

CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO

Informe Científico¹ PERIODO: 2014-2015

1. DATOS PERSONALES

APELLIDO: LUNA

NOMBRES: MARIA FLAVIA

Dirección Particular: Calle:

Localidad: La Plata CP: 1900 Tel:

*Dirección electrónica (donde desea recibir información, que no sea "Hotmail"):
mafla@quimica.unlp.edu.ar*

2. TEMA DE INVESTIGACION

CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL (BPCV) ENDÓFITAS Y APLICACIONES

3. DATOS RELATIVOS A INGRESO Y PROMOCIONES EN LA CARRERA

INGRESO: Categoría: ASISTENTE Fecha: 01/06/2006

ACTUAL: Categoría: ADJUNTO/Sin Director desde fecha: 01/04/2012*

4. INSTITUCION DONDE DESARROLLA LA TAREA

Universidad y/o Centro: CINDEFI (UNLP-CCT-La Plata; CONICET

Facultad: Ciencias Exactas-UNLP

Departamento: Química

Cátedra: Área de Biotecnología

Otros:

Dirección: Calle: 50 y 11 N°: 2247

Localidad: La Plata CP: 1900 Tel: 0221-4833794

Cargo que ocupa: DOCENTE INVESTIGADOR DEDICACION EXCLUSIVA

5. DIRECTOR DE TRABAJOS.

No corresponde

6. RESUMEN DE LA LABOR QUE DESARROLLA

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

Descripción para el repositorio institucional. Máximo 150 palabras.

Los sistemas de producción agrícola han incrementado en área y productividad a expensas de un aumento del uso de agroquímicos que provocan un impacto negativo en el ambiente. Para reducir la dependencia de su uso surge el empleo de inoculantes a base de Bacterias Promotoras del crecimiento Vegetal o BPCV como fitoestimulantes, biofertilizantes o biocontroladores. Las BPCV son consideradas *bioinsumos* del sector agroindustrial cuyo uso se fomenta debido a su potencialidad para incrementar la producción de los cultivos permitiendo un manejo sustentable del medio ambiente y a su contribución al agregado de valor en origen. El objetivo general de nuestras investigaciones es contribuir a la sustentabilidad económica y ambiental de cultivos de tomate, trigo, cebada y sorgo mediante la inoculación con bioinsumos formulados con bacterias promotoras del crecimiento vegetal diazótrofes (fijadoras de nitrógeno) endófitas (aisladas del interior de los tejidos vegetales) para disminuir la huella ecológica generada por este sector.

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

En el presente período se informan las actividades realizadas en el marco de los proyectos: "Desarrollo biotecnológico para la producción orgánica de tomate bajo cubierta mediante la aplicación de inoculantes a base de bacterias diazótrofes endófitas promotoras del crecimiento vegetal: *Gluconacetobacter diazotrophicus* y *Burkholderia tropica*" (CIC-PBA, 2014-2016) y "Utilización de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno como Inoculantes en cultivos de interés agronómico", (UNLP, 2012-2016) acordes con los siguientes objetivos específicos:

- 1- Caracterizar el proceso de colonización de *Gluconacetobacter diazotrophicus* y *Burkholderia tropica* cuando son inoculadas en plantas de sorgo, trigo, cebada y tomate, crecidas en condiciones gnotobióticas.
- 2- Evaluar los efectos de promoción del crecimiento y la persistencia, en el ambiente y/o en las plantas en estudio, de *G. diazotrophicus* y *Burkholderia tropica* en ensayos a campo.

Las actividades realizadas en el período informado corresponden a los dos últimos años del proyecto:

1-Actividades de cultivo de microorganismos: **1.a.** Con los resultados experimentales de los cultivos de *B. tropica* en relación a la solubilización de compuestos insolubles de Fósforo informados en el período anterior se redactó un manuscrito enviado para su publicación en 2015 y aceptado en el 2016 (ver luego). **1.b.** Con las suspensiones de los microorganismos crecidos en los medios seleccionados previamente se realizaron diferentes formulaciones con el agregado de distintos soportes (Goma arábiga, gelatina, PVP) para aumentar la sobrevivencia de los microorganismos hasta su aplicación y se colocaron a diferentes temperaturas de almacenamiento. Como era de esperar, a bajas temperaturas la supervivencia de los microorganismos fue mayor, pero ninguno de los aditivos evaluados contribuyó con un aumento considerable en la viabilidad de los microorganismos en el período evaluado (6 meses). **1.c.** Se realizaron diversos cultivos líquidos para evaluar la producción de enzimas líticas de tejidos vegetales relacionadas con la capacidad de colonización endofítica que puedan poseer las BPCV en estudio. Se encontró que *B. tropica* posee amilasas, lipasas y pectinasas. Cultivos líquidos con distintas fuentes de carbono, indicaron que esta pectinasa se induce por la presencia de pectinas naturales. Los experimentos y resultados referidos a esta temática fueron realizados e interpretados en el marco de la tesina de grado de la alumna Estefanía Cagnola, realizada y concluida en 2015 bajo mi dirección.

2-Actividades de cultivo de plantas: **2.a.** Hemos continuado los estudios de colonización de *B. tropica* inoculada en trigo, sorgo y tomate y comenzamos con ensayos con cebada, siendo éste el vegetal de estudio del tema de tesis de la becaria doctoral Sabrina Soledad García, quien comenzó en el 2014 bajo mi dirección. Como resultado general del proyecto, *B. tropica* se logró aislar por **métodos dependientes de cultivo**, de tejidos sin desinfectar (población superficial) de plantas de trigo, sorgo, cebada y tomate inoculadas en condiciones gnotobióticas, encontrando para los tres primeros cultivos un *plateau* de concentración superficial del orden de 10^8 - 10^9 UFC/gr de tejido desde los 4-5 días postinoculación. Sin embargo, para cebada la población superficial fue aumentando durante todo el experimento hasta un orden de 10^{13} UFC/ gr de tejido a los 20 días postinoculación. No obstante, para todos los cultivos la población endofítica medida desde los 2-3 días postinoculación, presento valores relativamente constantes desde el inicio del experimento con 10^4 - 10^5 UFC/gr de tejido. Estos resultados indicarían que mayor número de bacterias colonizando la superficie no se traduce en una mayor colonización endofítica. Ensayos variando las dosis de inoculante aplicado sobre semillas de sorgo, trigo y cebada indicaron que un menor número de UFC/semilla, desde 10^6 hasta 10^2 , no afecta la colonización endofítica, ya que la bacteria puede ingresar a los tejidos internos solo que desfasada temporalmente. Se pudo identificar *B. tropica* en muestras de raíces sin desinfectar de cualquiera de las plantas en estudio crecidas en condiciones gnotobióticas haciendo la extracción directa de ADN de los tejidos vegetales, y empleando técnicas de biología molecular con primers específicos, es decir, por **métodos independientes de cultivo**. Por otro lado, en muestras de tejidos desinfectados, en los que por métodos dependientes de cultivo se registró que *B. tropica* también fue capaz de colonizar endofíticamente, no se pudo evidenciar aún la presencia de la misma por extracción directa de ADN del tejido vegetal. La extracción de ADN bacteriano por la técnica de CTAB adaptada a estos tejidos, fue la más exitosa entre todos los protocolos que se ensayaron, pero las muestras amplificaron para primers específicos de Eubacterias y no para *B. tropica*. Este resultado probablemente se deba a que la concentración de *B. tropica* en los tejidos internos es bastante baja, 3 a 4 órdenes menor que la población superficial. Por ello, se están planteando algunas metodologías alternativas para concentrar la muestra y así

poder identificarla no solo en muestras provenientes de plantas crecidas en condiciones gnotobióticas. En ensayos realizados en invernadero en muestras de raíces de sorgo, trigo y cebada, de plantas crecidas en sustrato no estéril (1:1 de tierra negra y sustrato para plantín) y con semillas germinadas sin desinfectar inoculadas tanto con *B. tropica* como con *G. diazotrophicus*, se pudieron identificar ambas bacterias por técnicas de recuento en placas con antibióticos, solo en sus poblaciones superficiales, y no se encontraron las bacterias en estudio en muestras desinfectadas. Por el contrario, sí se encontró y se identificó *B. tropica* en ambas muestras, desinfectadas o no, por métodos dependientes de cultivo. Ninguna de las semillas utilizadas están tratadas con antifúngicos, y poseen una carga microbiana inicial incluso aún después de desinfectadas, ya que no se "esterilizan" y además pueden traer endófitos nativos de la semilla. **2.b.** Muestras de cultivos de sorgo, trigo y cebada realizados a campo fueron analizadas por métodos dependientes de cultivo y luego esos aislamientos fueron analizados por biología molecular con primers específicos de especie para estudiar la presencia y la persistencia del microorganismo y su relación con la promoción del crecimiento vegetal. No se pudo evidenciar aún la presencia de las bacterias inoculadas, probablemente porque en el momento de la toma de muestra puede no estar colonizando la planta o estar en un número bajo que no es posible detectar por las metodologías empleadas de aislamiento y caracterización por biología molecular utilizadas hasta el momento. **2.c.** Con respecto a los ensayos de promoción del crecimiento de tomate que se llevaron a cabo durante dos años consecutivos en el invernadero de la productora de tomate platense Susana Parrillo, con quien participamos de la 11va Fiesta del tomate platense (2015) presentando un poster institucional y también en el Segundo Congreso de Foro de Universidades Nacionales para la Agricultura Familiar con una presentación oral en el tema: "Validación de un inoculante a base de bacterias promotoras de crecimiento, como alternativa al uso de agroquímicos en tomate platense en San Salvador de Jujuy". En estas oportunidades presentamos los resultados prometedores obtenidos en cuanto al aumento en rendimiento en fruto de las plantas inoculadas comparadas con las no inoculadas y en relación a la implementación de prácticas agrícolas sustentables. **2.d.** En relación a la aplicación de microscopía de epifluorescencia se obtuvieron fotografías que muestran colonización de cebada por *B. tropica* y también se registraron fotografías en con microscopía confocal que muestran un comportamiento endofítico de esta bacteria también en plantas de cebada. Los experimentos y resultados referidos a esta temática en plantas de trigo fueron realizados e interpretados en el marco de la tesina de grado de la alumna Ana Clara López, realizada y concluida en 2014 bajo mi dirección. **2.e.** Las muestras de los cultivos de sorgo, trigo y cebada realizados a campo fueron analizadas por métodos dependientes de cultivo y por biología molecular con primers específicos de especie para estudiar la presencia y la persistencia del microorganismo y su relación con la promoción del crecimiento vegetal. Por ninguna de las dos técnicas se pudo evidenciar aún la presencia de las bacterias inoculadas, probablemente porque en el momento de la toma de muestra puede no estar colonizando la planta o está en un número bajo que no es posible detectar por las metodologías empleadas de aislamiento y caracterización por biología molecular. **2.f.** Los ensayos a campo de cebada inoculando con *B. tropica* se realizaron en dos sitios experimentales: 1-EE Integrada Barrow y 2-campo de productor en Chivilcoy. En ambos casos se obtuvo un aumento del rendimiento de los cultivos expresado como kg de grano por ha, resultado prometedor que conduce a la necesidad de seguir realizando ensayos con diferentes dosis de inoculación y en diferentes condiciones edafoclimáticas. El motivo principal por el cual no han sido llevados a cabo otros estudios de inoculación a campo es la falta de presupuesto para realizar un programa integral de evaluación de la promoción del crecimiento, incluido el análisis de persistencia de los microorganismos inoculados, tanto en la rizósfera como en la planta utilizando metodologías moleculares para su identificación. **2.g.** Con los estudios de colonización de trigo y sorgo por *B. tropica* en condiciones gnotobióticas y a campo, resultados obtenidos por la becaria doctoral Pamela Bernabeu bajo mi dirección, se están redactando dos manuscritos: uno que muestra el carácter endofítico de *B. tropica* en sorgo y otro sobre la eficiencia de colonización y promoción de crecimiento de trigo. **2.h.** En relación al estudio de supervivencia de los microorganismos en las semillas en presencia de protector y antifúngicos, se demostró que la supervivencia de *B. tropica* en semillas de cebada se puede mejorar con el agregado de aditivos, y que este tratamiento aplicado en el campo fue efectivo indirectamente ya que de otra manera el efecto promotor no se hubiera podido observar, resultados similares a los informados para esta BPCV en el período anterior para el cultivo de trigo.

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

8.1 PUBLICACIONES.

- 1- 2015 Bernabeu P, Mariano Pistorio, Gonzalo Torres-Tejerizo, Paulina Estrada-De los Santos, María L. Galar, José L. Boiardi and María F. Luna "Colonization and plant growth-promotion of tomato by *Burkholderia tropica*", Scientia Horticulturae Enviada June 2014, Revisada Abril 2015, Aceptada Mayo 2015, Disponible online May 2015. doi:10.1016/j.scienta.2015.05.014. Scientia Horticulturae 191:113-120.

Abstract

Several diazotrophic *Burkholderia* species have been described to exhibit some activities involved in plant growth promotion and biological control. In this work seedlings of tomato plants were inoculated with this bacterium in order to study colonization of different vegetal tissues and plant growth promoting ability under greenhouse conditions. Tomato seedlings inoculated with *B.*

tropica strain MTo-293 and two derivative strains containing the marker genes *gusA* and *gfp* respectively (constructions described in this work) were grown under gnotobiotic conditions. Colonization was monitored both by colony counting of bacterial suspensions from homogenized tissues with or without previous surface disinfection and by microscopic observation of entire plant tissues. In another set of experiments tomato seedlings were inoculated with *B. tropica* MTo-293 for evaluation of tomato production under greenhouse conditions. Tomato yields were determined by quantifying total tomato production throughout the crop in two different seasons. *B. tropica* could be isolated from root surfaces ($>7.0 \log \text{CFU.g}^{-1}$ fresh weight) and from surface-disinfected and disrupted roots ($>5.0 \log \text{CFU.g}^{-1}$ fresh weight) and stems ($>4.0 \log \text{CFU.g}^{-1}$ fresh weight) of inoculated plants. Microscopic studies showed colonizing bacteria on root hairs, root tips, lateral root emergence sites, and stomata. In greenhouse experiments inoculated plants showed a consistent increase of both number and weight of fruits as compared to uninoculated controls. These results show that seedling inoculation with *B. tropica* led to extensive root colonization of tomato plants followed by bacterial spreading to aerial tissues. This significant colonization was accompanied by an enhancement of tomato production in two different crop seasons.

He participado en la totalidad de los experimentos realizados para esta publicación así como en su redacción. Este trabajo se realizó con la colaboración del Dr. Mariano Pistorio del IBBM-UNLP y de la Dra. Paulina Estrada De los Santos de Mexico, ambos coautores del trabajo.

- 2- 2015 Ivana Cavello, Juan Manuel Crespo, Soledad García, Matías Zapiola, Flavia Luna and Sebastian Fernando Cavalitto. Plant growth promotion activity of keratinolytic fungi growing on a recalcitrant waste known as hair waste. Biotechnology Research International. Noviembre 2015. doi.org/10.1155/2015/952921.

Abstract

Purpureocillium lilacinum (Thom) Samsom is one of the most studied fungi in the control of plant parasitic nematodes. However, there is not specific information on its ability to inhibit some pathogenic bacteria, fungi or yeast. This work reports the production of several antifungal hydrolytic enzymes by a strain of *P. lilacinum* when it is grown in a medium containing hair waste. The growth of several plant-pathogenic fungus: *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger* and *Fusarium culmorum* was considerably affected by the presence of *P. lilacinum*'s supernatant. Besides antifungal activity, *P. lilacinum* demonstrates the capability to produce indolacetic acid and ammonia during time cultivation on hair waste medium. Plant growth promoting activity by cell free supernatant was evidenced through the increase of the percentage of tomato seed from 71 to 85 % after 48 hours. A 21- day plant growth assay using tomato plants indicates that crude supernatant promotes the growth of the plants similarly to a reference fertilizer ($p > 0.05$). These results suggest that both - strain and the supernatant- may have potential to be considered as a potent biocontrol agent with multiple plant-growth promoting properties. To our knowledge, this is the first report on the antifungal, IAA production and tomato growth enhancing compounds produced by *P. lilacinum* LPSC #876.

He participado en la totalidad de los experimentos relacionados con los ensayos con plantas en esta publicación así como en su redacción, correcciones y forma del manuscrito.

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

1. Enviado 2015 Aceptado 2016 Mineral Phosphate Solubilization in *Burkholderia tropica* Involves an Inducible PQQ-Glucose Dehydrogenase Bernabeu PR, García SS, García Ferreyra G, Guidi VI, Galar ML, Boiardi JL and Luna MF. British Microbiology Research Journal 13: 1-8, 2016, doi: 10.9734/BMRJ/2016/24405

Abstract

Aims: The objective of this work was to provide knowledge about the mechanism and regulation of the mineral phosphate solubilization in *Burkholderia tropica*. To this end, the expression of the direct extracellular oxidative pathway in *B. tropica* was studied using different culture approaches.

Study Design: Plate assays and batch cultures in flasks and bioreactor were carried out in this study with *B. tropica* Mto-293 like target organism. The experiments were achieved at least three times with two repetitions per time.

Place and Duration of Study: Departamento de Química, Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales, UNLP, CCT-La Plata-CONICET, between November 2014-2015.

Methodology: Qualitative plate assays with different Carbon sources were carried out for the evaluation of Mineral Phosphate Solubilization phenotype. Batch cultures in flasks were carried out with different Carbon, Phosphorus and Nitrogen sources to determine quantitatively soluble phosphorus, gluconic acid and other ketoacids in the supernatants, and also PQQ-linked glucose and gluconate dehydrogenase activities in whole cells. Cultures with some of the conditions mentioned before were carried out in bioreactor specifically to control pH. **Results:** This organism was able to produce significant amounts of gluconic acid via the expression of a PQQ-GDH and also showed a significant activity of GaDH. However, the direct oxidative pathway was only observed under conditions of Phosphorus starvation and/or Nitrogen fixation. **Conclusion:** The Mineral Phosphate Solubilization phenotype for *B. tropica* can be ascribed to the expression of the direct oxidative pathway which involves the expression of an active PQQ- linked glucose dehydrogenase. Nevertheless, this pathway is not expressed constitutively in this bacterium. Environmental conditions, like low P and N availability, led to an active extracellular glucose oxidation. Therefore, mineral phosphate solubilization in *B. tropica* involves an inducible pyrroloquinoline quinone-linked glucose dehydrogenase. These findings may contribute to the use of this bacterium as plant growth promoting bacteria reducing the dependence on chemical fertilizer.

He participado en la totalidad de los experimentos realizados para esta publicación así como en su redacción. Este trabajo es el resultado de las tesis de Licenciatura de las alumnas Gimena García-Ferreira y Verónica Guidi que concluyeron en Abril de 2012 y Diciembre de 2013, respectivamente, realizadas bajo mi dirección, íntegramente incluidas en la temática de investigación de la alumna de doctorado Pamela Bernabeu quién condujo la parte experimental de ambas tesinas y contribuyó a la escritura del manuscrito.

8.3 TRABAJOS ENVIADOS Y AUN NO ACEPTADOS PARA SU PUBLICACION.

- 1- 2015 "Contribution of bacterial pyrroloquinoline quinone to mineral phosphate solubilization and to peanut and maize growth promotion by a *Serratia* spp." L M Ludueña, M S Anzuay, J G Angelini, G Barros, M F Luna, M P Monge, AFabra, T Taurian. Enviado a Archives of Microbiology.

Abstract:

Aims. The aim of this study was to analyze if cofactor pyrroquinoline quinone from *Serratia* sp. S119 is involved in the inorganic phosphate solubilization mechanism and in its ability to promote the plant growth.

Methods and Results. Site directed mutagenesis was performed to obtain a *pqqE*- minus mutant of strain *Serratia* sp. S119. The phosphate solubilization ability, gluconate and PQQ production of the mutant *Serratia* sp. RSL*pqqE*- was analyzed. Mutant RSL*pqqE*- showed significant decrease in P soluble and gluconic acid levels produced and undetectable levels of PQQ protein compared with wt strain. Complementation with synthetic PQQ protein restored P solubilization and gluconate production reaching the levels produced by wild-type strain. The effect of the inoculation of the mutant on peanut and maize plants was evaluated in pot assays. Plants growth parameters showed no differences among the different treatments indicating that PQQ from *Serratia* sp. S119 is not involved in the growth promotion of these plants.

Conclusions. PQQ protein is essential for phosphate solubilization ability of *Serratia* sp. S119 but is not required for growth promotion of peanut and maize plants.

Significance and Impact of the Study. This study demonstrates the importance of PQQ in bacterial phosphate solubilization phenotype.

8.4 TRABAJOS TERMINADOS Y AUN NO ENVIADOS PARA SU PUBLICACION.

- 1- 2016 "Identificación y cuantificación de *Burkholderia tropica* inoculada en plantines de tomate (*Lycopersicon esculentum*) variedad platense". García S, Casajus V, Reyes G, Bernabeu P, Ormazabal C, Galar M y Luna M. Para enviar a Revista Argentina de Microbiología.

Resumen:

Con el objetivo de implementar el uso de bacterias endófitas promotoras del crecimiento en cultivos hortícolas, se realizaron ensayos para identificar y cuantificar a *Burkholderia tropica* Mto-293 en raíces de tomate platense como medida de la efectividad de la colonización después de inocular en la etapa inicial del plantín (brotes de 5 días) o en la mitad del ciclo de producción (plantines de 15 días). Los plantines se cultivaron en *speedlings* con sustrato comercial:tierra negra (1:1) en cámara de cultivo. Se tomaron muestras de raíces a distintos tiempos y se analizaron por técnicas dependientes e independientes de cultivo: por macerado de raíces y recuento en placa, y por extracción de ADN del tejido e identificación molecular, respectivamente. Se procesaron raíces no desinfectadas y desinfectadas de plantines de tomate y también de plantas crecidas en condiciones gnotobióticas (condición control de colonización efectiva). Con los resultados permitieron evidenciar que *B. tropica* coloniza eficientemente raíces de plantines de tomate con los dos tipos de inoculación ensayados, presentando una diferencia sólo temporal en la colonización endofítica, resultados altamente promisorios para continuar con ensayos a campo ya que, antes de conferir cualquier efecto beneficioso, las bacterias inoculadas necesitan ser rizósfera y/o rizoplano competentes.

- 2- 2016 "Evaluación de un inoculante experimental a base de *Burkholderia tropica* aplicado en trigo (*Triticum aestivum*) variedad Baguette. Bernabeu P, López A, García S, Carrasco N, Galar M, Boiardi J y Luna MF. Para enviar a Revista Latinoamericana de Microbiología.

Resumen:

Para la utilización de Bacterias promotoras del Crecimiento Vegetal como bioinsumos agrícolas, además de determinar su habilidad para colonizar las plantas inoculadas y de comprobar su efecto beneficioso, es necesario estudiar aspectos prácticos fundamentales para su posible uso, tales como: viabilidad en formulaciones líquidas, habilidad para sobrevivir en las semillas y compatibilidad con agroquímicos. En este trabajo se detalla el comportamiento de *Burkholderia tropica* Mto-293 en relación a los aspectos antes mencionados y a su efecto promotor en el cultivo de trigo. Los resultados obtenidos sustentan la posibilidad de considerar la aplicación de *B. tropica* como promotor de crecimiento en un cultivo de gran interés agronómico como el trigo.

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

No poseo

8.6 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.*

No poseo

9. TRABAJOS DE DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS.

9.1 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.*

No poseo

9.2 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.*

No poseo

9.3 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.*

No poseo

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

No poseo

9.5 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.

-Peticari, Alejandro. INTA-Castelar. apeticari@cnia.inta.gov.ar.

-Balatti Pedro, CIDEFI-CIC, UNLP. pbalatti@gmail.com

10. SERVICIOS TECNOLÓGICOS.

No poseo

11. PUBLICACIONES Y DESARROLLOS EN:

11.1 DOCENCIA

No poseo

11.2 DIVULGACIÓN

No poseo

12. DIRECCION DE BECARIOS Y/O INVESTIGADORES.

DE BECAS

1-Alumno: Bernabeu Pamela

Co-Dirección: Dra. LUNA MARÍA FLAVIA

Tema: "Caracterización de la colonización y promoción del crecimiento de *Burkholderia tropica* en gramíneas" Tipo de Beca: Interna Doctoral CONICET Lugar: CINDEFI, Fac. de Cs. Exactas, UNLP Período: 2012-2017

2- Alumno: Cavello, Ivana

Co-Dirección: Dra. LUNA MARÍA FLAVIA

Tipo de Beca: Posdoctoral de CONICET Lugar: CINDEFI, Fac. de Cs. Exactas, UNLP Período: 2014 – 2015

3- Alumno: Sabrina Soledad García

Co-Dirección: Dra. LUNA MARÍA FLAVIA Tema: "Evaluación de la capacidad de colonización y promoción del crecimiento de *Burkholderia tropica* en trigo y cebada" Tipo de Beca: Interna Doctoral CONICET Lugar: CINDEFI, Fac. de Cs. Exactas, UNLP Período: 2014-2019

4- Alumno: López Ana Clara

Co-Dirección: Dra. LUNA MARÍA FLAVIA Tema: Selección de un consorcio de microorganismos nativos de la provincia de misiones con capacidad antifúngica y fertilizante aplicable al mejoramiento del cultivo de yerba mate tipo de beca: Interna Doctoral CONICET Lugar: Instituto de Biotecnología Misiones "María Ebe Reca" (INBIOMIS) perteneciente a la Universidad Nacional de Misiones. Período: 2015-2020

5- Alumno: Victoria Casajús

Dirección: Dra. LUNA MARÍA FLAVIA

Tema: "Dinámica de las poblaciones de *Burkholderia tropica* inoculada en tomate"

Tipo de Beca: Entrenamiento-CIC Lugar: CINDEFI, Fac. de Cs. Exactas, UNLP. Período: 2015-2016

6- Alumna: Gisella Reyes. Beca en el marco del Proyecto Formativo de Becas otorgadas por la Secretaría de Asuntos Estudiantiles de la Fac. de Cs. Exactas-2015. Duración: 12 meses. Lugar: CINDEFI, Fac. de Cs. Exactas, UNLP

13. DIRECCION DE TESIS

Doctorales

1-Alumno: Bernabeu Pamela

Dirección: Dra. LUNA MARÍA FLAVIA Lugar: Fac. de Cs. Exactas, UNLP-CINDEFI Período: 2012-2017

2- Alumno: Sabrina Soledad García

Dirección: Dra. LUNA MARÍA FLAVIA Lugar: CINDEFI, Fac. de Cs. Exactas, UNLP Período: 2014-2019

3- Alumno: López Ana Clara

Co-Dirección: Dra. LUNA MARÍA FLAVIA Lugar: INBIOMIS Período: 2015-2020

De grado

1- Alumno: Ana López

Dirección: Dra. LUNA MARÍA FLAVIA. Tema: "Colonización y supervivencia de *Burkholderia tropica* en trigo" Lugar: CINDEFI, Fac. de Cs. Exactas, UNLP Inicio: Junio 2013. Aprobada: Abril 2014, Trabajo Final de Laboratorio de Procesos biotecnológicos para la Lic. en Biotecnología UNLP. Calificación: 10 (diez)

2- Alumno: Sofía Tesler

Dirección: Dra. LUNA MARÍA FLAVIA. Tema: "Evaluación de la capacidad de formación de biofilm de *Burkholderia tropica*, una bacteria promotora del crecimiento vegetal" Lugar: CINDEFI, Fac. de Cs. Exactas, UNLP Inicio: Junio 2013 Aprobada: Abril 2014, Trabajo Final de Laboratorio de Procesos biotecnológicos para la Lic. en Biotecnología UNLP Calificación: Sobresaliente 10 (diez)

3- Alumno: Estefanía Cagnola

Dirección: Dra. LUNA MARÍA FLAVIA Tema: "Enzimas hidrolíticas de polisacáridos vegetales producidas por *Burkholderia tropica*, bacteria endófito promotora del crecimiento vegetal" Lugar: CINDEFI, Fac. de Cs. Exactas, UNLP Inicio: Noviembre 2013 Aprobada: Julio 2015, Trabajo Final de Laboratorio de Procesos biotecnológicos para la Lic. en Biotecnología UNLP Calificación: Sobresaliente 10 (diez)

14. 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.

1- X Congreso Argentino de Microbiología General. Sociedad Argentina de Microbiología General "SAMIGE". Presentación de Panel: "Biofilm formation by the plant growth promoting bacteria *Burkholderia tropica*" Tesler S, López A, Bernabeu P, Ormazabal C, García S, Cattelan N, Prieto C, Luna MF. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina, del 2 al 4 de Julio de 2014.

2- II Workshop Latinoamericano sobre PGPR. Presentación de Panel: "Colonization and plant growth promotion of wheat by *Burkholderia tropica*" Bernabeu P, Guidi V, López AC, García S, Tesler S, Carrasco N, Galar ML, Boiardi JL, Luna MF. La Falda, Córdoba, Argentina, del 21 al 26 de Septiembre de 2014.

3- Segundo Congreso de Foro de Universidades Nacionales para la Agricultura Familiar. Validación de un inoculante a base de bacterias promotoras de crecimiento, como alternativa al uso de agroquímicos en tomate platense (*Lycopersicon esculentum var platense*). Organizado por Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico para la Agricultura Familiar. Jujuy, Argentina. Presentación oral. Luna MF, García S, Bernabeu P y De Luca L.

4- V Congreso Latinoamericano de Agroecología. Sociedad Científica Latinoamericana de Agroecología (SOCLA). Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Octubre 2015. López AC, García SS, Bernabeu PR, Casajús V, Chávez Montes E, Ormazabal C, Cavello I, Cagnola ES, Galar ML, De Luca LC, Boiardi JL, Luna MF. "Diversidad microbiana y productividad de tomate asociadas a la bioestimulación como estrategia de transición agroecológica". Presentación de panel.

5- XI Congreso Argentino de Microbiología General. Sociedad Argentina de Microbiología General (SAMIGE). Córdoba, Argentina. Agosto 2015. García SS, Bernabeu PR, Boiardi JL, Luna MF. "Colonization patterns of the N_2 -Fixing bacteria *Burkholderia tropica* in barley". Presentación de panel.

6- "11 Fiesta del tomate platense 2015", "Aplicación de inoculantes a base de bacterias promotoras del crecimiento vegetal para mejorar la producción de tomate", correspondiente al proyecto-CIC 2014-2015 realizado en campo de productora Susana Parrillo. Asistencia y presentación de panel. La Plata, Bs. As., 7 de Febrero de 2015.

7- Congreso SAIB 2015, Noviembre de 2015, Mar del Plata. López AC, Alvarenga AE, Sawostjanik ASS, Sadañoski MA, Luna MF, Zapata PD, Villalba L. Characterization of fungal strains as potential biological control for *Ilex paraguariensis* crops. Presentación de panel

Asistencia a Jornadas y Talleres

1- IV Jornadas de Microbiología de Suelos para una Agricultura Sustentable (2014), en la Unidad Integrada Balcarce entre el INTA y la Fac. de Cs. Agrarias, 6 y 7 de Marzo de 2014.

2- 4º Jornadas de Agricultura familiar 2014, Asistencia. Fac. de Agronomía, La Plata, Bs. As., Agosto 2014.

3- "V Jornadas de Enfermedades y Plagas de Cultivos Bajo Cubierta", Fac. de Cs. Agrarias y Forestales UNLP, 6 y 7 de Mayo de 2015.

- 4- "5° Jornadas de Agricultura Familiar", Fac. de Cs. Veterinarias-UNLP, 12 de Agosto de 2015. Asistencia.
- 5- Seminario de "Microorganismos benéficos. Biología y uso en la Horticultura". Asociación Ing. Agrónomos del Cinturón Hortícola de La Plata, 30 de Setiembre 2015.
- 6- Taller de Agromicrobiología 2015, IBBM CCT La Plata, CONICET-UNLP, 20 y 21 de Octubre de 2015.

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

- 1- Curso: "Claves para el armado de proyectos sociales. 2da edición". 4 encuentros de 3 hs cada uno. Organizado por Secretaría de Extensión-FCE-UNLP. Asistencia. 2015
- 2- Curso: "Aulas abiertas en el nivel superior: Gestión de un curso virtual con Moodle 2.X como apoyo a la actividad educativa". 4 encuentros de 3 hs cada uno. Organizado por FCE-UNLP, ADULP.

16. SUBSIDIOS RECIBIDOS EN EL PERIODO.

- Subsidio automático anual para investigadores Adjuntos-CIC Años 2014/2015
- Subsidio para Organización de Reuniones Científicas
Institución otorgante: CIC. Año 2015 como Presidente de la Comisión Organizadora de la "V Jornada Bonaerense de Microbiología de Suelos para una Agricultura Sustentable" a realizarse en La Plata, el 30 de Junio/1 de Julio de 2016 y avalada por las Fac. de Ciencias Exactas y Ciencias agrarias y Forestales de la UNLP.
- Subsidios en relación al Convenio de vinculación tecnológica con YPF. Aprobado por CONICET diciembre 2012. Duración 12 meses entre 2013-2014 Proyecto: Solubilización de Fósforo de un mineral de baja ley por acción microbiana. Función: Integrante. Responsables del proyecto: Dr E. Donati y Dr JL Boiardi.
- Subsidios en relación al proyecto "Desarrollo biotecnológico para la producción orgánica de tomate bajo cubierta mediante la aplicación de inoculantes a base de bacterias diazótrofes endófitas promotoras del crecimiento vegetal: Gluconacetobacter diazotrophicus y Burkholderia tropica.
Institución otorgante: CIC-PBA Período 2014-2016. Lugar de trabajo: CINDEFI
Función: Directora
Proyecto seleccionado para el otorgamiento de Beca en el marco del Proyecto Formativo de Becas otorgadas por la Secretaria de Asuntos Estudiantiles de la Fac. de Cs. Exactas-2015.
- Proyecto: Utilización de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno como Inoculantes en cultivos de interés agronómico X617, Institución otorgante: UNLP. Período: 2012-2015. Función: Co-Director, Lugar de trabajo: CINDEFI

17. OTRAS FUENTES DE FINANCIAMIENTO.

No poseo

18. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO.

No poseo

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

No poseo

20. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO.

DOCENCIA DE GRADO

- Docente del Área de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Exactas-UNLP. Participo en el dictado de las Asignaturas: Bioindustrias Alimenticias (primer semestre) y Biotecnología I (segundo semestre). La carga horaria de estos cursos es de 9 hs semanales, correspondiente a seminarios y TPs. El cargo que ocupé en el período informado fue el de Jefe de Trabajos Prácticos Dedicación Exclusiva Ordinario; Cátedra: Area Biotecnología, Fac. de Cs. Exactas (UNLP); Periodicidad: Agosto 2007- hasta el presente.

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

- 1- Investigador responsable en "Convenio de vinculación y cooperación técnica"

Objetivo: Desarrollo de una tecnología para inoculación en gramíneas con Bacterias Promotoras del crecimiento vegetal.

Instituciones beneficiarias: CINDEFI y Estación Experimental Agropecuaria Integrada Barrow, INTA – MAA, Tres Arroyos, Pcia Bs. As. Período: 2011-2013 con Renovación 2014-2019

Investigador responsable CINDEFI: Dra. Luna M. Flavia Integrante CINDEFI: Bernabeu Pamela

Investigador responsable INTA MAA: Ing. Agr. M.Sc. Natalia Carrasco

2-Proyecto: Utilización de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno como Inoculantes en cultivos de interés agronómico X617, UNLP Período: 2012-2015 Función: CO-DIRECTORA Lugar de trabajo: CINDEFI

3- Miembro de la Comisión asesora que juzgó la tesina de grado de la carrera de Licenciatura en Biotecnología y Biología Molecular de la alumna Mariana Fernández Preisseger, en la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Abril de 2014.

-Miembro de la Comisión asesora que juzgó la tesina de grado de la carrera de Licenciatura en Biotecnología y Biología Molecular de la alumna Mariana Leguizamón, en la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Marzo de 2015.

-Miembro de la Comisión asesora que juzgó la tesina de grado de la carrera de Licenciatura en Biotecnología y Biología Molecular del alumno Ignacio Villa Monte, en la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Mayo de 2015.

Miembro de la Comisión asesora que juzgó la tesina de grado de la carrera de Licenciatura en Biotecnología y Biología Molecular del alumno Maximo Simonetti, en la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Julio de 2015.

-Miembro de la Comisión Asesora correspondiente al concurso de un cargo de JTP (DS) Área Biotecnología (Expte. 700-15939/13), Julio de 2015.

4- Profesor Invitado para dictar Conferencia sobre: "Inoculantes de aplicación en la Agricultura". Cátedra de Biotecnología en Alimentos, Universidad de San Martín (UNSAM). Mayo de 2015.

5- Evaluador: 2014 Evaluador de 10 trabajos presentados al 1st Biotechnology World Symposium, Octubre de 2014, Txlala, Mexico, Instituto Politecnico Nacional

2014 Evaluador de manuscritos en revista internacional *Acta Physiologiae Plantarum*, ISSN 0137-5881

2015 Evaluador de manuscritos en revistas internacionales: *Annals of Microbiology*, ISSN 1590-4261; *British Microbiology Research Journal*

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

El plan de trabajo propuesto para el próximo período corresponde a la temática *CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL (BPCV) ENDÓFITAS Y APLICACIONES* y está acorde al proyecto de la UNLP ya aprobado para el periodo 2016-2019 y del cual soy Directora, en el tema: "MEJORAMIENTO DEL CULTIVO DE TOMATE BAJO CUBIERTA MEDIANTE LA APLICACIÓN DE INOCULANTES A BASE DE BACTERIAS DIAZÓTROFAS ENDÓFITAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL"

Acorde con los Objetivos General y específicos planteados en el plan de trabajo correspondiente al proyecto del próximo período, se detalla a continuación la experimentación que se propone realizar:

1-Actividades de cultivo de microorganismos:

-Continuar con los estudios de crecimiento de *B. tropica* en biorreactores para caracterizar fisiológicamente al microorganismo en lo que respecta al proceso de Fijación Biológica de Nitrógeno y a la eficiencia de crecimiento en estas condiciones.

-Continuar con el estudio de supervivencia de las células microbianas en suspensiones acuosas (potenciales formulaciones comerciales), intentando desarrollar formulaciones acuosas que permitan mantener elevados recuentos celulares por períodos de tiempo del orden de los 12 meses, empleando soportes naturales como afrecho y cáscara de limón.

2-Actividades de cultivo de plantas:

-Continuar con la evaluación de la dinámica de las poblaciones (del rizoplaneo y endofítica) del inoculante a base de *B. tropica* aplicado en tomate bajo distintas condiciones de inoculación, en muestras de tejidos de plantas crecidas en *condiciones gnotobióticas* como *en plantines con sustrato comercial no estéril* crecidos en el invernadero del laboratorio y *en muestras de plantas crecidas en condiciones de producción en invernadero*. Aplicación de técnicas de biología molecular que permitan detectar los microorganismos inoculados por extracción directa de ácidos nucleicos y determinación del perfil genético de la comunidad bacteriana empleando PCR-DGGE para evaluar la incidencia del

microorganismo inoculado sobre la población nativa. Continuar con los estudios de colonización de tomate por *B. tropica* para su evaluación por técnicas de microscopía de fluorescencia y confocal.

-Diseño de primers y puesta a punto de la cuantificación de *B. tropica* en muestras de plantas crecidas en condiciones gnotobióticas por PCR cuantitativa (qPCR) pretendiendo luego poder cuantificar a las bacterias en estudio en muestras de plantines crecidos en condiciones de producción para poder relacionar el efecto beneficioso con la presencia de las mismas.

-Secuenciación del genoma de *B. tropica* (a través de una colaboración con el Dr. -Mariano Pistorio-IBBM, UNLP) y, a través del diseño de primers específicos, generar mutantes de *B. tropica* para bloquear diversas funciones relacionadas con el proceso de colonización tal como la producción de Exopolisacáridos, la síntesis de enzimas líticas, entre otras, con el objetivo de caracterizar su interacción con plantas de diferentes cultivos como modelo de bacteria endófito.

-Continuar la caracterización de *B. tropica* en lo referido a estudios de colonización en condiciones gnotobióticas con la cepa salvaje y con los mutantes obtenidos en el punto anterior.

-Comenzar con estudios *in vivo* en invernadero para evaluar la capacidad de biocontrol de *B. tropica* en ensayos de competencia, resistencia sistémica inducida y otros.

-Continuar con el estudio de supervivencia de las células microbianas en suspensiones acuosas (potenciales formulaciones comerciales), intentando desarrollar formulaciones acuosas que permitan mantener elevados recuentos celulares (superiores a 1×10^9 bacterias/ml) por períodos de tiempo del orden de los 12 meses, empleando soportes naturales como afrecho y cáscara de limón.

-Evaluación del efecto promotor del crecimiento del inoculante a base de *B. tropica* aplicado para el mejoramiento de cultivos de *tomate platense* bajo cubierta en condiciones de producción. Se evaluará la promoción del crecimiento en dos estadios de la planta: 1- en la etapa de plantín inoculando semillas germinadas; 2- en la etapa de planta productora inoculando los plantines al trasplante y, si las condiciones del ensayo lo permiten, también en el surco. La primera etapa se llevará a cabo en el invernadero del Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI-La Plata) y la segunda etapa se realizará en campos de productores con la idea de mejorar la producción de hortalizas en un marco de sustentabilidad ambiental.

Todas las tareas propuestas están/estarán incluidas dentro de los planes de trabajo de las tesis de doctorado, postdoctorado o tesis de grado a realizarse en el próximo período y que estén bajo mi supervisión.

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:
- Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 22).
 - 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"
 - Informe del Director de tareas (en los casos que corresponda), en sobre cerrado.
- B. Envío por correo electrónico:
- Se deberá remitir por correo electrónico a la siguiente dirección: infinvest@cic.gba.gob.ar (puntos 1 al 22), en formato .doc zipeado, configurado para papel A-4 y libre de virus.
 - 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.

C. Sistema SIBIPA:

a. Se deberá petitionar el informe en la modalidad on line, desde el sitio web de la CIC, sistema SIBIPA (ver instructivo).

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.