolizidínicos, dentro de los cuales, en algunas accesiones, se encuentra la esparteína en cantidades elevadas, y este compuesto muestra actividad antibacteriana, pero dado su estructuración es probable que también presente efecto nematicida o nemastatico.

Para poder aplicar estrategias de manejo integrado, mejoramiento y cuarentena, es necesario tener una correcta y confiable identificación de los nematodos fitoparásitos; si embargo, no contamos con una base de datos actualizada, salvo trabajos de identificación en el Area de Chavimochic (Amaya, 2015), aunque urge también la identificación a nivel molecular de los diversos Géneros, pero específicamente, dado su importancia el de *Meloidogyne* para el que se tiene un solo reporte a nivel molecular que permitió la identificación de *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. hapla* mediante la técnica de PCR utilizando iniciadores específicos y comparadas con la identificación morfológica. en muestreos aislados y de diversos departamentos (Vera, 2014), aunque consideramos que esta debe ser exhaustiva para cada región, considerando que los microclimas son diferentes e influyen en le desarrollo de las especies.

3. Justificación (importancia, beneficiarios, resultados esperados).

El uso de pesticidas para el control de plagas y enfermedades y mejorar la producción agrícola en general está causan deterioro ambiental y la salud humana, puesto que no solo elimina a los agentes dañinos sino también a los insectos benéficos; y lo que es más se ha demostrado contaminación del agua y suelo; y efectos nocivos sobre la salud humana, no solo de quienes lo usan, sino también de quienes lo expenden puesto que tienen efecto acumulativo (OMS, 2002), sobre todo por el incremento en la concentración de radicales libres, que puede desencadenar efectos tan negativos como problemas cardiovasculares y ateroesclerosis, o incluso enfermedades autoinmunes como asma y diabetes, sobre todo en países en vías de desarrollo como el nuestro (Houck, et al, 2012): por lo que se viene promoviendo el uso de productos biológicos o derivados de ellos (ONU, 2002)

Considerando que *Meloidogyne* spp. son especies cosmopolitas y afectan a diversos cultivos en el mundo, los mismos que se siembran en la Región La Libertad y el Perú en general, constituye por su naturaleza un factor para una considerable disminución en la producción y calidad del producto porque tiene efectos tanto directos como indirectos; representando por lo tanto una limitación significativa para la agricultura de subsistencia de los valles de la costa de Perú, y zona andina

*Meloidogyne* es de difícil control, al que se suma la prohibición del uso de muchos nematicidas empleadas masivamente hasta la década pasada; por lo que urge la validación del uso adecuado de productos naturales y nativos de nuestro país, entre los cuales se encuentra el género *Lupinus* y entre sus componentes los alcaloides que acumula, con uno de sus principios activos, la esparteína que podría reducir la infestación la acción de este género de nematodos, comportándose sea como nemastatico o nematicida, sin ocasionar los efectos negativos de los compuestos utilizados tradicionalmente: beneficiando por lo tanto al ecosistema y a todos los involucrados en la comercialización, uso y manejo de nematicidas sintéticos.

Sin embargo, lo anterior pese a ser una alternativa de solución se ve dificultado por que no se conoce con toda certeza la especie y/o raza de *Meloidogyne* porque trabajos previos han demostrado que tenemos diversas especies en la Región La Libertad, cada uno con sus factores de virulencia y comportamiento diferentes y propios, por lo que es importante realizar su correcta identificación y con ello la solución planteada será más eficiente; y sobre todo permitirá conocer las especies de este fitonematode en la Región la Libertad y recomendar las medidas de control más adecuadas para un manejo integrado y oportuno.

4. Objetivos

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Objetivo General  (Propósito del proyecto ) | Resultados Finales | Medios de Verificación |
| Efecto del Sulfato de Esparteina sobre *Meloidogyne* spp. en condiciones de laboratorio e invernadero, Trujillo, Perú | Caracterizar el efecto nemastatico o nematicida del Sulfato de Esparteina sobre las especies identificadas de Meloidogyne | Informe Parcial  Informe Final |
| Objetivos Específicos  (Componentes) | Resultados Intermedios: | Medios de Verificación |
| Identificar las especies de Meloidogyne de la Región La Libertad empleando técnicas morfológicas, morfometricas y moleculares | Matrices de datos con características morfológicas, morfométricas y moleculares analizados | Cuadros de construcción de matrices |
| Determinar las concentraciones óptimas de esparteína y extracto acuoso de *Lupinus* in vitro e invernadero | Determinación de diluciones para calcular DE50 y DE50 | Resultados de las pruebas realizadas a diferentes concentraciones |

5. Marco teórico

Existen diversas medidas mecánicos, físicos, químicos y biológicos empleados para el control de nematodes, aunque no se ha logrado su erradicación, debido a una deficiencia en su identificación y conocimiento de su comportamiento; por lo cual se una tarea muy importante es la identificación de las especies para cada tipo de cultivar (Jones y col., 2013), sobre todo, conociendo que son los organismos con mayor distribución a nivel mundial, no importando clima ni geografía, y ocasionan pérdidas cuantiosas, que en promedio en países desarrollados se estima en 9% de pérdidas, y en los países en vías de desarrollo aproximadamente el 15% del total, pero lo paradójico es que tan solo el 0,2% de esa pérdida se destina a las investigaciones fitonematológicas (Nicol, y col, 2011).

*Meloidogyne* es considerado como la principal plaga en los diversos vegetales (Sikora et. al., 2006), dado su condición cosmopolita, habiéndose identificado 58 especies hasta febrero del 2013, que parasitan a casi todas las especies vasculares (Jones, y col. 2013), habiéndose reportado daños considerables en cultivos de importancia económica como café, algodón, tomate, cítricos y olivo (Alejo et al., 2006), afectando la economía en las diversas regiones en las que el daño es intensivo (Carrillo et al., 2000), constituyéndose también en una plaga de suma importancia en hortalizas tanto en invernadero como a campo abierto (Langlais y col., 2002); y se estima que sólo este género causa pérdidas entre el 24 y el 33% a nivel mundial (Netscher y col., 1999), y los estudios taxonómicos han permitido identificar cuatro especies más comunes *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood, *M. arenaria* (Neal) Chitwood y *M. javanica* (Treub) Chitwood y *M. hapla* (Karssen y col., 2006; Jones, y col. 2013). Pero, de ellas la de mayor impacto agrícola es *Meloidogyne incognita*, dado su ubicuidad, y capacidad para colonizar y atacar a cualquier tipo de especie vascular vegetal; así como su gran adaptación reproductiva, desde la postura de los huevos en una matriz protectora formando una masa sobre la superficie radicular que luego son embebidas en las agallas o tejido vegetal conteniendo hasta 1000 huevos. Después de la embriogénesis, el primer estadio juvenil (J1) muda dentro del huevo para convertirse en infectivo (J2) el cual sale del huevo y abandona la masa protectora, ya sea con estímulo o no por parte del vegetal; para luego penetrar al tejido vegetal empleando su estilete el mismo que causa daño mecánico pero se ayuda con enzimas proteolíticas y pectolíticas, ocasionando una serie de cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos en la planta destacando su presencia en el cilindro vascular de las plantas durante el proceso de alimentación la misma que es permanente y origina las denominadas células gigantes que luego se convierten en agallas o nódulos (Jones et al., 2013).

En el Perú contamos con muy pocos estudios realizados en la identificación de especies de nematodos, uno de los trabajos más completos fue realizado en 1983 y permitió conocer la biología, identificación y control de los nematodos de nódulo de la raíz (especies de Meloidogyne) y es en base a la literatura y la experiencia denominada International Meloidogyne Project o IMP, empleando hospederos diferenciales (Taylor y Sasser, 1983), técnica que casi no se usa actualmente; sino se prefiere técnicas moleculares del cua existe un solo trabajo que ha permitido la identificación de las principales especies de *Meloidogyne* en muestras colectadas en Lambayeque, Cajamarca, Piura, Lima, mediante técnicas moleculares de PCR (Vera, 2014), pero no se incluyó a La Libertad, por lo que amerita continuar con investigaciones de esta naturaleza.

La preocupación del hombre ha sido superar el efecto nocivo de plagas y enfermedades porque en algunos casos se observa daños colaterales como interacciones bioquímicas donde los nematodos proporcionan puntos de entrada para otros patógenos, a lo que se deben principalmente los daños que sufren las plantas; tales como el ingreso de los hongos *Fusarium*, *Rhizoctonia solani* y *Thielaviopsis bassicola* (Talavera, 2003).

Con el fin de controlar el efecto de los nematodes se ha recurrido a la búsqueda de resistencia en las plantas y el uso de nematicidas, aunque han sido superadas por la elevada presión de selección ejercida por las plantas resistentes, manteniéndose fundamentalmente como un reto (Auberto et al., 2006), sumado al efecto negativo de los nematicidas, tenemos la imperiosa necesidad de desarrollar estrategias de control alternativas y una visión integral a largo plazo para reemplazar los nematicidas químicos (Collange et al., 2010).

Por otro lado, contamos con una flora muy vasta que son reservorios de un gran número de metabolitos secundarios, cales como alcaloides, flavonoides, fenoles y otros, que cumplen mecanismos de defensa para plagas y enfermedades, habiéndose investigado un número considerable de plantas con actividades nematicidas, por lo que la aplicación adecuado de los extractos le conferiría protección a las plantas (Mukhtar *et al*., 2013), y mucho más viable identificar y probar el uso de sus metabolitos secundarios naturales que poseen propiedades nematicidas. Para ello, no son recientes la propuesta del uso de estos extractos a pruebas que buscan potenciales candidatos, tal como el uso de Lantanosida y Lantatona para combatir *Meloidogyne*. (Alejo et al., 2006): lo cual podemos ser pioneros por la megadiversidad de la flora de Perú y de manera particular el uso de alcaloides de especies del género *Lupinus* que cuanta con alrededor de 100 especies debidamente reconocidas y poco o nada se conocen sobre la actividad de sus componentes o propiedades.

Dado la importancia económica, hay diversos estudios sobre actividades nematicida de plantas sosbre *Meloidogyne incognita*, tal comoel uso de 3,4-dihydroxybenzoic acid (3,4-DHBA) obtenido a partir de lal corteza de *Terminalia nigrovenulosa* que inhibió la eclosión de huevos y desarrollo de las larvas J2, y sobre todo esta molécula es inocua para el ecosistema por que son convertidas a compuestos menos tóxicos por la luz, el oxígeno y las bacterias, y sus efectos residuales son mucho menores, por lo que afectan también muy poco a la salud humana, y se ha logrado identificar isotiocianatos, tiofenoles, glucosidos, alcaloids, compuestos fenólicos,tianinas y ácidos grasos que pueden ser evaluados buscando otras aplicaciones en beneficio del ser humano (Dang-Minh-Chanh, et al. 2013).

Así mismo del extracto acuoso de Ageratum conyzoides se han aislado alcaloides, taninos, fenoles, saponinas, glicosidos, flavonoides, carbohidratos, proteinas,mucilago/goma, terpenoides y taninos que mostraron máxima inhibición de eclosión de huevos y mortalidad de los juveniles de *Meloidogyne incognita*; pero es preciso evaluar su actividad de cada una a fin de saber su mecanismo de acción específica, sus interacciones y probables antagonismos (Mohd, et al. 2017); en este conocimiento se sustenta nuestra propuesta, dado que el género *Lupinus* producen dichos componentes.

Mientras tanto, en estudios in vitro de aceites esenciales obtenidos de Artemisia herba-alba, Citrus sinensis, Rosmarinus officinalis y Thymus satureioides, se sospecha que toda la mezcla de cada planta actúan de manera sinérgica, ya que cada uno no tiene los efectos anteriores, y la formulación de nematicidas a partir de ellas puede ser económicamente relevantes porque no tienen efectos residuales, para lo cual es necesario una estandarización adecuada considerando sus propiedades físicas y químicas (Avato, et. al., 2016), pudiendo inclusive desarrollar formulaciones en micro o nano cápsulas a fin de asegurar su liberación controlada y reducir la degradación de los aceites esenciales (Martin, et. al., 2010)

6. Hipótesis

El Sulfato muestra acción nematicida sobre las especies de *Meloidogyne* en condiciones de laboratorio e invernadero

**7. Metodología (Diseño experimental en detalle)**

**Material biológico**

Se emplearán con semillas de *Lupinus weberbaueri* colectadas de la sierra de Áncash y La Libertad, y semillas de *Lupinus mutabilis* pertenecientes a la colección de germoplasma del Programa de Investigación y Proyección Social en Cereales y Granos Nativos provistas por el Dr. Jorge Jiménez Dávalos (UNALM).

El sulfato de esparteína pentahidratado (C15H38N2O9S) será adquirido del Instituto de Química Orgánica de la Universidad de Viena, Alemania.

Los nematodes del género *Meloidogyne* serán colectadas en cultivos de costa y sierra de La Libertad y Ancash

**Colorantes para nematodes**

Fucsina ácida

Fenol líquido

Ácido láctico

Floxine B

**Tamices y placas**

Para obtención de larvas 100 mesh/inch

Para obtención de huevos de 500 mesh/inch

Reactivos

* Sulfato de Esparteina
* Metanol
* Etanol absoluto
* Sulfato de amonio
* Acatato de potasio
* Alcohol isoamilico
* Isopropanol
* Bromuro de Etidio
* Glicerina
* Glutaraldehido
* Kit de extracción de DNA
* Primers
* Taq polimerasa
* Patrones de Meloidogyne
* Marcadores de peso molecular
* Buffer para Taq polimerasa
* Buffer de lisis
* Buffer CTAB 1X
* Buffer CTAB 2X
* Buffer Tris
* Buffer EDTA
* Enzimas de restricción Alu I, Hindf I
* Gel de agarosa
* TBE 1X
* Gel Biotin 3X
* Esterasa
* Malato deshidrogenasa
* Orseina propionica
* Fenol
* Cloroformo
* Bicloruro de Magenesio
* Formol
* Agral
* Tetraoxido de osmio
* Macetas
* Mallas para invernadero
* Vermiculita
* B mercaptoetanol
* Placas para cromatografía
* Tubos de ensayi
* Tubos de eppendorf 1 mL graduado
* Tubos de eppendorf 2 mL graduado

**Identificación de especies de *Meloidogyne***

Se emplearán las larvas J2 obtenidas de las plantas colectadas, para lo que se emplearán datos morfológicos y morfometricos empleando un microscopio con cámara y medidas, comparándolos con patrones ya establecidos

Aislado de nematodes

Serán obtenidos de las masas de huevos y mantenidas en invernadero en plantas de tomate *Solanum lycopersicum*

**Estudios Biometricos**

Los estudios morfológicos y morfométricos se efectuarán en larvas J2 y hembras adultas, estas últimas rcuperadas de las larvas.

A las hembras adultas se les identificará empleando los patrones perinerales, siguiendo las técnicas ya estandarizadas por el IMP (Taylor & Sasser, 1983), y los estudios biométricos de acuerdo a los parámetros sugeridos por Eisenback & Hunt (2009)

**Microscopía electrónico**

Las larvas J2 y machos, y estiletes de machos y hembras serán preparadas empleando recubrimiento de oro de acuerdo a lo planteado por Eisenback and Triantaphyllou (1991).

**Estudios Moleculares**

**Se extraerá el** DNA a partir de las larvas J2  **.**usando los Kits de extracción. Serán conservadas a – 80 ₀C hasta su utilización para amplificación por PCR, y para los estudios de diversidad se emplearán técnicas RAPD e ISSR acorde al protocolo de la Universidad Nacional de Costa Rica. Así mismo se prepararán las muestras para ser enviadas a secuenciación a los laboratorios especializados.

**Extractos de semillas de *Lupinus***

Las semillas serán secadas hasta peso constante en estufa a 40°C (aproximadamente 24 h), las que luego serán molidas y para eliminar las grasas se empleará cloroformo en un equipo Soxhlet hasta lograr transparencia en el disolvente. La pasta obtenida será colocada en la estufa hasta peso constante, las mismas que serán conservadas en frascos herméticos hasta su extracción. Para ello, se colocarán 100 g de harina en 500 mL de metanol y/o agua con agitación continua por 7 dias a temperatura ambiente para luego concentrarlo por evaporación en un rotavapor que será considerado la solución patrón, a partir del cual se harán las diluciones.

**Perfiles de alcaloides**

A partir del extracto concentrado se realizará la extracción, purificación y se correrán los perfiles de alcaloides, siguiendo el protocolo de Muzquiz et. al., 1993 .

**Preparación del inóculo de nematodos**

A partir de las masas de huevos de *Meloidogyne* de las especies vegetales, se obtendrá el inóculo para su desarrollo en plantas de tomate en el invernadero (Taylor & Sasser 1983); esperando la formación de agallas, de las cuales se obtendrán los huevos y larvas J2.

**Actividad nematicida in vitro del extracto crudo de *Lupinus***

A partir del extracto crudo de *Lupinus* se harán las diluciones correspondientes de acuerdo a lo obtenido en la solución patrón; al que se colocarán por separado 100 huevos y 100 larvas en placas petri, las que serán mantenidas a temperatura ambiente para su evaluación cada 12 h/72 h

**Actividad nematicida invitro del Sulfato de Esparteína**

El Sulfato de Esparteína será disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO) y diluido con agua hasta alcanzar una concentración final de 5 mmol. Se colocarán por separado en placas Petri 100 huevos y 100 individuos J2 en la suspensión y se incubará a temperatura ambiente evaluando cada 12 h/72 h la eclosión de los huevos y tasa de mortalidad de las larvas

**Controles**

Se planteará los mismos ensayos para huevos y larvas; pero para el control positivo se empleará Furadán (Carbofuran 750 CE), y para los negativos agua destilada esteril, y otro con una mezcla de solvente (DMSO-agua, 0,5%) y agua destilada estéril (100%)

Cada experimento tendrá cuatro repeticiones, empleando lo propuesto por Cristobal-Alejo et al., 2006, utilizando un diseño completamente al azar

Con los datos anteriores se podrá calcular la concentración efectiva mínima, la misma que será evaluada con una análisis de varianza seguido de la comparación multiple de Tukey con p 0,05

**Determinación de la actividad nematicida en condiciones de invernadero**

Se sembrarán 100 semillas de tomate, una vez germinadas se seleccionarán las más homogéneas para trasplantarlos a macetas empleando como sustrato una mezcla de vermiculita – arena en proporciones iguales. Establecido el cultivo, serán infestadas con los huevos de *Meloidogyne*, aproximadamente 1000/maceta, y otras con 1000 J2/maceta. En ellas se aplicarán los mismos tratamientos que in vitro y con 4 repeticiones, empleando un diseño experimental completamente aleatorizado

La evaluación de infestación se hará en base a los nódulos formados siguiendo las normas internacionales ya estandarizadas

8. Bibliografía

Ali, M. Azeem, F., Abbas, A., Joyia, F., Li, H. y Addelfattah, A. 2017. Transgenic Strategies for Enhancement of Nematode Resistance in Plants. Frontier inPlant Science. 8(750): 1-13

Avato, P., Laquale, S., Argentieri, M., Lamiri, A., Radicci, V. y D’Addabbo. 2016. Nematicidal activity of essential oils from aromatic plants of Morocco. J. Pest Sci. Springer. DOI 10.1007/s10340-016-0805-0

Collange, B., Navarrete, M., Peyre, G., Mateille, T., Tchamitchian, M.2011. Root-knot nematode (Meloidogyne) management in vegetable crop production: the challenge of an agronomic system analysis. Crop Protection 30(10): 1251 – 1262

Cristóbal-Alejo, J., J., Tun-Suárez, J.N., Moguel-Catzín, S., Marbán-Mendoza, N., Medina-Baizabal, L., Simá-Polanco, P. et. al. 006. In vitro sensitivity of *Meloidogyne incognita* to extracts from native Yucatecan plants. Nematropica 36:89-97.

Dang-Minh-Chanh, N., Dong-Jun, S., Kil-Yong, K., Ro-Dong, P., Dong-Hyun, K., Kim, et al. 2013. Nematicidal activity of 3,4-dihydroxybenzoic acid purified from Terminalia nigrovenulosa bark against Meloidogyne incognita. Microbial Pathogenesis. 59-60: 52 -59

Eisenback, J. D., & Hunt, D. J. .2009. General morphology. In R. Perry, M. Moens, & J. L. Starr (Eds.), Root-knot Nematodes (pp. 18–54). Cambridge: CABI North America Ofice.

Eisenback, J. D., & Triantaphyllou, H. H. 1991. Root-knot nematode: Meloidogyne spp. and races. In W. R. Nickle (Ed.), Manual of agricultural nematology (pp. 191–274). New York: Marcel Dekker

Jacobsen S. y Mujica A. 2006. El tarwi (Lupinus mutabilis Sweet.) y sus parientes silvestres. Botánica Económica de los Andes Centrales. Editores: Moraes M., Øllgaard B., Kvist L., Borchsenius F. & Balslev H. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz: 458-482.

Jones; J.; Haegeman, A.; Danchin, E.; Gaur, H.; Helder, J.; Holder, J., et al. 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes Rev. In Molecular Plant Pathology. BSSPP and J. Wiley & Sons Ltd. 1-16

Houck, J.; De Felipe, I. & Briz, J. 2012. Comercio Exterior Agrario. Fundamentos y análisis. 4ta ed. Mundi-Prensa. España. 368 pp

Karssen G, Moens M. *Root-knot nematodes. En: Perry R, Moens M, editors. Plant nematology. CABI, UK; 2006. p. 59-90.*

Kuhn, P.R. Belle, C., Reinehr, M., y Kulczynski, S.M. 2015. Extratos aquosos de plantas daninhas, aromáticas e oleaginosa no controle de *meloidogyne incognita* Nematropica. 45(2): 150 -157

Langlais C., Ryckewaert P.2002. Guía de los cultivos protegidos de hortalizas en la zona tropical húmeda. CIRAD. Guadaloupe; 2002. p. 90.

Lezama, M.K., Lezama, P., Amaya, J. 2015. Actividad biológica del extracto acuoso foliar de Tagetes filifolia sobre Meloidogyne sp. ECI 2015 Resumenes

Martin, F.N., 2003. Development of alternative strategies for management of soilborne pathogens currently controlled with methyl bromide. Annu. Rev. Phytopathol. 41: 325-350

Martin A , Varona, S., Navarrete, A., y Cocero M.J 2010. Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: applications with essential oils. Open Chem Eng J 4:31–41

Modh, A., Tariq, M., Khan, A. y Siddiqui, A.M, 2017. Biocidal and Antinemic Properties of Aqueous Extracts of *Ageratum* and *Coccinia* Against Root-Knot Nematode, *Meloidogyne Incognita In Vitro.* The Journal of Agric. Sci. 12(2): 108 – 122

Mukhtar, T., Kayani, M.Z. and Hussain, M.A. 2013. Nematicidal activities of *Cannabis sativa* L. and *Zanthoxylum alatum* Roxb. Against *Meloidogyne incognita*. *Ind Crop Prod*. 42:447- 457. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.06.027>

Mullin B. A., Abawi G., Pastor-Corrales, M. A. and Kornegay J. 1991. Root-knot nematodes associated with beans in Colombia and Peru and related yield loss. Plant Dis. 75:1208-1211.

Murga, S. 2007. Nematodos Fitoparásitos asociados al cultivo de *Tagetes erecta*  en el Distrito Virú, La Libertad. Perú. Neotropical Helminthology. Vol. I, N° I p. 15-20.

Murga-Gutierrez, S., Colagiero, M., Rosso, L.C., Finetti, M.M., y Ciancio, A. 2012. . Root-knot nematodes from Asparagus and associated biological antagonists in Peru. Nematropica Vol. 42(1): 57 -62

Muzquiz M., Burbano C., Cuadrado, C., De la Cuadra, C. 1993. Determinacion de factores antinutritivos termorresistentes en leguminosas I: Alcaloides. Inv. Agraria. Prod. Prot. Veg. 8: 351-361.

Neeraj, S.R. Goel, A., Gurpreet, S., y Madan, V.K. 2017. Effect of Plant Extracts on Hatching and Mortality of Root-Knot Nematode, *Meloidogyne incognita* Larvae (*in-vitro*)Biosci., Biotech. Res. Asia, Vol. 14(1), 467-471

Netscher C, Sikora RA. Nematodes parasites of vegetables. 1990. In: Luc M, Sikora RA, Bridge J, Editors. Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. CAB International. Institute of Parasitology. UK:237-283.

Nicol, J.M., Turner, S.J., Coyne, D.L., den Nijs, L., Hockland, S. y Maaﬁ, Z.T. .2011. Current nematode threats to world agriculture. *In*: Genomics and Molecular Genetics of Plant–Nematode Interactions (Jones, J.T., Gheysen, G. and Fenoll, C., eds), pp. 21–44. Heidelberg: Springer.

OMS. 2002. Estrategia de la OMS sobre Medicina Tradicional 2002 – 2005. WHO/EDM/TRM. 2002.1 Ginebra. 1-77 pp

Óscar Adrián Guzmán Piedrahita, O.A., Castaño Zapata, J., Villegas Estrada, B. 2012. Principales nematodos fitoparásitos y síntomas ocasionados en cultivos de importancia económica. Agron. 20 (1): 38-50.

Peraza-Padilla, W., Rosales-Flores, J., Esquivel-Hernández,A., Hilje-Rodríguez, I., Molina-Bravo,R., Castillo-Castillo, P. 2013. Identificación morfológica, morfométrica y molecular de *Meloidogyne incognita* en higuera (*Ficus carica* l.) en Costa Rica. Agronomía mesoamericana 24(2):337-346

Sikora, R.A., Fernández E. 2006. Nematode of vegetable. En: Luc M, Sikora RA, Bridge J, editors. Plant parasitic nematodes in Subtropical and tropical agriculture. 2da Edición. CABI, UK; 2006. p. 319-392.

Talavera. R. M. 2003. Manual de Nematología Agrícola. Introducción al análisis y al control nematológico para agricultores y técnicos de agrupaciones de defensa vegetal. Instituto de formación Agraria y Pesquera. Brasil. 23. p.

Taylor, A. y Sasser, J. 1983. Biología, identificación y control de los nematodos de nódulo de la raíz (Especies de Meloidogyne). Proyecto Internacional de Meloidogyne. Departamento de Fitopatología de la Universidad del Estado de Carolina del Norte y La Agencia de Estados Unidos para el Desarrollo Internacional.

Vera, N. 2014. Técnica molecular de PCR para identificar las principales especies de Meloidogyne spp. En poblaciones provenientes de Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. Disponible en: <http://dspace.concytec.gob.pe/handle/concytec/70>

**SECCIÓN C: CRONOGRAMA DE INVESTIGACIÓN**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Actividad** | | **Meses** | | | | | | | | | | | |
| **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **7** | **8** | **9** | **10** | **11** | **12** |
| **1** | Investigación bibliográfica y planificación | x | x | x |  |  | x |  |  |  | x | x | x |
| **2** | Colección de semillas de Lupinus y agallas de Meloidogyne |  | x |  | x |  | x |  | x |  | x | x |  |
| **3** | Preparación de semillas de Lupinus y obtención de masas de huevos y larvas de Meloidogyne |  |  | x |  | x |  | x | x |  |  |  |  |
| **4** | Identificacion de nematodes por morfometria y molecular |  |  | x |  | x |  | x | x |  | x | x |  |
| **5** | Experimentos para determinar actividad de extracto crudo de Lupinus y Esparteina in vitro |  |  | x | x | x | x | x | x | x | x |  |  |
| **6** | Experimentos para determinar actividad de extracto crudo de Lupinus y Esparteina en invernadero |  |  | x | x | x | x | x | x | x | x |  |  |
| **7** | Análisisis de datos |  |  |  | x | x | x | x | x | x | x | X |  |
| **8** | Informe ParciaI |  |  |  |  |  |  | X |  |  |  |  |  |
| **9** | Informe Final |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | x |

**SECCIÓN D: PRESUPUESTO DEL PROYECTO**

|  |  |
| --- | --- |
| **Partida presupuestaria** | **Monto (S/.)** |
| 1. Equipos y bienes duraderos | ---- |
| 1. Recursos humanos (hasta un 20% del presupuesto) | ---- |
| 1. Materiales e insumos | 14 400 |
| 1. Pasajes y viáticos | 5 600 |
| 1. Servicios tecnológicos | --- |
| **TOTAL** | 20 000 |

**CUADRO N° 1: Equipos y bienes duraderos (adjuntar proformas)**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Equipos y bienes duraderos | Especificaciones técnicas | Proforma (fecha) | Costo unitario | Cantidad | Costo total S/ |
|  |  |  |  |  |  |

**CUADRO N° 2: Recursos Humanos – Valorización del equipo técnico**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Equipos y bienes duraderos | Especificaciones técnicas | Proforma (fecha) | Costo unitario | Cantidad | Costo total S/ |
|  |  |  |  |  |  |

**CUADRO N° 3. Material e insumos**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Descripción** | **Costo Unitario** | **Cantidad** | **Costo total (S/)** |
| **CEPAS PATRON** |  |  |  |
| Especies de Meloidogyne  REACTIVOS  Sulfato de Esparteina 76466-100MG  Metanol 34860-6X1L-R  Etanol absoluto  Sulfato de amonio  Acetato de potasio P1190-500G  Alcohol isoamilico  Isopropanol  Bromuro de Etidio  Glicerina  Glutaraldehido G5882-50ML  Agarosa  Kit de extracción de DNA  Primers  Taq polimerasa  DNA Ladder D0428-1VL  TEMED  Buffer CTAB  Buffer Tris (diversos)  Enzimas de restricción Alu I, Hindf I  Agarosa  Tetraoxido de osmio | 200  400  600  600  320  320  280  280  300  300  450  600  300  200  500  500  200  600  200  200  500  1000 | 5 unid  8 unid/100 g  kit 6X1L-R  1 Lt  500 g  500 g  1 Kg  1 Kg  5 g  500 g  50 mL  1 kit  1 Kit  6 unid  250 UN  D0428-1VL  50 mL  10 g  500 mL/4  5  50 g  250 mg | 1000  3200  450  400  300  300  250  250  300  300  450  600  300  1200  500  500  200  600  800  1000  500  1000 |
|  |  |  |  |

**CUADRO N° 4. Pasajes y Viáticos**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Descripción** | **Costo Unitario** | **Cantidad** | **Costo total (S/)** |
| Pasaje  Viáticos | 360/viaje ida y vuelta  65 | 4 personas  4 personas/16 días | 1440.00  4160.00 |

**CUADRO N° 5. Servicios Tecnológicos**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Descripción | Costo Unitario | Cantidad | Costo total (S/) |
| **Análisis especializado** |  |  |  |
| **Software** |  |  |  |

**FORMATO 2**

**DECLARACION JURADA DE COMPROMISO Y AUTENTICIDAD DEL PROYECTO**

**(SOLO PARA EL INVESTIGADOR PRINCIPAL)**

Trujillo 30 de setiembre del 2,017

**Señor Doctor**

**Luis Cerna Bazán**

**Vicerrector de Investigación**

**Presente.-**

De mi consideración:

El suscrito docente de la Facultad de Ciencias de la Salud, Departamento Académico de Ciencias identificado con DNI N° 42240249 y domicilio en Ortega y Gasset 343, Urb. La Noria DECLARO BAJO JURAMENTO mi compromiso de participar como Investigador Principal y **responsable** del proyecto de investigación titulado: Efecto del Sulfatoo de Esparteina sobre especies de Meloidogyme en condiciones de laboratorio e invernadero, Trujillo, Perú.; el cual es **ORIGINAL Y AUTENTICO** y está enmarcado en las áreas académicas y líneas de investigación priorizadas por la Universidad Privada Antenor Orrego (UPAO).

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente,

---------------------------------------------------- (FIRMA)

NOMBRES Y APELLIDOS DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL

DNI N° 42240249

DOCENTE