

**CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y
TECNOLÓGICO**
Informe Científico¹

PERIODO ²: 2013-2014

Legajo N°:

1. DATOS PERSONALES

APELLIDO: DALEO

NOMBRES: Gustavo Raúl

Dirección Particular: Calle: N°:

Localidad: Mar del Plata CP: 7600 Tel:

Dirección electrónica (donde desea recibir información): grdaleo@mdp.edu.ar

2. TEMA DE INVESTIGACION

Mecanismos moleculares involucrados en las reacciones de defensa de las plantas frente a patógenos

3. DATOS RELATIVOS A INGRESO Y PROMOCIONES EN LA CARRERA

INGRESO: Categoría: Adjunto Fecha: 1980

ACTUAL: Categoría: Principal desde fecha: Septiembre 2003

4. INSTITUCION DONDE DESARROLLA LA TAREA

Universidad y/o Centro: Universidad Nacional de Mar del Plata

Facultad: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento: Instituto de Investigaciones Biológicas

Cátedra:

Otros:

Dirección: Calle: Funes N°: 3250

Localidad: Mar del Plata CP: 7600 Tel: 0223-475-3030

Cargo que ocupa: Prof. Titular(Desde 08/05)Decano(2006-2010)

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

Apellido y Nombres:

Dirección Particular: Calle: N°:

Localidad: CP: Tel:

Dirección electrónica:

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.

.....
Firma del Director (si corresponde)

.....
Firma del Investigador

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

Se estudian, en forma integrada, los diferentes mecanismos de defensa frente a patógenos desarrollados por la planta de papa a partir del tratamiento con inductores, organismos biocontroladores o agentes químicos no contaminantes. Se pretende contribuir al conocimiento básico de estos mecanismos y al diseño de estrategias de control basadas en procesos naturales, en lugar de depender, casi exclusivamente, de agentes químicos costosos y contaminantes. Además, se ha comenzado a estudiar los efectos de ciertos componentes de la respuesta de defensa de las plantas de papa sobre microorganismos patógenos humanos, espermatozoides y sobre células tumorales, abriéndose así una línea de posibles aplicaciones terapéuticas.

A-Con respecto al estudio de mecanismos de defensa de la papa contra patógenos, se ha profundizado en el estudio del inhibidor de serin proteasas (PLPKI) que muestra especificidad hacia proteasas microbianas. Se lo ha secuenciado y comprobado su actividad inhibitoria sobre proteasas de dos patógenos de la papa, *P. infestans* y *R. solani*. Además, la actividad en distintos cultivares y clones de papa se correlaciona con el grado de resistencia horizontal de dichos clones, de modo que podría utilizarse como marcador de resistencia (7.1.1). Se continuó el estudio de los fosfitos como estimuladores de las reacciones de defensa de la papa frente a diversos tipos de estrés. Se comprobó que la plantas tratadas con CaPhi resisten mejor el déficit hídrico y se recuperan más rápido luego de irrigación; muestran además cambios anatómicos y fisiológicos coherentes con este mejor comportamiento ante el estrés hídrico (7.5.1). En el mismo sentido, las plantas tratadas con KPhi exhibieron incrementos en la expresión de genes vinculados a la resistencia a la radiación UV-B (7.5.2, 7.5.3).

B- Se ha avanzado en el estudio del mecanismo por el cual el Inserto Específico de Plantas incluido en Aspartil Proteasas de papa (StAsp-PSI) desestabiliza membranas de células microbianas y tumorales. Los resultados muestran que en el proceso intervienen la difusión lateral previa a la agregación del PSI y formación de poros. Esta agregación viene precedida por cambios conformacionales y la penetración en bicapas fosfolipídicas produce principalmente en presencia de fosfolípidos negativamente cargados (7.1.3). La ya informada actividad citotóxica de las Aspartil Proteasas de papa sobre células de patógenos y célula tumorales hacen que estas proteínas puedan utilizarse como agentes terapéuticos. Con esta perspectiva, se conjugó StAP3 con polietilen glicol (PEG) y se estudiaron sus propiedades comparadas con las de la proteína nativa, comprobándose que la actividad antifúngica se incrementaba, sin modificar la selectividad, puesto que no mostró actividad hemolítica. Dado que este tipo de derivatización mejora propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de potenciales agentes terapéuticos, estos resultados constituyen un avance hacia la posible aplicación de estas proteínas en este sentido (7.1.2).

Por último, se ha caracterizado la proteína de papa con actividad de caspasa 3 en cuanto a masa molecular, carácter monomérico y secuenciación, que reveló identidad de secuencia con una proteína de papa tipo subtilisina, razón por la cual se la nombró StSBTc-3. Con respecto a su función en la interacción con patógenos, se mostró que se comporta como caspasa ejecutora durante la interacción con *P. infestans*, contribuyendo a restringir la diseminación del patógeno (7.2.1, 7.5.4). Se avanzó en su caracterización funcional, mostrando que ejerce regulación positiva sobre genes marcadores de la vía de señalización de salicílico (SA) y que actuaría corriente abajo o en forma independiente de la vía del etileno/jasmónico (7.5.6). Se ha reportado además una serin proteasa de papa con actividad anticoagulante y fibrinogenolítica con posibles aplicaciones biotecnológicas (7.5.5).

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

7.1 PUBLICACIONES.

7.1.1 Feldman ML; Andreu, AB; Korgan S; Lobato MC; Huarte M; Walling LL; Daleo GR (2014) PLPKI: A novel serine proteinase inhibitor as a potential biochemical marker involved in horizontal resistance to *Phytophthora infestans*. *Plant Breeding* 133:275-280.

7.1.2 Muñoz F; Caracciolo PC; Daleo G; Abraham GA; Guevara MG (2014) Evaluation of in vitro cytotoxic activity of mono-PEGylated StAP3(Solanum tuberosum aspartic protease 3) forms. *Biotechnology Reports* 3:1-7

7.1.3 Muñoz F; Palomares-Jerez MF; Daleo G; Villalain J; Guevara MG (2014) Possible mechanism of structural transformations induced by StAsp-PSI in lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1838:339-347.

7.2 TRABAJOS EN PRENSA Y/O ACEPTADOS PARA SU PUBLICACIÓN.

7.2.1 Fernandez MB; Daleo GR; Guevara MG. Isolation and characterization of a *Solanum tuberosum* subtilisin-like protein with caspase-3 activity (StSBTC-3). Aceptado el 2/12/2014. *Plant Physiology and Biochemistry*.

7.3 TRABAJOS ENVIADOS Y AUN NO ACEPTADOS PARA SU PUBLICACION.

7.4 TRABAJOS TERMINADOS Y AUN NO ENVIADOS PARA SU PUBLICACION.

7.5 COMUNICACIONES.

7.5.1 Lobato MC, Lasso MJ, Daleo GR, Andreu AB. 2014. El fosfito de calcio produce cambios histológicos y bioquímicos relacionados con la tolerancia al déficit hídrico en plantas de papa. XV CLFV, XXX RAFV, 2014. 21-24 de Septiembre de 2014. Publicado en Libro de Resúmenes: Conferencias, Simposios y Trabajos Presentados, pag. 129. ISBN 978-987-544-591-8. Mar del Plata. ARGENTINA.

7.5.2 Oyarburo N, Machinandiarena M, Daleo GR, Andreu AB, FP Olivieri. 2014. El Fosfito de potasio induce en papa resistencia contra el estrés por radiación UV-B. XV CLFV, XXX RAFV, 2014. 21-24 de Septiembre de 2014. Publicado en Libro de Resúmenes: Conferencias, Simposios y Trabajos Presentados, pag. 132. ISBN 978-987-544-591-8. Mar del Plata. ARGENTINA.

7.5.3 Oyarburo N, Feldman ML, Machinandiarena MF, Daleo GR, Olivieri FP, AB Andreu. 2013. El Fosfito de potasio como agente protector contra el estrés por radiación UV-B. VIII REDBIO 2013. 19-24 de Noviembre de 2013. Mar del Plata, ARGENTINA. Publicado en <http://redbioargentina2013.com.ar/website/abstracts/index2.php>

7.5.4 Fernandez MB; Daleo GR, Guevara MG. 2013. Purification Of An Apoplastic Subtilisin Like Protease With Caspase- 3 Like Activity From Potato P. *Infestans* Infected Leaves. VIII REDBIO 2013. 19-24 de Noviembre de 2013. Mar del Plata, ARGENTINA. Publicado en <http://redbioargentina2013.com.ar/website/abstracts/index2.php>

7.5.5 Pepe A; Daleo GR; Guevara MG. 2014. STSBTC-3, serin proteasa de *Solanum tuberosum* como nuevo agente anticoagulante y fibrinogenolítico con posibles aplicaciones biotecnológicas. 3º Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos SProBio 2014. Santa Fe, diciembre 2014.

Internacionales:

7.5.6 Fernández MB; Daleo GR; Guevara MG. 2014. Functional characterization of a novel potato subtilisin-like protein with caspase 3-like activity. Annual Meeting of the American Phytopathological Society (APS). Minneapolis, USA. 9-13 agosto 2014.

7.6 INFORMES Y MEMORIAS TECNICAS.

8. TRABAJOS DE DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS.

8.1 DESARROLLOS TECNOLÓGICOS.

8.2 PATENTES O EQUIVALENTES

8.3 PROYECTOS POTENCIALMENTE TRANSFERIBLES, NO CONCLUIDOS Y QUE ESTAN EN DESARROLLO.

8.4 OTRAS ACTIVIDADES TECNOLÓGICAS CUYOS RESULTADOS NO SEAN PUBLICABLES

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.

9. SERVICIOS TECNOLÓGICOS.

10. PUBLICACIONES Y DESARROLLOS EN:

10.1 DOCENCIA

10.2 DIVULGACIÓN

11. DIRECCION DE BECARIOS Y/O INVESTIGADORES.

- . 2010-Actual Dra. Milagros Machinandiarena. Invest. Asistente de CONICET
- . 2009-2014 Dra. Mariana Feldman. Inv. Asistente CONICET
- . hasta marzo 2013 Lic. María B. Fernández. Co director Beca Tipo I CONICET
- . 2013-2015 Lic. M. B. Fernández. Co director Beca Perfeccionamiento UNMdP

12. DIRECCION DE TESIS.

13. PARTICIPACION EN REUNIONES CIENTIFICAS.

Ver apartado 7.5.

14. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC.

No consigna.

15. SUBSIDIOS RECIBIDOS EN EL PERIODO.

Como Director:

2014-2015 Proteasas del tipo caspasas de plantas: rol en la respuesta de defensa de *Solanum tuberosum* a la infección por *P. infestans*. Financiamiento: Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC). Monto: \$50.000.-

2014-2015 Efecto de los fosfitos sobre los mecanismos de tolerancia a estreses abióticos en papa. Financiamiento: Universidad Nacional de Mar del Plata EXA 573/12. Monto: \$2749.

2012-2013 Estudio del efecto de los fosfitos en respuesta a estreses abióticos. Financiamiento: Universidad Nacional de Mar del Plata EXA 1595/12. Monto: \$ 2320.

Como integrante:

- 2011- 2013 Estudio de la actividad antitumoral in vivo de las proteínas StAP1; StAp2 y StAsp-PSI libres y nanoconjugadas. Financiamiento: CONICET. PIP 00701.

- 2011- 2013 Estudio de la actividad antitumoral in vivo de las proteínas StAP1; StAp2 y StAsp-PSI libres y nanoconjugadas. Financiamiento: Universidad Nacional de Mar del Plata EXA 1595/12.

- 2014- 2015. Nanoconjugación de proteínas vegetales: generación de nuevos agentes fitoterapéuticos para el tratamiento de enfermedades infecciosas y cáncer. Financiamiento: Universidad Nacional de Mar del Plata. EXA 686/14

- 2014- 2015. Nanoconjugación de proteínas vegetales: generación de nuevos agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de enfermedades infecciosas y cáncer. Financiamiento: Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC). Monto: \$50.000.- .

16. OTRAS FUENTES DE FINANCIAMIENTO.**17. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO.**

No consigna.

18. ACTUACION EN ORGANISMOS DE PLANEAMIENTO, PROMOCION O EJECUCION CIENTIFICA Y TECNOLÓGICA.

Ver Apartado 20.

A solicitud de los Organismos, se evaluaron proyectos de investigación para CONICET y ANPCYT, en carácter de par evaluador.

19. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO.

Química Biológica I. Asignatura obligatoria para la Licenciatura en Ciencias Biológicas y Licenciatura en Química. Dictado de los temas: Estructura de Aminoácidos y Proteínas, Cinética enzimática, Bioenergética, Oxidaciones Biológicas, Respiración e Integración Metabólica. Primer y Segundo cuatrimestres, 2013 y 2014.

Química Biológica II. Asignatura optativa para la Licenciatura en Ciencias Biológicas y Licenciatura en Química. Dictado de los temas: Cinética de Enzimas Alostéricas y de Reacciones Complejas. Segundo cuatrimestre 2013 y 2014.

Bioquímica Ecológica. Asignatura optativa para la Licenciatura en Ciencias Biológicas y Licenciatura en Química. Dictado del 75% de las clases teóricas. 1er. cuatrimestre 2013.

20. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES.

2011-Actual: Director Regular del Instituto de Investigaciones Biológicas, Unidad Ejecutora de doble dependencia CONICET-UNMdP.

2013-Actual: Director del CCT (Centro Científico Tecnológico) Mar del Plata.

2014- Actual: Par eveluador en la acreditación de carreras de Bioquímica. CONEAU.

21. TITULO Y PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PROXIMO PERIODO.

Se continuará el estudio de los mecanismos de defensa de la papa, esencialmente en variantes de los mismos subproyectos que se informan en el presente período. Este proyecto, con variaciones en subproyectos, se viene desarrollando hace varios años con una producción continua de resultados publicables e incorporación permanente de becarios que concluyen exitosamente su etapa de formación, ya sea en el grado, el doctorado o postdoctorado. El interés de la Provincia fue contemplado desde la formulación inicial del proyecto, dado que se estudia un cultivo de gran importancia y las enfermedades responsables de las mayores pérdidas económicas, en estrecha colaboración con el INTA (Balcarce) y con el apoyo de empresas dedicadas a la producción y procesamiento de papa.

1) . Como se expresara en informes anteriores, la enfermedad más importante del cultivo de papa es el Tizón tardío causado por el oomycete *Phytophthora infestans* produciendo perdidas de hasta un 40 % del rendimiento promedio anual. En este contexto es necesario el desarrollo de nuevas técnicas de control que contribuyan a mantener la sustentabilidad del sistema agro-ecológico. Se pretende continuar con el estudio del efecto del tratamiento con fosfitos (Phi) sobre la tolerancia a estreses abióticos como lo son la sequía y la radiación ultravioleta (UV-B), los cuales afectan sensiblemente el rendimiento y calidad del cultivo. El diseño experimental consistirá en el tratamiento de plantas de papa, de importancia industrial, con Phi al follaje, y posterior sometimiento a los diferentes estreses abióticos propuestos. Para cada estrés se evaluará el efecto de Phi sobre parámetros relacionados con la tolerancia, mediante estudios fisiológicos y/o fenotípicos, anátomo-histológicos, bioquímicos y moleculares. Cada uno de estos aspectos a analizar derivan de las investigaciones realizadas en el proyecto previo. Esto contribuirá a avanzar en la comprensión de los mecanismos de respuesta a los estreses bióticos y abióticos inducidas por Phi.

2) Proteasas del tipo caspasas de plantas: rol en la respuesta de defensa de *Solanum tuberosum* a la infección por *P. infestans*. La apoptosis es un tipo de muerte celular programada (MCP) que ocurre en animales y se diferencia de otros tipos de MCP por la activación de proteasas denominadas caspasas. Las caspasas son cistein proteasas aspartato específicas que poseen una gran especificidad de sustrato. Si bien en plantas no se han encontrado genes homólogos a los de las caspasas animales, diversos estudios mostraron que las proteasas aspartato específicas contribuyen en la MCP. Durante la interacción papa- *P. infestans*, ocurre la activación de la vía de señalización por AS e inducción y secreción al apoplasto de proteínas PR como parte de la respuesta de defensa de la planta, lo que desemboca en MCP. Trabajo previo realizado en el laboratorio demostró que existe actividad del tipo caspasa- 3 durante la interacción papa- *P. infestans* tanto en extractos proteicos totales como en el fluido intercelular. La absorción por pecíolo del inhibidor de caspasa-3 Ac-DEVD-CHO demostró una disminución en la tasa de muerte celular y un aumento en el desarrollo de la enfermedad en hojas de papa infectadas. Además se observó que esta actividad se

podría correlacionar con el grado de resistencia a campo de papa a la infección por P. infestans. Objetivo general: Profundizar en el conocimiento sobre proteasas con actividad del tipo DEVDasa inducidas durante la interacción papa- P. infestans.

Objetivos parciales:

- 1) Purificar, clonar y expresar de forma heteróloga a la/s proteasa/s con actividad de DEVDasa inducidas durante la interacción papa- P. infestans.
- 2) Avanzar en el conocimiento del rol de proteasas con actividad de DEVDasa en el mecanismo de defensa de Solanum tuberosum en respuesta a la infección por P. infestans.
- 3) Determinar si existe una interrelación entre la actividad DEVDasa y la vía de señalización que involucra al AS en la respuesta de defensa de hojas frente a la infección por P. infestans
- 4) Determinar el mecanismo por el cual las proteasas con actividad de DEVDasa son secretadas al espacio intercelular.

Ambos subproyectos son amplios y abiertos, de modo que se continuará produciendo resultados publicables y, en la medida de lo posible, transferibles al medio productivo como hasta ahora.

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: infinvest@cic.qba.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.