

CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO

Informe Científico¹

PERIODO ²: 2013-2014

Legajo N°:

1. DATOS PERSONALES

APELLIDO: Estrella

NOMBRES: María Julia

Dirección Particular: Calle: N°:

Localidad: Chascomús CP: 7130 Tel:

Dirección electrónica (donde desea recibir información): estrella@intech.gov.ar

2. TEMA DE INVESTIGACION

1-Simbiosis rizobio-leguminosa. Factores involucrados en su establecimiento y desarrollo bajo diversas condiciones ambientales

2- Aspectos biotecnológicos aplicados a bacterias solubilizadoras de fosfato para incrementar la productividad de suelos agrícola-ganaderos de la Pampa Deprimida del Salado

3-Variabilidad genética entre rizobios simbioses de *L. tenuis* mediada por la transferencia horizontal de una isla simbiótica.

3. DATOS RELATIVOS A INGRESO Y PROMOCIONES EN LA CARRERA

INGRESO: Categoría: Asistente Fecha: 1/04/2006

ACTUAL: Categoría: Adjunto desde fecha: 1/04/2011

4. INSTITUCION DONDE DESARROLLA LA TAREA

Universidad y/o Centro: IIB-INTECH sede Chascomús

Facultad: -

Departamento: -

Cátedra: Laboratorio de Microbiología del Suelo

Otros: -

Dirección: Calle: Av. Intendente Marino N°: Km: 8,2

Localidad: Chascomús CP: 7130 Tel: 02241-430323

Cargo que ocupa: Investigador Adjunto

5. DIRECTOR DE TRABAJOS. (En el caso que corresponda)

¹ Art. 11; Inc. "e"; Ley 9688 (Carrera del Investigador Científico y Tecnológico).

² El informe deberá referenciar a años calendarios completos. Ej.: en el año 2008 deberá informar sobre la actividad del período 1°-01-2006 al 31-12-2007, para las presentaciones bianuales.

Apellido y Nombres: -

Dirección Particular: Calle: Nº:

Localidad: CP: Tel:

Dirección electrónica:

.....

.....

Firma del Director (si corresponde)

Firma del Investigador

6. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO.

Debe exponerse, en no más de una página, la orientación impuesta a los trabajos, técnicas y métodos empleados, principales resultados obtenidos y dificultades encontradas en el plano científico y material. Si corresponde, explicita la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.

En el tema de trabajo "Simbiosis rizobio-leguminosa. Factores involucrados en su establecimiento y desarrollo bajo diversas condiciones ambientales", se continuó con el estudio de los mecanismos involucrados en la tolerancia a estreses abióticos de los rizobios simbiotes de *L. tenuis* tolerantes a salinidad y/o alcalinidad. En este estudio se continuó con la caracterización de mutantes de rizobios tolerantes a NaCl, obtenidas por mutagénesis al azar, mediante conjugación con una cepa de *E. coli* portadora de un transposón miniTn5. Se obtuvieron así 8 transposantes sensibles a salinidad. Se evaluó la capacidad fijadora de nitrógeno de dichas mutantes en ensayos de nodulación con *L. tenuis*, y se observó que dos de las 8 mutantes eran incapaces de nodular mientras que el resto nodulaban y fijaban nitrógeno de manera similar a la cepa tipo salvaje. Posteriormente se utilizaron distintas estrategias moleculares (Tail PCR, PCR inversa y clonado de regiones de ADN genómico flanqueante al transposón miniTn5) para poder identificar en dichas mutantes los genes bacterianos donde se insertó el minitransposón. Con estas aproximaciones experimentales se apuntó a determinar las funciones que estarían involucradas en la tolerancia a este tipo de estrés abiótico. De todas las estrategias utilizadas la más efectiva fue la PCR inversa, con la que se logró identificar el gen que codifica para la proteína DnaK. Estudios realizados en otras bacterias revelaron que DnaK participa junto con DNAJ, una chaperona molecular sensible al shock térmico, en el plegado de proteínas, direccionamiento de proteínas a la membrana, y la renaturalización de proteínas después del estrés (de Crouy-Chanel et al., 1997). En *Bradyrhizobium japonicum*, DnaJ también se comporta como proteína sensible al shock térmico y parece importante para el crecimiento a temperaturas supraóptimas (Minder et al. 1997). Por otro lado, análisis transcripcionales en rizobios simbiotes de garbanzo permitieron detectar que bajo condiciones de estrés salino, la mayoría de los aislamientos estudiados presentaban un incremento en la expresión del gen que codifica para la DnaK (Brígido, Alexandre, and Oliveira, 2012), constituyendo así uno de los pocos estudios en los cuales se identificó anteriormente a DnaK como partícipe de estos mecanismos de tolerancia a estrés salino en rizobios. Cabe destacar que en este tema participaron estudiantes de grado que realizaron su trabajo de tesis bajo mi dirección y la de la Dra Sannazzaro.

A pesar de haber podido identificar un gen relacionado con la tolerancia a salinidad, sabemos que los mecanismos de adaptación a condiciones de estrés son complejos e involucran a más de un gen, de ahí que en el marco de un proyecto aprobado y que cuenta con financiación (PICT2013-0963), titulado "Adaptación de rizobios y bacterias solubilizadoras de fosfato a condiciones salino-alcálinas para el desarrollo de biofertilizantes eficientes para *L. tenuis* e identificación de genes bacterianos implicados

en la tolerancia a dicha condición", en el que me desempeñé como directora, se continuará con estos estudios. Se prevee utilizar nuevas estrategias de selección y adaptación para ampliar la colección de bacterias solubilizadoras de fosfato y rizobios a distintos tipos de estrés abiótico a partir de las cuales se realizarán nuevos experimentos de mutagénesis para poder identificar una mayor cantidad de genes involucrados en la tolerancia a salinidad y también a alcalinidad. Este proyecto cuenta con la participación de un becario doctoral CONICET, que bajo mi dirección realizará su tesis doctoral.

Parte de estos estudios se presentaron en el II Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental, Asociación Argentina de Microbiología, en Buenos Aires, en Septiembre de 2013.

En el tema "Aspectos biotecnológicos aplicados a bacterias solubilizadoras de fosfato para incrementar la productividad de suelos agrícola-ganaderos de la Pampa Deprimida del Salado" se seleccionó la cepa *P. eucalypti* M91 (procedente de una colección de aislamientos del laboratorio, previamente caracterizados (Castagno et al., 2011) para realizar ensayos de inoculación de *L. tenuis* a campo, en presencia de distintas fuentes de fósforo (roca fosfática, superfosfato triple, sin fosfato). Con los resultados de estos estudios se publicó un trabajo en la revista internacional *Plant Soil* (2014) 385:357–371, titulado "Growth, nutrient uptake and symbiosis with rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi in *Lotus tenuis* plants fertilized with different phosphate sources and inoculated with the phosphate-solubilizing bacterium *Pantoea eucalypti* M91" donde participé como autora de correspondencia.

Con este microorganismo también se abordaron estudios más básicos tendientes a establecer cuáles son los tejidos colonizados al interactuar con la planta y con otras bacterias beneficiosas como los rizobios. En este estudio estuve a cargo de la dirección del grupo de trabajo que llevó a cabo marcaciones estables en el genoma, de la bacteria solubilizadora de fosfato M91 con genes fluorescentes, y de una cepa de *Mesorhizobium* spp eficiente para fijar nitrógeno en simbiosis con *L. tenuis*. Este trabajo fue presentado y premiado en el "2do Taller sobre rizobacterias promotoras del desarrollo vegetal en La Falda, Córdoba, en septiembre del 2014.

También participé de un trabajo realizado en colaboración con el laboratorio del Dr Ruiz para evaluar el efecto de la inoculación de la cepa *P. eucalypti* M91 sobre los mecanismos de captación de Fe en la planta modelo *L. japonicus*. Actualmente se está terminando de redactar un manuscrito para enviar a una revista internacional.

En el tema "Variabilidad genética entre rizobios simbiotes de *L. tenuis* mediada por la transferencia horizontal de una isla simbiótica", uno de los primeros objetivos propuestos apunta a determinar la presencia de la isla en una colección de simbiotes de *L. tenuis*, aislados de suelos de la Pampa Deprimida del Salado. Para ello se utilizaron cebadores específicos que permitieran amplificar por PCR un fragmento del extremo de la isla (P4-like integrase) y la región adyacente al mismo, donde se integra esta isla generalmente (Phe-tRNA). También se realizaron amplificaciones de genes *nodC* y *nifH*. Estos productos de PCR se enviaron a secuenciar y actualmente siendo analizados.

En este período también estuve a cargo de la dirección de la tesis de grado de una estudiante de la Carrera de Lic. en Química Ambiental de la UNLP. Parte del trabajo realizado se presentó en un congreso bajo el título de: el Uso del glifosato para promoción de *Lotus tenuis* en la región de la Pampa Deprimida del Salado. en el V

Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental SETAC Argentina, en Octubre de 2014. Este trabajo recibió el primer premio a la comunicación oral.

Por último cabe agregar que en este período también participé como responsable técnica de un convenio de Investigación y desarrollo firmado entre la Fundación IIB del IIB-INTECH y la empresa de biofertilizantes Fragaría SA.

7. TRABAJOS DE INVESTIGACION REALIZADOS O PUBLICADOS EN ESTE PERIODO.

7.1 PUBLICACIONES. *Debe hacer referencia exclusivamente a aquellas publicaciones en las que haya hecho explícita mención de su calidad de Investigador de la CIC (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Toda publicación donde no figure dicha mención no debe ser adjuntada porque no será tomada en consideración. A cada publicación, asignarle un número e indicar el nombre de los autores en el mismo orden que figuran en ella, lugar donde fue publicada, volumen, página y año. A continuación, transcribir el resumen (abstract) tal como aparece en la publicación. La copia en papel de cada publicación se presentará por separado. Para cada publicación, el investigador deberá, además, aclarar el tipo o grado de participación que le cupo en el desarrollo del trabajo y, para aquellas en las que considere que ha hecho una contribución de importancia, deberá escribir una breve justificación.*

1-L.N.Castagno, I García, A.I.Sannazzaro, M Bailleres, R Mendoza, O Ruiz and M.J.Estrella..Growth, nutrient uptake and symbiosis with rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi in Lotus tenuis plants fertilized with different phosphate sources and inoculated with the phosphate-solubilizing bacterium Pantoea eucalypti M91. Plant Soil (2014) 385:357–371.

Abstract

Background and aims The aim of this work was to evaluate the ability of P fertilization and phosphatesolubilizingbacteria (PSB) inoculation to promote the growth of L. tenuis in typical soils of the Salado RiverBasin (Argentina) with low P availability.Methods Aboveground biomass and P and N levelswere evaluated in field-grown L. tenuis plants inoculatedwith Pantoea eucalypti M91, either without fertilizationor in combination with phosphate rock and triplesuperphosphate (TSP). The impact of P fertilization andinoculation on the symbiotic interactions between L. tenuis and native rhizobia bacteria and arbuscular mycorrhizalungi was also evaluated.Results Inoculation with M91 increased the L. tenuisbiomass production and P concentration in shoots, at aearly stage of plant growth. The combined treatment ofinoculation with M91 and TSP significantly increasedthe P and N content in shoots compared to noninoculatedplants, fertilized or not. P. eucalypti M91was found to endophytically colonize roots and leavesof L. tenuis plants grown in vitro and also under fieldconditions.Conclusions The results suggesting that inoculation ofL. tenuis with the PSB such as P. eucalypti M91 strainmight allow more efficient use of N and P and a moresustainable option for grasslands producers from theSalado River Basin, in order to reduce costs and avoidincreased levels of P insoluble in soils.

En este trabajo participé como autora de correspondencia, en la redacción el manuscrito y en la dirección del trabajo experimental.

7.2 TRABAJOS EN PRENSA Y/O ACEPTADOS PARA SU PUBLICACIÓN. *Debe hacer referencia exclusivamente a aquellos trabajos en los que haya hecho explícita mención de su calidad de Investigador de la CIC (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Todo trabajo donde no figure dicha mención no debe ser adjuntado porque no será tomado en consideración. A cada trabajo, asignarle un número e indicar el nombre de los autores en el mismo orden en que figurarán en la publicación y el lugar donde será publicado. A continuación, transcribir el resumen (abstract) tal como aparecerá en la publicación. La versión completa de cada trabajo se presentará en papel, por separado, juntamente con la constancia de aceptación. En cada trabajo, el investigador deberá aclarar el tipo o grado de participación que le cupo en el desarrollo del mismo y, para aquellos en los que considere que ha hecho una contribución de importancia, deberá escribir una breve justificación.*

7.3 TRABAJOS ENVIADOS Y AUN NO ACEPTADOS PARA SU PUBLICACION. *Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo, indicando el lugar al que han sido enviados. Adjuntar copia de los manuscritos.*

7.4 TRABAJOS TERMINADOS Y AUN NO ENVIADOS PARA SU PUBLICACION. *Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo.*

A P-solubilizing bacteria, *Pantoea eucalypti* M91 activates the Fe machinery of *Lotus japonicus* ecotype Gifu cultivated in alkaline soils.

Campestre, MP; Castagno, LN, Estrella MJ y Ruiz, OA.

ABSTRACT

Inoculation assays with the plant growth promoting bacteria (PGPB), *P. eucalypti* M91, were performed over an alkaline sensitive ecotype of *L. japonicus* specie (Gifu). This ecotype acquired less total iron when grown in alkaline conditions, developing internerval chlorosis due to a lower mobilization of the soluble Fe to the stems, resulting in an Fe accumulation in plant roots. The inoculation with this strain, capable of producing siderophores in alkaline conditions, cooperated in the alteration of the root pattern, acquiring a herringbone one, which proves to be more efficient in the exploration of great soils volume. An improvement was observed in iron transport from roots to stems with a concomitant increase in the efficiency of the Photosystem II (PSII) parameters. FRO1 and IRT1 expression showed an increment when alkaline treated plants were inoculated with the *Pantoea* strain. FRO1 increased expression was accompanied by an increase in FRO enzyme activity.

Este trabajo se realizó en colaboración entre el grupo del Dr Oscar Ruiz .

7.5 COMUNICACIONES. *Incluir únicamente un listado y acompañar copia en papel de cada una. (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores).*

(2013)

-*Pantoea eucalypti* M91 favorece la adquisición de hierro y mejora la performance de *Lotus japonicus*, ecotipo Gifu, bajo condiciones de estrés alcalino Campestre, M. P; Castagno, L. N.; Estrella, M. J. y Ruiz, O. A. Reunión Latinoamericana de Rizobiología, .2 al 6 de Septiembre 2013, Sevilla, España.

- Efecto del contenido de taninos condensados (TC) sobre la formación de nódulos en especies del género *Lotus*. Escaray, F.J., Estrella, J., Ruiz, O.A. Reunión Latinoamericana de Rizobiología, .2 al 6 de Septiembre 2013, Sevilla, España.

- Variación en el comportamiento en vida libre y en simbiosis de mutantes de rizobios, sensibles a salinidad que interaccionan con *Lotus tenuis*. Villa Alejandro, Castagno Nazareno, Sannazzaro Analía, Estrella María Julia. II Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental, Asociación Argentina de Microbiología, Buenos Aires, Argentina, 13 a 26 de Septiembre.
- Menendez AB, Rocco R, Babuin F, Campestre P, Escaray F, Antonelli C, Bordenave C, Pieckenstain FL, Estrella MJ, Bilenca D, Ruiz OA. V Reunión Binacional de Ecología, XX Reunión de la Sociedad de Ecología de Chile. Puerto Varas, 3 al 6 de noviembre de 2013
- Efecto del glifosato sobre la simbiosis Rhizobium- *Lotus tenuis* en la región de la Pampa Deprimida del Salado . Represa S, Sannazzaro A, Castagno NL, Fontana F, Uchiya P, Bailleres M, Pistorio M, Estrella MJ. XV Jornadas anuales de la Sociedad Argentina de Biología, Chascomús, del 4 al 6 de diciembre. (2014)
- *Pantoea eucalypti* M91: Here, there and everywhere. Castagno LN, Sannazzaro AI, Cumpa Velásquez LM, Pieckenstain FL, Estrella MJ. "2do Taller sobre rizobacterias promotoras del desarrollo vegetal. LA Falda, Córdoba, 21 al 26 de septiembre.
- Uso del glifosato para promoción de *Lotus tenuis* en la región de la Pampa Deprimida del Salado. Efectos en la simbiosis Rhizobium- *Lotus tenuis*. Soledad Natacha Represa, María Dagorret, Analía Sannazzaro, Nazareno Castagno, Florencia Fontana, Patricia Uchiya, Matías Bailleres, Mariano Pistorio, María Julia Estrella. V Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental SETAC Argentina, 22 al 25 de Octubre .
- Regulación diferencial del metabolismo del Fe en ecotipos tolerantes y sensibles de la especie *Lotus japonicus* cultivadas en condiciones de estrés alcalino. Campestre, MP; Castagno, LN, Estrella MJ y Ruiz, OA. XXX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, Mar del Plata, 21 al 24 de septiembre.

7.6 INFORMES Y MEMORIAS TÉCNICAS. *Incluir un listado y acompañar copia en papel de cada uno o referencia de la labor y del lugar de consulta cuando corresponda.*

8. TRABAJOS DE DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS.

8.1 DESARROLLOS TECNOLÓGICOS. *Describir la naturaleza de la innovación o mejora alcanzada, si se trata de una innovación a nivel regional, nacional o internacional, con qué financiamiento se ha realizado, su utilización potencial o actual por parte de empresas u otras entidades, incidencia en el mercado y niveles de facturación del respectivo producto o servicio y toda otra información conducente a demostrar la relevancia de la tecnología desarrollada.*

8.2 PATENTES O EQUIVALENTES. *Indicar los datos del registro, si han sido vendidos o licenciados los derechos y todo otro dato que permita evaluar su relevancia.*

8.3 PROYECTOS POTENCIALMENTE TRANSFERIBLES, NO CONCLUIDOS Y QUE ESTAN EN DESARROLLO. *Describir objetivos perseguidos, breve reseña de la labor realizada y grado de avance. Detallar instituciones, empresas y/o organismos solicitantes.*

Convenio de Investigación y desarrollo entre la empresa Fragaría SA y la Fundación IIB del IIB-INTECH. El objetivo es aislar y caracterizar bacterias del suelo con potencial interés para el desarrollo de bioformulados para el cultivo de soja. El trabajo está en desarrollo. En este convenio participo como responsable técnica.

8.4 OTRAS ACTIVIDADES TECNOLÓGICAS CUYOS RESULTADOS NO SEAN PUBLICABLES (desarrollo de equipamientos, montajes de laboratorios, etc.).

8.5 Sugiera nombres (e informe las direcciones) de las personas de la actividad privada y/o pública que conocen su trabajo y que pueden opinar sobre la relevancia y el impacto económico y/o social de la/s tecnología/s desarrollada/s.

Liliana Haim : lilyhaim@gmail.com, Oficina de BioEmprendedores y Transferencia del IIB-INTECH.

Mariano Pistorio: pistorio@biol.unlp.edu.ar Investigador de IBBM, UNLP

Edgadro Jofré: ejofre@exa.unrc.edu.ar, Investigador de UNRC

9. SERVICIOS TECNOLÓGICOS. Indicar qué tipo de servicios ha realizado, el grado de complejidad de los mismos, qué porcentaje aproximado de su tiempo le demandan y los montos de facturación.

10. PUBLICACIONES Y DESARROLLOS EN:

10.1 DOCENCIA

10.2 DIVULGACIÓN

Aporte de material relacionado con la temática del grupo de laboratorio en el espacio "Bacterias, tu mundo interior", realizado en Tecnópolis 2014. Se proporcionó material de divulgación y plantas inoculadas con rizobios durante toda la duración de la exposición (8 al 11/2014).

11. DIRECCION DE BECARIOS Y/O INVESTIGADORES. Indicar nombres de los dirigidos, Instituciones de dependencia, temas de investigación y períodos.

1-Co-dirección de beca Post- Doctoral CONICET de Dr Nazareno Castagno . 2012-2014

2-- Co-dirección de beca Post- Doctoral CONICET de Dr Francisco Escaray. 2012-2014

3- Dirección beca doctoral CONICET de la Lic. Florencia Fontana 2014- actualmente

4- Dirección beca doctoral CONICET de la Lic. Liz Cumpa Velazquez -2014-actualmente

5- Co- Directora del la Dra Analía Sannazzaro, Investigadora Aisistente CONICET 2008-2014

12. DIRECCION DE TESIS. Indicar nombres de los dirigidos y temas desarrollados y aclarar si las tesis son de maestría o de doctorado y si están en ejecución o han sido defendidas; en este último caso citar fecha.

1-Dirección de Tesis de grado de la estudiante Soledad Represa 2013-2014

Año de defensa:2014

Calificación : sobresaliente

2- Co dirección Tesis de grado de la estudiante Florencia Fontana 2014-2015

Año de defensa: 2015

Calificación. sobresaliente

3- Co dirección Tesis de grado de la estudiante Liz Cumpa Velazquez 2014-2015

Año de defensa: 2015

4- Dirección de Tesis de grado del estudiante Alejandro Villa. 2014/actualmente

5- Co dirección Tesis Doctoral del Ing Agrónomo Matías Bailleres, 2014- actualmente

13. PARTICIPACION EN REUNIONES CIENTIFICAS. *Indicar la denominación, lugar y fecha de realización, tipo de participación que le cupo, títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas y autores de los mismos.*

Asistencia a II Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental, Asociación Argentina de Microbiología, Buenos Aires, Argentina, 13 a 26 de Septiembre de 2013. Presentación de trabajo dirigido por mi, titulado: Variación en el comportamiento en vida libre y en simbiosis de mutantes de rizobios, sensibles a salinidad que interaccionan con *Lotus tenuis*. Villa Alejandro, Castagno Nazareno, Sannazzaro Analía, Estrella María Julia.

- Asistencia a IV Jornadas Bonaerenses de Microbiología de Suelos, para una Agricultura Sustentable, Mar del Plata, 6 y 7 de Marzo de 2014. Co-autora de comunicación oral .

La rizosfera del *Lotus* sp y su importancia en el desarrollo sustentable de la pampa Deprimida del Salado. Antecedentes y perspectivas. Estrella, M. J., Sannazzaro, AI, Castagno, L. N., Paz, RC, Echeverría M, Babuin, MF, Campestre, M. P, Nieva, SA, Calzadilla, P, Mendoza R, Pieckenstain, F, Menendez, A, Sanjuán, J, Sansberro, P, Escaray F; y Ruiz, O. A.

-Asistencia al "2do Taller sobre rizobacterias promotoras del desarrollo vegetal. LA Falda, Córdoba, 21 al 26 de septiembre de 2014 y presentación del trabajo dirigido por mi, titulado: *Pantoea eucalypti* M91: Here, there and everywhere. Castagno LN, Sannazzaro AI, Cumpa Velásquez LM, Pieckenstain FL, Estrella MJ.

14. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC. *Señalar características del curso o motivo del viaje, período, instituciones visitadas, etc.*

15. SUBSIDIOS RECIBIDOS EN EL PERIODO. *Indicar institución otorgante, fines de los mismos y montos recibidos.*

2014- Directora responsable de Subsidio Puente de Investigación y desarrollo, otorgado por la Universidad Nacional General San Martín por un período de 1 año. Monto recibido: 15.000 pesos

2014/2017- directora responsable de Subsidio PICT-2013-0963, de Investigación y Desarrollo, otorgado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y tecnológica, por un período de 3 años. Monto. 197.000 pesos.

16. OTRAS FUENTES DE FINANCIAMIENTO. *Describir la naturaleza de los contratos con empresas y/o organismos públicos.*

Convenio de Investigación y Desarrollo entre la Fundación IIB (Fundación del IIB-INTECH) y la Empresa Fragaría.

17. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO.

2014- Premio a la comunicación oral de trabajo presentado en el V Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental SETAC Argentina, 22 al 25 de Octubre

2014- Premio Mención a la comunicación de trabajo presentado en el "2do Taller sobre rizobacterias promotoras del desarrollo vegetal. La Falda, Córdoba, 21 al 26 de septiembre.

- 18. ACTUACION EN ORGANISMOS DE PLANEAMIENTO, PROMOCION O EJECUCION CIENTIFICA Y TECNOLÓGICA.** *Indicar las principales gestiones realizadas durante el período y porcentaje aproximado de su tiempo que ha utilizado.*
- 19. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO.** *Indicar el porcentaje aproximado de su tiempo que le han demandado.*
2013-2014- Profesor Adjunto de la materia Microbiología de la carrera Tecnicatura Universitaria de Laboratorio y profesor Adjunto a cargo de la materia Microbiología Agrícola de la carrera de Ingeniería en Agrobiotecnología, ambas de la Universidad Nacional de San Martín, dictada en el IIB-INTECH, sede Chascomús. Porcentaje de carga horaria demandante: (15%).
- 20. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES.** *Bajo este punto se indicará todo lo que se considere de interés para la evaluación de la tarea cumplida en el período.*
- 21. TITULO Y PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PROXIMO PERIODO.** *Desarrollar en no más de 3 páginas. Si corresponde, explicita la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.*

Se continuará con el tema "Variabilidad genética entre rizobios simbiotes de *L. tenuis* mediada por la transferencia horizontal de una isla simbiótica".

Paralelamente se ampliarán los estudios ya realizados en relación a la tolerancia de los rizobios simbiotes de *L. tenuis*, focalizándose en aquellos que estén adaptados a condiciones salino-alcálinas. También se extenderán estos estudios a otras bacterias promotoras del crecimiento como las solubilizadoras de fosfato. Esta temática además de tener gran relevancia para la provincia de Buenos Aires, se enmarca en un proyecto aprobado y financiado recientemente por la Agencia Nacional de promoción Científica y Tecnológica, en el que participo como Directora responsable.

Título del proyecto: Adaptación de rizobios y bacterias solubilizadoras de fosfato a condiciones salino-alcálinas para el desarrollo de biofertilizantes eficientes para *L. tenuis* e identificación de genes bacterianos implicados en la tolerancia a dicha condición"

En la Pampa Deprimida del Salado (Prov. de Buenos Aires), el aumento de la superficie sembrada con cereales y oleaginosas, ha limitado la producción de forraje para la ganadería a zonas restrictivas para el crecimiento vegetal como los bajos salino-alcálinos. Una alternativa para mejorar la calidad de las pasturas es la incorporación de especies forrajeras como *Lotus tenuis*, una leguminosa originaria de la Cuenca del Mediterráneo, adaptada a las condiciones restrictivas de esos suelos (Escaray et al., 2012). El rendimiento y la calidad de *L. tenuis* en dicha región puede incrementarse mediante la interacción con microorganismos beneficiosos como bacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfato, que promueven el crecimiento vegetal mediante el aporte de nutrientes esenciales. Su aplicación como biofertilizante, no siempre resulta en un aumento significativo de la producción vegetal. La falta de respuesta a la inoculación muchas veces se relaciona con la escasa adaptación de los microorganismos a condiciones salinas e hiperosmóticas (Miller et al., 1996). La eficiencia de los inoculantes puede afectarse por poblaciones nativas de este tipo de bacterias, generalmente menos eficientes pero que compiten con el biofertilizante porque están adaptadas a las condiciones del suelo y se encuentran en una alta

concentración (Thies et al., 1991). En ese sentido tanto la adaptación a las condiciones ambientales como la competitividad en el suelo donde van a ser aplicadas, son factores importantes a tener en cuenta para mantener una alta viabilidad de las bacterias que se utilizan como biofertilizantes y para lograr una rápida y eficiente colonización de las raíces de las plantas inoculadas, especialmente en ambientes restrictivos. La adaptación de los rizobios a condiciones salinas involucra varios procesos fisiológicos y bioquímicos (Dominguez et al., 2009). Algunas especies se adaptan a dichas condiciones mediante acumulación o biosíntesis intracelular de solutos orgánicos de bajo peso molecular como glutamato, trealosa, glicina-betaína y también por acumulación de K⁺ (Gardan et al, 2003) mientras que en otras, la inducción de genes de función desconocida en respuesta a condiciones de hiperosmolaridad sugieren la existencia de mecanismos de osmoadaptación aún no explorados (Djordjevic et al., 2002). Modificaciones de polisacáridos extracelulares y lipopolisacáridos de superficie en rizobios en respuesta a salinidad pueden afectar la colonización de la raíz, y formación e invasión de los nódulos. (Soussi et al. 2001). Contrariamente a los numerosos reportes que existen sobre la adaptación de los rizobios a la salinidad, es escasa la información sobre los mecanismos de supervivencia, adaptación y competitividad de los rizobios y bacterias solubilizadoras de fosfato en suelos salino-alcálinos. En ese sentido, la falta de conocimiento en estos temas enfatiza la importancia de realizar estudios tendientes a identificar y caracterizar las funciones bacterianas involucradas en vida libre y en la interacción con plantas, en suelos restrictivos.

El objetivo general del proyecto está focalizado en 1) Obtener rizobios fijadores de nitrógeno y bacterias solubilizadoras de fosfato altamente competitivos y adaptados a las condiciones salino-alcálinas de la Pampa Deprimida del Salado y su aplicación al desarrollo de biofertilizantes eficientes para el cultivo de *L. tenuis* en dicha región. 2) Identificar genes de rizobios y bacterias solubilizadoras de fosfato involucrados en la adaptación a condiciones salino-alcálinas.

Objetivos particulares en relación al objetivo general 1

1A: Obtener cepas de rizobios y bacterias solubilizadoras de fosfato tolerantes a condiciones salino-alcálinas.

1B: Evaluar la capacidad de aislamientos de rizobios y bacterias solubilizadoras de fosfato tolerantes a salinidad y alcalinidad de promover el crecimiento de *L. tenuis* en tales condiciones

1C: Utilizar la técnica de selección recurrente para incrementar la movilidad de los microorganismos previamente seleccionados por su tolerancia y eficiencia bajo condiciones salino-alcálinas

1D: Determinar si el aumento de movilidad conferido a rizobios y bacterias solubilizadoras de fosfato por selección recurrente incrementa la competitividad respecto de las cepas originales o frente a cepas propias de ambientes naturales bajo condiciones salino-alcálinas

Objetivos particulares en relación al objetivo general 2

2A: A partir de rizobios y bacterias solubilizadoras de fosfato tolerantes a condiciones salino-alcálinas, obtener mutantes sensibles a dichas condiciones mediante mutagénesis al azar con un mini-transposón.

2B: Identificar los genes afectados por la inserción del transposón en los clones de rizobios y bacterias solubilizadoras de fosfato sensibles a condiciones salino-alcálinas resultantes del proceso de mutagénesis al azar.

2C: Realizar ensayos de complementación para comprobar la participación de los genes identificados en el objetivo 2B en la tolerancia de rizobios y bacterias solubilizadoras de fosfato a condiciones salino-alcálinas.

Actividades y metodología:

1A: Obtener cepas de rizobios y bacterias solubilizadoras de fosfato tolerantes a condiciones salino-alcálinas. Las colecciones de rizobios y bacterias solubilizadoras de fosfato (BSP), existentes en el laboratorio se ampliarán con aislamientos de nódulos y rizosfera de *L. tenuis* obtenidos directamente del campo, en suelos salino-alcálinos (Fulchieri et al., 2001, Estrella et al., 2009, Castagno et al., 2011). Se determinará la tolerancia en vida libre a condiciones salino-alcálinas. La evaluación de los rizobios será realizada en medio de cultivo AB sacarosa (Schmidt-Eisenlohr et al., 1999), suplementado con cloruro de sodio y carbonato de sodio, cuyo pH será ajustado a distintos valores comprendidos entre 9 y 11. En el caso de las BSP, se utilizará medio NBRIP agarizado con fosfato insoluble suplementado con cloruro de sodio y carbonato de sodio, ajustando el pH a distintos valores comprendidos entre 9 y 11.

1B: Evaluar la capacidad de aislamientos de rizobios y bacterias solubilizadoras de fosfato tolerantes a salinidad y alcalinidad de promover el crecimiento de *L. tenuis* en tales condiciones. Con los rizobios y BSP obtenidas en la etapa anterior se realizarán ensayos para evaluar el efecto promotor del crecimiento de *L. tenuis* en jarras Magenta (Sannazzaro et al., (2011). El riego de las plantas se llevará a cabo de acuerdo a las condiciones descritas por Paz et al., (2012). En el caso de los ensayos con rizobios la solución de riego será libre de nitrógeno. Para los ensayos con BSP la solución de riego estará libre de fósforo soluble, y se agregará una fuente de fosfato insoluble. Se incluirán controles negativos (plantas inoculadas con 1 ml de agua bidestilada estéril) y controles positivos (solución de riego con concentraciones de N o P no limitantes). Las plantas serán cultivadas en un cuarto de plantas climatizado. La eficiencia promotora del crecimiento se determinará mediante corte y posterior peso seco de la parte aérea de las plantas. También se evaluará la concentración de nitrógeno y/o fósforo en parte aérea. En el caso de los rizobios, también se determinará el número y peso seco de nódulos. Los aislamientos de rizobios y bacterias solubilizadoras de P que resulten eficientes en promover el crecimiento de *L. tenuis* serán identificados mediante técnicas moleculares de uso habitual en el laboratorio, para descartar posibles patógenos oportunistas de animales y plantas (Estrella et al., 2009, Castagno et al., 2011).

1C: Utilizar la técnica de selección recurrente para incrementar la movilidad de los microorganismos previamente seleccionados por su tolerancia y eficiencia bajo condiciones salino-alcálinas. Para los ensayos de movilidad se utilizarán aislamientos de rizobios y BSP tolerantes a condiciones salino-alcálinas, con alta eficiencia promotora del crecimiento de *L. tenuis*. La movilidad se evaluará en medios salino alcálico semi-sólidos con 0,3% de agar tal como se describió en el objetivo 1A. Las cepas con mayor movilidad se obtendrán de acuerdo al método descrito por Althabegoiti et al., (2008)

1D: Determinar si el aumento de movilidad conferido a rizobios y bacterias solubilizadoras de fosfato por selección recurrente incrementa la competitividad respecto de las cepas originales o frente a cepas propias de ambientes naturales bajo condiciones salino-alcálinas. Se comparará la competitividad de las cepas cuya movilidad fue aumentada, con la de las cepas a partir de las cuales fueron obtenidas. Se evaluará la capacidad de nodulación (rizobios) y colonización de raíces (bacterias solubilizadoras de fosfato) en plantas cultivadas en condiciones axénicas. Se marcarán las cepas de movilidad incrementada y las cepas de origen con diferentes proteínas fluorescentes, de manera de poder distinguir ambas cepas in planta (Lambertsen et al.,

(2004). Ambas cepas serán co-inoculadas en plantas de *L. tenuis* cultivadas en jarras Magenta, de acuerdo a lo descrito en secciones precedentes. Se realizarán controles inoculando plantas con solo uno de los dos tipos de cepa en cuestión. En el caso de los rizobios, se determinará la presencia de bacterias fluorescentes por microscopía dentro de los nódulos y también por recuento de colonias fluorescentes mediante iluminación con luz UV. En el caso de las BSP se evaluará el grado de colonización de raíces de cada cepa, tanto por microscopía como por recuento de colonias en raíces. Por otro lado, se comparará la competitividad de las cepas de rizobios y de bacterias solubilizadoras de fosfato cuya movilidad fue incrementada por selección recurrente, con la de cepas nativas presentes en suelos salino-alcálinos. Para tal fin, las cepas bacterianas seleccionadas y marcadas serán utilizadas en ensayos de microcosmos, en los que se cultivarán las plantas hospedantes en macetas con suelo salino-alcálinos.

2A: A partir de rizobios y bacterias solubilizadoras de fosfato tolerantes a condiciones salino-alcálinas, obtener mutantes sensibles a dichas condiciones mediante mutagénesis al azar con un mini-transposón. Las cepas de interés (rizobios y bacterias solubilizadoras de fosfato) serán expuestas a mutagénesis al azar por transferencia conjugativa de un mini-Tn5 a partir del plásmido donador pUT en la cepa de *E. coli* S17-1 con resistencia a neomicina (Castelli and Vescovi, 2011). Las colonias resistentes a neomicina serán repicadas a distintos medios de selección: 1- AB sacarosa con neomicina y 2- AB sacarosa con neomicina suplementado con cloruro de sodio y carbonato de sodio, cuyo pH será ajustado a distintos valores entre 9 y 11. Las colonias que crezcan en el medio 1 y no crezcan en el medio 2, serán consideradas clones transposantes sensibles a condiciones salino-alcálinas.

2B: Identificar los genes afectados por la inserción del transposón en los clones de rizobios y bacterias solubilizadoras de fosfato sensibles a condiciones salino-alcálinas resultantes del proceso de mutagénesis al azar. La presencia del miniTn5 en los clones seleccionados sensibles a condiciones salino-alcálinas será confirmada por PCR. Para tal fin se amplificará un fragmento interno del miniTn5 a partir de ADN genómico de cada mutante, utilizando cebadores diseñados específicamente sobre la secuencia del miniTn5. Para identificar las secuencias adyacentes al sitio de inserción del mismo en las colonias mutantes, se utilizará una técnica basada en reacciones de PCR inversa Lewenza et al., (2005). Alternativamente, para identificar las secuencias adyacentes al sitio de inserción del miniTn5 en las colonias mutantes, se purificará ADN genómico de las mutantes, se realizará una digestión con endonucleasas de restricción y se detectará el miniTn5 mediante hibridación del DNA genómico con una sonda del mini-transposón marcada con dioxigenina, para estimar el tamaño de los fragmentos que tienen la inserción del miniTn5 (Perez-Mendoza et al., 2005). Posteriormente dichos fragmentos serán clonados en un vector de clonado pGemT y las secuencias serán identificadas mediante la utilización de cebadores específicos del vector de clonado, siguiendo la metodología descrita por Perez-Mendoza et al., (2005). Análisis bioinformático de las secuencias: Las secuencias obtenidas serán analizadas con los siguientes programas informáticos: Vector NTI, Fasta, Blast y Clustal W. Los bancos de datos consultados serán EMBL, Genbank a través del servidor del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y del EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/>), la Rizobase de Kazusa DNA Research Institute (<http://www.kazusa.or.jp/rhizobase/>).

2C: Realizar ensayos de complementación para comprobar la participación de los genes identificados en el objetivo 2B en la tolerancia de rizobios y bacterias solubilizadoras de fosfato a condiciones salino-alcálinas. Para confirmar que la disminución de tolerancia resultante de la mutagénesis se debe efectivamente a la disrupción de los genes en cuestión se procederá a restaurar la función de los genes afectados mediante ensayos de complementación y se verificará la recuperación del

fenotipo de tolerancia a condiciones salino-alcálinas siguiendo la metodología descrita por Mendoza et al., (2005).

Condiciones de la presentación:

- A. El Informe Científico deberá presentarse dentro de una carpeta, con la documentación abrochada y en cuyo rótulo figure el Apellido y Nombre del Investigador, la que deberá incluir:
- a. Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 21).
 - b. Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, en otra carpeta o caja, en cuyo rótulo se consignará el apellido y nombres del investigador y la leyenda "Informe Científico Período".
 - c. Informe del Director de tareas (en los casos que corresponda), en sobre cerrado.
- B. Envío por correo electrónico:
- a. Se deberá remitir por correo electrónico a la siguiente dirección: ininvest@cic.gba.gov.ar (puntos 1 al 21), en formato .doc zipeado, configurado para papel A-4 y libre de virus.
 - b. En el mismo correo electrónico referido en el punto a), se deberá incluir como un segundo documento un currículum resumido (no más de dos páginas A4), consignando apellido y nombres, disciplina de investigación, trabajos publicados en el período informado (con las direcciones de Internet de las respectivas revistas) y un resumen del proyecto de investigación en no más de 250 palabras, incluyendo palabras clave.

Nota: El Investigador que desee ser considerado a los fines de una promoción, deberá solicitarlo en el formulario correspondiente, en los períodos que se establezcan en los cronogramas anuales.