

INFORME CIENTIFICO DE BECA

Legajo N°:

BECA DE Estudio

PERIODO 01/04/2012 -31/03/2014

1. APELLIDO: Montecchia

NOMBRES: Juan Francisco

Dirección Particular: Calle: N°:

Localidad: La Plata **CP:** 1900 **Tel:**

Dirección electrónica (donde desea recibir información): juan_montecchia@hotmail.com

2. TEMA DE INVESTIGACIÓN (Debe adjuntarse copia del plan de actividades presentado con la solicitud de Beca)

Inducción de tolerancia a la Fusariosis de la espiga mediante el empleo de elicitores hormonales y biológicos en trigo.

3. OTROS DATOS (Completar lo que corresponda)

BECA DE ESTUDIO: 1º AÑO: Fecha de iniciación: 01/04/2012

2º AÑO: Fecha de iniciación: 01/04/2013

BECA DE PERFECCIONAMIENTO: 1º AÑO: Fecha de iniciación:

2º AÑO: Fecha de iniciación:

4. INSTITUCIÓN DONDE DESARROLLA LOS TRABAJOS

Universidad y/o Centro: Universidad Nacional de La Plata

Facultad: Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales

Departamento: Departamento de Ciencias Biológicas

Cátedra: Genética

Otros: CIDEFI

Dirección: Calle: 60 y 119 N°: S/N

Localidad: La Plata **CP:** 1900 **Tel:** 423-6758

5. DIRECTOR DE BECA

Apellido y Nombres: Castro Ana María

Dirección Particular: Calle: N°:

Localidad: La Plata **CP:** 1900 **Tel:**

Dirección electrónica: amcastro@isis.unlp.edu.ar

6. EXPOSICIÓN SINTÉTICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERÍODO. (Debe exponerse la orientación impuesta a los trabajos, técnicas empleadas, métodos, etc., y dificultades encontradas en el desarrollo de los mismos, en el plano científico y material).

En el presente informe se exponen los resultados de los ensayos realizados durante la beca de Estudio. El primer ensayo fue informado detalladamente en el primer informe preliminar, aquí se reportan los resultados de los análisis estadísticos del mismo y se comparan con los obtenidos durante el segundo año. En este período se analizaron estadísticamente los resultados obtenidos del ensayo de la campaña 2012-13, durante los meses de Febrero y Marzo de 2013; A fines de Mayo se sembró un segundo ensayo y se condujo como se detalla en la metodología durante campaña 2013-14. Este último ensayo fue modificado respecto del primero en algunos aspectos metodológicos, basando tales cambios en los resultados obtenidos del análisis del primer ensayo.

El diseño y la orientación de la investigación se enfocaron, desde la etapa inicial de reseña bibliográfica, no solo en identificar genotipos portadores de alelos inducibles capaces de incrementar la resistencia a la Fusariosis de la espiga, sino que también busca determinar si existe un vínculo entre la altura de la planta y la capacidad de activar estas respuestas defensivas.

El estudio de las fuentes de resistencia a la FET, tanto desde el mapeo genético (Draeger y col. 2007) como desde su caracterización molecular (Ding y col. 2011), ha revelado que las mismas son de carácter poligénico, cuantitativas, e inducibles. Estas características dificultan su incorporación a variedades comerciales por mejoramiento tradicional dada la baja heredabilidad que presentan los caracteres cuantitativos.

Reportes recientes de mapeo genético de fuentes de resistencia a FET (Srinvasachary y col. 2008 y 2009) señalan a los alelos de semi-enanismo *Rht*, incorporados mundialmente en las variedades comerciales durante la «Revolución Verde», como factores determinantes en gran medida de la variabilidad de éste carácter.

Estos loci codifican factores transcripcionales DELLA, los cuales interactúan directamente con las vías de señalización y expresión de defensas mediadas por fitohormonas (Navarro y col. 2008; y col. 2011). Estos Factores Transcripcionales son degradados por vía del ácido Giberélico (AG) des-reprimiendo otros factores transcripcionales tienen miles de interacciones con otros factores de transcripción, pero afectan particularmente a los que regulan el crecimiento y elongación del tallo.

Navarro y col. demostraron que la estabilización por mutaciones de las proteínas DELLA en *Arabidopsis thaliana* incrementa la capacidad defensiva de la planta frente a patógenos necrótrofos, mientras que su degradación, por mutantes hipersensibles al ácido giberélico, o por aplicación exógena del mismo en plantas normales, incrementaba la resistencia a patógenos biótrofos.

Saville y col. 2011 determinaron que en especies monocotiledóneas, la presencia de los alelos *Rht* semienanizantes, codificantes de DELLAs estables, alteraban la respuesta a patógenos necrótrofos y biótrofos, contribuyendo a la resistencia a necrótrofos.

Objetivos:

El objetivo general del presente proyecto es determinar si en líneas experimentales y cultivares comerciales de trigo existen mecanismos de defensas inducibles por medio de la aplicación exógena de fitohormonas, como el AG y el AJ, que otorguen tolerancia a la infección de *Fusarium graminearum*.

Evaluar si la pre-inoculación con *Pseudomonas fluorescens* (Rizofos) disminuye la severidad de la enfermedad.

Para alcanzar los objetivos generales se han establecido los siguientes objetivos particulares:

1. Determinar si la aplicación exógena de fitohormonas (AG o AJ) disminuye la incidencia y la severidad de la enfermedad en espigas de trigo inoculadas con *Fusarium graminearum*.
2. Evaluar si la pre-inoculación con rizobacterias (*Pseudomonas fluorescens*) disminuye la incidencia y la severidad de la enfermedad en espigas de trigo inoculadas con *Fusarium graminearum*.
3. Evaluar si los tratamientos de elicitación (AG, AJ, *Pseudomonas fluorescens*) afectan el PMG de los trigos inoculados con *Fusarium graminearum*.
4. Evaluar si los tratamientos de elicitación (AG, AJ, *Pseudomonas fluorescens*) disminuyen el contenido de la micotoxina DON (deoxinivalenol).

Materiales y Métodos:

Materiales vegetales evaluados:

Los materiales vegetales estudiados fueron nuevamente las dos líneas experimentales Doble Haploides y la misma variedad comercial:

- Opata x Synthetic (OxS)
Características: Ciclo corto, Porte alto.
- Spark x Rialto (SxR)
Características: Ciclo Largo, Porte Semi-enano.
- Klein Zorro (Comercial)
Características: Ciclo corto, Porte Semi-rastrero.

El segundo ensayo fue sembrado, al igual que el primero, bajo un diseño de parcela subdividida, con dos repeticiones (parcelas) por genotipo en uno de los umbráculos de la cátedra de Genética en la ciudad de La Plata (34° 54' LS).

La siembra se realizó en parcelas de 2,5m de largo por 2,10m de ancho cada una, con un espaciamiento entre surcos 0,20m. Las parcelas, en éste segundo ensayo, se sembraron entre los días 24 y 25 de Mayo de 2013.

En cada parcela ensayada se evaluarán todos los tratamientos con sus respectivos testigos no inoculados.

Elicitores Hormonales:

Se evaluará nuevamente el efecto inductor del Ácido Jasmónico y el Ácido Giberélico y un elicitor bacteriano o biológico: Rizofos® (Rizobacter S.A.).

Concentración de soluciones hormonales aplicadas:

Se asperjarán las siguientes soluciones hasta chorreo, en los distintos tratamientos:

- Ácido Jasmónico 10-5M
- Ácido Giberélico (GA3) 10-5M
- Agua destilada (testigos)

Preparación del Inóculo Patogénico; Método de Inducción e Inoculación; Ensayo de estrés oxidativo, VER INFORME CIENTÍFICO ADJUNTO.

RESULTADOS:

Tanto en KZ, como en el genotipo alto OXS, no hubo tratamiento hormonal que afectase positivamente la resistencia a la FET de algún tipo. En algunos tratamientos, como el del AG, OxS mostró una tendencia opuesta a la del semi-enano.

Éste tratamiento, en el genotipo SXR, incrementó la respuesta defensiva de ambos tipos mostrando significativos incrementos en la tolerancia a la FET en las variables patométricas evaluadas. Siendo algo más contundentes los resultados en la inoculación por aspersión.

Durante la campaña 2012-13 la variable AUDPC indicó al AG como el único tratamiento significativamente menos afectado en los dos métodos de inoculación, con un 50 % menos de síntomas que el control general inoculado con *F. graminearum*, no inducido. El nivel de GE no se correlacionó directamente con la severidad observada en AUDPC. Mientras que en la resistencia de Tipo 2 ningún tratamiento se destacó, en la de Tipo 1 el AG redujo el número de granos enfermos un 17,5%.

Siendo el PMG la variable más robusta y representativa del nivel de daño de la enfermedad, podemos medir a través de ella la magnitud de la respuesta inducida.

Esta variable reportó al AG, durante el primer año, como un verdadero inductor de la respuesta resistente en ambos tipos de inoculación para éste genotipo. En la inoculación por aspersión el tratamiento AG inoculado tuvo un PMG significativamente semejante al de su testigo no inoculado, superando en un 90% al control general inoculado no inducido.

En la inoculación puntual, si bien otros tratamientos como el Rizofos y el AJ inoculados incrementaron la resistencia a la dispersión respecto del control inoculado, el AG inoculado se diferenció significativamente de los demás tratamientos inoculados y no se diferenció de los controles sin inocular. Aquí el incremento del PMG respecto del control general no inducido fue del 80%.

CONCLUSIÓN:

Estos resultados parecen alentar la hipótesis de que la aplicación exógena de Ácido Giberélico altera las vías de señalización vinculadas a la defensa de la planta incrementando la tolerancia al patógeno.

Considerando que en el caso del genotipo SxR la respuesta más contundente, en todas las variables evaluadas, se observó en la inoculación por aspersión, puede inferirse que el incremento de la tolerancia se produjo por una reducción de la infección inicial, es decir, por un incremento en la resistencia de Tipo 1.

VER INFORME CIENTÍFICO ADJUNTO.

7. TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN REALIZADOS O PUBLICADOS EN EL PERIODO.

7.1. PUBLICACIONES. Debe hacerse referencia, exclusivamente a aquellas publicaciones en la cual se halla hecho explícita mención de su calidad de Becario de la CIC. (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Toda publicación donde no figure dicha aclaración no debe ser adjuntada. Indicar el nombre de los autores de cada trabajo, en el mismo orden que aparecen en la publicación, informe o memoria técnica, donde fue publicado, volumen, página y año si corresponde; asignándole a cada uno un número. En cada trabajo que el investigador presente -si lo considerase de importancia- agregará una nota justificando el mismo y su grado de participación.

7.2. PUBLICACIONES EN PRENSA. (Aceptados para su publicación. Acompañar copia de cada uno de los trabajos y comprobante de aceptación, indicando lugar a que ha sido remitido. Ver punto 7.1.)

7.3. PUBLICACIONES ENVIADAS Y AUN NO ACEPTADAS PARA SU PUBLICACIÓN. (Adjuntar copia de cada uno de los trabajos. Ver punto 7.1.)

7.4. PUBLICACIONES TERMINADAS Y AUN NO ENVIADAS PARA SU PUBLICACIÓN. (Adjuntar resúmenes de no más de 200 palabras)

7.5. COMUNICACIONES. (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores)

7.6. TRABAJOS EN REALIZACIÓN. (Indicar en forma breve el estado en que se encuentran)

8. OTROS TRABAJOS REALIZADOS. (Publicaciones de divulgación, textos, etc.)

8.1. DOCENCIA

8.2. DIVULGACIÓN

8.3. OTROS

9. ASISTENCIA A REUNIONES CIENTÍFICAS. (Se indicará la denominación, lugar y fecha de realización y títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas)

- Primer Congreso Internacional de la CIC: Presentación de poster titulado "Inducción de Tolerancia a la Fusariosis de la Espiga en Trigo" en el Primer Congreso Internacional Científico y Tecnológico de la Provincia de Buenos Aires, realizado los días 19 y 20 de Septiembre de 2013 en la ciudad de La Plata.

10. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC. (Señalar características del curso o motivo del viaje, duración, instituciones visitadas y si se realizó algún entrenamiento)

Desde el 26 de Mayo hasta el 16 de Septiembre de 2013 realicé una estadía de entrenamiento científico, en el laboratorio de Transformación Genética del CINVESTAV IPN Unidad Irapuato, Campus Guanajuato, México.

Tal entrenamiento se realizó dentro del programa de Biotecnología para Latinoamérica y el Caribe promovido por la Universidad de las Naciones Unidas.

La estancia de entrenamiento se desarrolló dentro del marco del Proyecto de Investigación: "Mejoramiento genético de especies cultivadas mediante biotecnologías avanzadas para adaptación a cambio climático global".

El entrenamiento, descrito en el plan de trabajo (VER ADJUNTO), abarcó técnicas tales como la extracción de ADN de distintos tejidos de diversas especies vegetales por medio de varios métodos; Identificación de plantas transgénicas por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR); diagnóstico de plantas infectadas por virus a través de PCR; Transformación genética por medio *Agrobacterium tumefaciens*; Clonado y recombinación de vectores virales y bacterianos, de distintas construcciones moleculares para generar con ellas especies transgénicas; Transformación de explantos vegetales por biobalística; Silenciamiento génico post transcripcional inducido por vectores virales (Geminivirus); Transformación genética y silenciamiento genético por biobalística ; Cultivo in vitro de explantos de diversas especies para inducir desdiferenciación de tejidos, organogénesis y finalmente regeneración de planta entera; Cultivo in vitro para embriogénesis somática en girasol; identificación de genes por medio de sondas de ADN empleando la técnica de Southern Blot.

Se adjuntan, además del plan de trabajo los documentos que certifican el aval del director del CINVESTAV para la realización de éste entrenamiento, la confirmación de aceptación del proyecto de la Universidad de las Naciones Unidas y la autorización del directorio de la CIC.

11. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO

12. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO

13. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TÍTULOS ANTERIORES (Bajo este punto se indicará todo lo que se considere de interés para la evaluación de la tarea cumplida en el período)

14. TÍTULO DEL PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PERÍODO DE PRORROGA O DE CAMBIO DE CATEGORÍA (Deberá indicarse claramente las acciones a desarrollar)

Condiciones de 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 Becario, la que deberá incluir:

- a. Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 14).
- b. Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, deben agregarse al término del desarrollo del informe
- c. Informe del Director de tareas con la opinión del desarrollo del becario (en sobre cerrado).

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

.....
Firma del Director

.....
Firma del Becario