

CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO Informe Científico¹

PERIODO ²: 2014

Legajo N°:

1. DATOS PERSONALES

APELLIDO: Mendieta

NOMBRES: Julieta Renée

Dirección Particular:

Localidad: Mar del Plata

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

2. TEMA DE INVESTIGACION

Aplicaciones biotecnológicas del inhibidor de proteasas tipo germina (IPG). Análisis de su actividad antimicrobiana y antitumoral

3. DATOS RELATIVOS A INGRESO Y PROMOCIONES EN LA CARRERA

INGRESO: Categoría: Asistente *Fecha:* 1/7/2010

ACTUAL: Categoría: Asistente *desde fecha:* 1/7/2010. Se accedió a la categoría de Investigador Adjunto sin director (2015), en espera del nombramiento

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: Laboratorio "Degradación de Proteínas"

Otros:

Dirección: Calle: Funes N°: 3550

Localidad: Mar del Plata *CP:* 7600 *Tel:* 4753030

Cargo que ocupa: Investigador Asistente CIC-BA

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

Apellido y Nombres: Rubén Danilo

Dirección Particular:

Localidad: Mar del Plata

Dirección electrónica: rdconde@mdp.edu.ar

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

.....
Firma del Investigador

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.

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.

A continuación se expone la labor desarrollada en el periodo enero-diciembre 2014. Cabe destacar que dicha labor se compone de dos proyectos de investigación: uno correspondiente a un proyecto de ciencia básica con posible aplicación a mediano/largo plazo correspondiente al plan de investigación con el cual ingresé a la CIC como investigadora asistente y un segundo proyecto de tipo I+D llevado a cabo de forma paralela en colaboración con la Dra. Casalongué.

Título de proyecto presentado para ingreso a carrera CIC: Aplicaciones biotecnológicas del inhibidor de proteasas tipo germina (IPG). Análisis de su actividad antimicrobiana y antitumoral

Título del tema investigado: Estudio de las propiedades antimicrobianas y los efectos sobre células de mamíferos del Inhibidor de Tripsina tipo Germina de Trigo (IPG)

Objetivo General: Analizar las propiedades antimicrobianas de la proteína IPG recombinante, analizar su rol bajo condiciones de estrés y evaluar su potencialidad en aplicaciones nanobiotecnológicas.

- Inhibidor de proteasas tipo germina de trigo (IPG)

El Inhibidor de Proteasas tipo Germina (IPG) es un inhibidor de tripsina que se aisló en nuestro laboratorio a partir del fluido extracelular de hojas de trigo y su segmento N-terminal resultó ser homólogo a una *Germin-like Protein* (GLP). Este inhibidor presenta además, otras actividades enzimáticas como superóxido dismutasa (SOD) y actividad de adenosina difosfato glucosa pirofosfatasa (AGPP), caracterizando a esta proteína como una proteína multifuncional. Estas características multifuncionales, han permitido caracterizar a IPG como una proteína antimicrobiana (objetivo presentado en informes anteriores). Con el propósito de avanzar en el proyecto de investigación se han planteado los siguientes objetivos:

OBJETIVO 1: Producir en forma recombinante la IPG de trigo (IPGr) (este objetivo fue informado parcialmente en el informe anterior y ha sido completado este período)

OBJETIVO 2: Analizar *in vitro* el efecto antifúngico del IPGr sobre esporas de *F. solani*, comparativamente con IPG (este objetivo fue informado parcialmente en el informe anterior y ha sido completado este período).

OBJETIVO 3: Analizar la capacidad de la proteína IPG de proteger a las plantas del ataque de patógenos vegetales (objetivo desarrollado en este período).

OBJETIVO 4: Analizar el efecto del estrés salino sobre la proteína IPG en plántulas de trigo

OBJETIVO 5: Desarrollar nanoarcillas compuestas incorporando a la proteína IPG para evaluar sus potenciales biotecnológicas (objetivo desarrollado en este período)

En resumen y tal como se describirá a continuación, los objetivos propuestos en el informe anterior fueron completados en su totalidad. Además, en este periodo también ha sido posible plantear y llevar a cabo dos nuevos objetivos (objetivos 3, 4 y 5).

OBJETIVO 1 y 2

- Obtención de IPGr y análisis de la actividad antifúngica sobre esporas de *F. solani*.

La secuencia de cDNA correspondiente al ORF de la proteína IPG se disponía clonada en el vector de expresión pET24b, denominado pETIPG22. Tanto pET24b como pETIPG22 se utilizaron para transformar células de *E. coli* BL21(DE3), a partir de los cuales se crecieron las bacterias en medio no-inductor compuesto según Studier (2005). La purificación de IPGr se realizó lisando las bacterias, calentando el material resultante a 70 °C durante 30 minutos y se lo sembró en una columna de níquel Ni-NTA (Invitrogen).

Se estudió comparativamente el efecto antifúngico de IPGr con el efecto observado para IPG nativa sobre la germinación de esporas de *F. solani*. Si bien se registró un mínimo porcentaje de esporas germinadas (~5%), el porcentaje de esporas cuya germinación se vio inhibida fue del ~90%, tras el tratamiento con 0,24 µg/µl IPGr. Los resultados obtenidos en cuanto al efecto inhibitorio de IPGr y de IPGr70° sobre la germinación de esporas de *F. solani* indica que la proteína IPG obtenida de manera recombinante posee un efecto antifúngico comparable al observado con IPG.

Estos resultados dieron lugar a una presentación a congreso (SAMIGE 2014, ver sección 7.5: COMUNICACIONES) y a un manuscrito en las etapas finales para ser enviado a International Journal of Macromolecules (ver sección 7.4 TRABAJOS TERMINADOS Y AUN NO ENVIADOS PARA SU PUBLICACION).

OBJETIVO 3:

Teniendo en cuenta que IPG es capaz de producir una inhibición en la germinación de las esporas y un retraso en el crecimiento de las hifas de *F. solani* en ensayos *in vitro*, se propuso realizar un ensayo *in vivo* con el fin de evaluar el efecto de IPG sobre la capacidad infectiva de *F. solani* en plántulas de tomate. Se llevó a cabo un bioensayo según describe Mansilla y col (2013) donde una suspensión de esporas previamente tratadas durante 16 horas con 0.1, 0.5 y 1 µg/µl de IPG se utilizó para infectar plántulas de tomate. Los tratamientos realizados con las mismas concentraciones de IPG pero en ausencia del patógeno no evidenciaron síntomas de infección sobre los cotiledones lo que indica que IPG no afecta el estado general del cotiledón. Por otra parte, *F. solani* es capaz de infectar cotiledones de tomate, visualizándose notorios síntomas de infección en los tratamientos sin IPG. La cuantificación del área afectada mostró que el ~70% del cotiledón presentó síntomas de infección. Si bien se obtuvieron resultados similares para la condición de 1 µg/µl de IPG, fueron completamente diferentes para el caso del tratamiento con 0.5 µg/µl de IPG. En este último caso, el área afectada del cotiledón fue menor al 5 %. Por lo tanto, IPG ejerce un efecto sobre la infección de esporas de *F. solani* en cotiledones de tomate, siendo la concentración de 0.5 µg/µl de IPG, la cual logra revertir los síntomas de infección.

Estos resultados dieron lugar a una presentación a congreso (Congreso Latinoamericano XXX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal 2014, ver sección 7.5: COMUNICACIONES) y forma parte del manuscrito que será enviado a International Journal of Macromolecules (ver sección 7.4 TRABAJOS TERMINADOS Y AUN NO ENVIADOS PARA SU PUBLICACION).

OBJETIVO 4:

Con el objetivo de analizar el efecto del estrés salino sobre la proteína IPG en plántulas de trigo, se evaluaron los niveles de IPG en plántulas sometidas a estrés salino mediado por NaCl. Se demostró que los niveles de IPG se modificaron diferencialmente en los fluidos extracelulares de la primera y segunda hoja de las plántulas sometidas a salinidad. Además, la proteína IPG se identificó a partir de fracciones enriquecidas en componentes de la pared celular y sus niveles aumentaron por la salinidad. Dichos cambios se asociaron también, a la actividad SOD y de inhibidor de proteasas. Por ensayos de inmunolocalización se reveló, respecto a las plantas controles, una alta acumulación de IPG en las paredes celulares del tejido parenquimático presente en la primera y segunda hoja provenientes de plantas sometidas a estrés salino. Si bien se detectó un aumento en el contenido de prolina en las hojas de plantas estresadas respecto a los controles, no se modificaron los niveles de ácido ascórbico y GSH.

Estos resultados dieron lugar a una presentación a congreso (Congreso Latinoamericano XXX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal 2014, ver sección 7.5: COMUNICACIONES) y forma parte de un manuscrito que será enviado a Journal of Experimental Botany (ver sección 7.4 TRABAJOS TERMINADOS Y AUN NO ENVIADOS PARA SU PUBLICACION).

OBJETIVO 5:

Las propiedades múltiples de la proteína IPG la convierten en una molécula con potenciales aplicaciones nanobiotecnológicas. Las nanopartículas más utilizadas para la vehiculización de compuestos son los silicatos laminares denominados arcillas. La utilización de la bentonita es estratégica debido a su bajo costo, su abundancia natural y su alta resistencia tanto mecánica como química. La Argentina es uno de los pocos países del mundo que posee arcillas de tipo bentonita. Las enzimas inmovilizadas en nanopartículas también muestran una alta movilidad y actividad, sugiriendo que las moléculas no están unidas rígidamente a los materiales de apoyo. Un requerimiento importante para la inmovilización de las proteínas es que el soporte debe ser

biocompatible e inerte para que no interfiera con la estructura nativa de la proteína, porque esto podría comprometer su actividad biológica, todo esto se da en el caso de la bentonita.

En una primera etapa y en el marco del proyecto de investigación de la Dra. Mansilla (investigadora CONICET), se estudió la factibilidad de intercalar la proteína IPG en los espacios interlaminares de una bentonita sódica de origen nacional (BENT) y de la misma modificada químicamente con bromuro de dimetil dioctadecil amonio (DDA-BENT). El método utilizado para inmovilizar a la proteína IPG en las arcillas fue el de adsorción. La cantidad de proteína intercalada en cada uno de las arcillas se estimó mediante la cuantificación de proteína antes y después de la adsorción. Las eficiencias de intercalación estimadas fueron de aproximadamente 82,7 % y 91,7 % para la BENT y la DDA-BENT, respectivamente. Mediante ensayos de Difracción de Rayos X (DRX) se determinó que el espaciado basal entre las láminas de BENT con IPG resultó ser de 14,75 Å, mientras que para la bentonita sin modificar dicho parámetro tuvo un valor de 12,75 Å. En el caso de DDA-BENT con IPG el espaciado interlaminar fue de 15,55 Å, mientras que para la arcilla DDA-BENT original era de 17,63 Å. La variación del espaciado interlaminar de las arcillas luego de la modificación con IPG indicaría que, en ambos casos, la proteína se intercaló y se encuentra alojada en los estratos de la arcilla. Además, la presencia de IPG en las arcillas modificadas fue corroborada por ensayos de western-blot.

Para avanzar en los estudios funcionales, se analizó el efecto de IPG inmovilizada en las arcillas sobre la germinación de las esporas del hongo fitopatógeno *F. solani*. El tratamiento de las esporas del hongo con 0.05 mg/ml de los complejos arcillas-IPG, produjo una reducción significativa en el número de esporas germinadas.

Los resultados obtenidos hasta el momento son promisorios para ahondar en los estudios funcionales de las arcillas modificadas. Estos estudios nos permitirán avanzar en la posible aplicación de estos nuevos nanomateriales de precisa funcionalidad biológica y alta estabilidad química en el campo de la agronomía. Los datos obtenidos han dado lugar a una presentación a congreso (II Workshop de Nanoarcillas y sus aplicaciones, 2014, ver sección 7.5: COMUNICACIONES)

AVANCES EN EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN DE BASE CIENTÍFICO-TECNOLÓGICA

Se han realizado experimentos en el marco de un proyecto en colaboración con la Dra. Casalengué (directora del grupo de investigación “Fisiología del estrés en plantas” del IIB-UE-CONICET-Universidad Nacional de Mar del Plata). La Dra. Casalengué se encuentra desarrollando un proyecto ANPCyT PICT-Bicentenario 0746 sobre Temas Prioritarios de Impacto Regional denominado “*Valoración de desechos pesqueros para la obtención de derivados de quitina y su aplicación como compuestos bioactivos en plantas*”. La colaboración con nuestro grupo se estableció por el interés de evaluar el efecto de los quitosanos, compuestos inocuos, biodegradable y con un gran potencial de aplicación en el campo de la agronomía, sobre el trigo, un cultivo de sumo interés agronómico en nuestra región. Los resultados hasta el momento son prometedores ya que indican que el tratamiento con quitosano de las semillas de trigo, acelera significativamente la germinación y potencian el crecimiento de plántulas de trigo.

Por otra parte, los avances en este proyecto han permitido presentar un plan de trabajo al PREMIO SENASA a la INVESTIGACION, TRANSFERENCIA Y COMUNICACIÓN 2014-2015. El objetivo de dicho proyecto se basa en que el uso excesivo de agroquímicos fuertemente tóxicos conlleva a un impacto ambiental negativo tanto en zonas semi-urbanas como rurales ocasionando además, complicaciones sanitarias a la población. El proyecto promueve el desarrollo de conocimiento y resultados científicos referidos tanto a la obtención como aplicación de quitosano (Q) y oligoquitosano (OQ) como fuente de elicitors o inductores de defensa frente a hongos o bacterias fitopatógenas. Las potencialidades de dichos compuestos para el desarrollo de nanopartículas (NPQ) que permitan el encapsulamiento de la proteína antimicrobiana denominada IPG, mejorando y potenciando su disponibilidad y efectividad en los sistemas biológicos, constituirá además, un resultado altamente original.

Además, la Dirección Nacional de Desarrollo Universitario y Voluntariado dependiente del Ministerio de Educación ha financiado un proyecto presentado titulado “*Productos fitosanitarios*”, durante el año 2014. Se propone la obtención de quitosano y oligoquitosano a partir de exoesqueletos de langostinos y camarones como potenciadores del crecimiento y la respuesta de defensa frente al ataque de patógenos en cultivos hortícolas. Se compararán sus acciones biológicas en plantas como potenciadores del crecimiento y rendimiento de plantas de papa y tomate y su acción fitosanitaria contra estrés biótico. Con el fin de aportar resultados fácilmente transferibles en el mediano plazo al sistema productivo se plantean ensayos en diferentes escalas de producción

Paralelamente, estos antecedentes permitieron formular un proyecto que está siendo financiado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (periodo 2014-2015, PICT 2013-2693), “**Valoración y estudio de compuestos antimicrobianos de origen biológico con alto valor agregado para fines de aplicación en agrobiotecnología**” y por la Universidad Nacional de Mar del Plata “Estudios y desarrollo de formulaciones basadas en recursos naturales para su utilización como agroinsumos.” (ver sección 15: SUBSIDIOS RECIBIDOS EN EL PERIODO y 16: OTRAS FUENTES DE FINANCIAMIENTO). El avance tecnológico de este proyecto se ve reflejado en varios convenios de investigación y desarrollo con empresas privada (ver sección 8.4: OTRAS ACTIVIDADES TECNOLÓGICAS CUYOS RESULTADOS NO SEAN PUBLICABLES).

Desde el punto de vista del avance científico, este proyecto de I+D a dado lugar a un trabajo científico enviado a para su publicación a Pest Management Science (ver sección 7.3: TRABAJOS ENVIADOS Y AUN NO ACEPTADOS PARA SU PUBLICACIÓN).

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.*

Acta Histochemica 117 (2015) 126–135

Liver damage and caspase-dependent apoptosis related to protein malnutrition in mice: Effect of methionine

Verónica J. Caballero, Julieta R. Mendieta, Daniel Lombardo, Miguel Saceda, José Antonio Ferragut, Rubén D. Conde, Ana M. Giudici

This study aimed to determine whether the effects on the mouse liver caused by three periods of feeding a protein-free diet for 5 days followed by a normal complete diet for 5 days (3PFD-CD) are prevented by a constant methionine supply (3PFD + Met-CD). The expressions of carbonic anhydrase III (CAIII), fatty acid synthase (FAS), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and glutathione S-transferase P1 (GSTP1) were assessed by proteomics and reverse transcriptase-polymerase chain reactions. The liver redox status was examined by measuring the activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), as well as protein carbonylation. Because oxidative stress can result in apoptosis, the activity and content of caspase-3, as well as the x-linked inhibitor of the apoptosis protein (XIAP) and mitochondrial caspase-independent apoptosis inducing factor (AIF) contents were assessed. In addition, the liver histomorphology was examined. Compared to the controls fed a normal complete diet throughout, feeding with 3PFD-CD increased the FAS content, decreased the CAIII content, decreased both the SOD and CAT activities, and increased protein carbonylation. It also activated caspase-3, decreased the XIAP content, decreased the AIF content, increased the number of GSTP1-positive foci and caspase-3-positive cells, and caused fatty livers. Conversely, the changes were lessened to varying degrees in mice fed 3PFD + Met-CD. The present results indicate that a regular Met supply lessens the biochemical changes, damage, and caspase-dependent apoptosis provoked by recurrent dietary amino acid deprivation in the mouse liver.

Participé activamente en el diseño y ejecución de los ensayos de laboratorio con el fin de evaluar el efecto de la malnutrición proteica sobre la apoptosis de hepatocitos dependiente de caspasas. Entre las variables estudiadas se determinó el aminoácido metionina. Además colaboré en la redacción y corrección del manuscrito.

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.*

- "Assessment of chitosan plus Mancozeb combined action to control late blight in potato".
Sebastián D'Ippólito, Claudia V. Tonón, Andrea Y. Mansilla, **Julieta R. Mendieta**, Liliana Albertengo, María S. Rodríguez, Claudia A. Casalongué.

ABSTRACT

BACKGROUND: Late blight, caused by the oomycete, *Phytophthora infestans* (*P. infestans*) is an important devastating disease of potato plants. Traditional approaches for controlling late blight have included toxic and chemical compounds. However, current research is ongoing in identifying sustainable options. The objective of this work was to development a less aggressive alternative of the synthetic fungicide Mancozeb to control late blight in potato. **RESULTS:** The combined effect of a water soluble chitosan LMWCh (Low Molecular Weight Chitosan) with Mancozeb at subinhibitory doses was analyzed on *P. infestans* radial growth. The effectiveness of reduced doses of LMWCh and Mancozeb applied individually or in combination to control late blight was evaluated in potato detached leaves. The combination of 0.25 mg ml⁻¹ LMWCh plus 0.08 mg ml⁻¹ Mancozeb controlled much more efficiently the injury area than single compounds. The residual inoculum of *P. infestans* spores was lower in LMWCh plus Mancozeb-treated leaf compared with their corresponding single treatments. The combined solution provoked a significant accumulation of defense-related protein chitinase, bringing to light a putative mediated mechanism of action on potato leaves. **CONCLUSION:** The high efficiency of LMWCh plus Mancozeb confers possibilities for a sustainable approach to pest management in the field

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

- 1) "A multifunctional germin like protein purified of wheat intercelular fluid exerts antimicrobial activity against plant pathogens"
Marchetti MF, Mansilla AY, Conde RD, **Mendieta JR**

Abstract: The wheat leaf apoplast contains a protein that inhibits trypsin and belongs to the family of germin-like proteins called GLPI. Since it was first described in our laboratory, the objective of this work was to determinate the antimicrobial activity of GLPI against plant pathogens. It was found that GLPI restrains the growth of *F. solani* and *P. infestans*. The IC₅₀ (dose needed to reduce the reproductive structures germination by 50 %) were 720 µg/ml and 130 µg/ml for *F. solani* and *P. infestans*, respectively. Also, GLPI restrained the growth of *Pseudomonas syringae* cells taken at exponential growth and incubated in fresh medium for 24 h at 30 °C. Assessed by optical density, GLPI IC₅₀ was 52 µg/ml, which is 13.8 and 2.5 lower than those of *F. solani* and *P. infestans*, respectively. Then these data reveal that GLPI has an important antimicrobial capacity against different plant pathogens. Additionally, GLPI exerts its microbicide ability by interacting with plasma membrane since the fluorogenic dye SYTOX Green was up taken and fluoresced on binding to DNA. This study contributes

to the characterization of the emerging family of germin-like protein that inhibits trypsin and emphasizes their role in plant resistance against fungal attack.

Este manuscrito será enviado a la brevedad para su publicación a International Journal of Macromolecules

2) “Salt stress activities and subcellular localization of a Germin-like Protein in wheat leaves”

Mendieta JR*, Mansilla AY*, Paris R, Lombardo C, Bartoli C, Casalongue CA. *Colaboraron de igual manera

Soil salinity impacts negatively on the yield of most crops. High concentrations of salts in the soil make it harder for roots to extract water and have an immediate effect on cell growth and its associated metabolism. Global genes expression analysis in different plant species has revealed that many genes belonging to the protein multigenes family known as Germin-Like Proteins (GLPs) are regulated following abiotic and biotic stresses. A multifunctional and extracellular GLP from apoplast called GLPI has been characterized. GLPI has been postulated as a model of multienzymatic proteins since it displays at least three enzymatic activities likely linked to biotic/abiotic stress responses. These associated activities are adenosine diphosphate glucose phosphodiesterase (AGPPase), protease inhibitor (PI) and SOD. In order to decipher the physiological roles of GLPI we investigated the GLPI-associated activities and its regulated localization in the first and second leaves in salt-stressed seedlings. The results indicated that salt exposition does promote the localization of GLPI in the cell wall, which was also accompanied by the increase of SOD and PI activities.

Este manuscrito será enviado a la brevedad para su publicación a Journal of Experimental Botany

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

Comunicaciones presentadas a congresos científicos

- 1- Marchetti MF, Mansilla AY, Conde RD, **Mendieta JR.** (2014). “El inhibidor de tripsina tipo germina de trigo expresado heterológicamente en *Escherichia coli* tiene actividad antifúngica sobre *Fusarium solani*. SAMIGE X Congreso Argentino de Microbiología General. Mar del Plata, 2 al 4 de julio de 2014.
- 2- **Mendieta JR**, Mansilla AY, Lombardo MC, Casalongué CA. “Estudio de la proteína multifuncional de tipo germina (IPG) en plantas de trigo sometidas a estrés salino”. XV Congreso Latinoamericano XXX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Mar del Plata 21-24 de septiembre de 2014.
- 3- Marchetti MF, Mansilla AY, Conde RD, **Mendieta JR.** “El inhibidor de Proteasas tipo Germina (IPG) protege a las plántulas de tomate de la infección con *Fusarium solani* f. sp. *eumartii*.” XV Congreso Latinoamericano XXX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Mar del Plata 21-24 de septiembre de 2014.
- 4- Mansilla AY, **Mendieta JR**, Lanfranconi M, Casalongué CA, Alvarez VA. “Caracterización de nanoarcillas compuestas conteniendo a la proteína multifuncional de trigo IPG”. II Workshop de Nanoarcillas y sus aplicaciones. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina, 20 y 21 de Noviembre 2014.
- 5- Iturburu FG, **Mendieta JR**, Crupkin AC, Panzeri AM, Menone ML. “Efectos del insecticida imidacloprid sobre distintos tejidos del pez dulceacuícola *Australoheros facetus*”. Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental SETAC. Argentina, 22 al 25 de octubre de 2014.

7.6 INFORMES Y MEMORIAS TECNICAS. *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.

1) Proyecto Universidad, Diseño y Desarrollo Productivo. Ministerio de Educación: “PRODUCTOS FITOSANITARIOS”. Participa como: Miembro del equipo

Se propone la obtención de productos biodegradables, biocompatibles y no tóxicos (quitosano y oligoquitosano) a partir de exoesqueletos de langostinos y camarones provenientes de los desechos de la industria pesquera para su aplicación como potenciadores del crecimiento y la respuesta de defensa frente al ataque de patógenos en cultivos hortícolas. Se compararán sus acciones biológicas en plantas como i) potenciadores del crecimiento y rendimiento de plantas de papa y tomate ii) acción fitosanitaria contra estrés biótico. Con el fin de aportar resultados fácilmente transferibles en el mediano plazo al sistema productivo se plantean ensayos en diferentes escalas de producción.

2) PREMIO SENASA (3° premio) a la INVESTIGACION, TRANSFERENCIA Y COMUNICACIÓN 2014-2015: “Innovación de fitosanitarios con inocuidad agroalimentaria y ambiental”. Participa como: Coordinadora del Proyecto.

El uso de biopesticidas y fitosanitarios como productos agronómicos de bajo impacto ambiental constituye una innovación en los modelos productivos actuales. Los cambios ambientales asociados a las condiciones climáticas altamente dinámicas traen consigo el desarrollo de enfermedades y problemas fitosanitarios tal como, es el caso de las enfermedades fúngicas en los cultivos de la región. El uso excesivo de agroquímicos fuertemente tóxicos conlleva a un impacto ambiental negativo tanto en zonas semi-urbanas como rurales ocasionando además, complicaciones sanitarias a la población. El proyecto promueve el desarrollo de conocimiento y resultados científicos referidos tanto a la obtención como aplicación de quitosano (Q) y oligoquitosano (OQ) como fuente de elicitores o inductores de defensa frente a hongos o bacterias fitopatógenas. Las potencialidades de dichos compuestos para el desarrollo de nanopartículas (NPQ) que permitan el encapsulamiento de la proteína antimicrobiana denominada IPG, mejorando y potenciando su disponibilidad y efectividad en los sistemas biológicos, constituirá además, un resultado altamente original. El presente desarrollo de agroinsumos innovadores le confiere alto valor agregado a productos naturales y de origen nacional contribuyendo a su vez, a la producción sustentable de productos hortícolas a través del i) menor uso de agroquímicos tóxicos ii) al consumo de alimentos más saludables y de mejor calidad comercial iii) y a la disminución del impacto ambiental negativo a partir de la recuperación de residuos pesqueros proveniente de los exoesqueletos de langostinos y camarones para la obtención de Q y OQ.

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

1) Convenio de Investigación y Desarrollo Empresa AGROFINA (en redacción). 2014

2) Convenio de Confidencialidad para el desarrollo de Proyecto I+D con Empresa Agrofina SA (en circuito de firmas CONICET). 2014

3) Convenio de Transferencia de Material Biológica con la Empresa Diagnósticos Vegetales, Mar del Plata (en circuito de firmas CONICET). 2014

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.** 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

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

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.

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.

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.

- Subsidio Institucional para Investigadores de CIC-BA (Resolución N° 243/13). “Aplicaciones biotecnológicas del inhibidor de proteasas tipo germina (IPG). Análisis de su actividad antimicrobiana y antitumoral”. Monto recibido \$ 6000. **Responsable: Julieta R. Mendieta.** Período: 2014

- Subsidio otorgado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2013-2693). “Valoración y estudio de compuestos antimicrobianos de origen biológico con alto valor agregado para fines de aplicación en agrobiotecnología”. **Responsable: Dra. Julieta R. Mendieta.** Período: 2014-2015

- Subsidio otorgado por la Universidad Nacional de Mar del Plata: “Efecto del inhibidor de proteasas tipo germina (IPG) de trigo en la formación de biofilms bacterianos” Director: **Dra. Julieta R Mendieta.** Codirectora: Dra. Débora Nercessian. Período: 2014-2015. (EXA 700/14).

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

1) Título: “Caracterización de la acción de derivados de quitina de diferentes fuentes en microorganismos y plantas para su utilización en prácticas agrícolas sustentables”

Director: Dra. Claudia Casalongué

Institución financiadora: Universidad Nacional de Mar del Plata

Período: 2012-2014

Código: EXA 629/13

Participa como: Miembro del equipo

2) Título “Estudios fisiológicos y biotecnológicos de productos innovadores y ecológicamente seguros para el manejo de cultivos hortícolas de interés regional”

Director: Claudia Casalongué

Institución financiadora: ANPCyT (PICT 0716)

Periodo: 2011-2014

Participa como: Miembro del equipo

3) Título: “Productos fitosanitarios”

Director: Dra. Claudia Casalongué

Institución financiadora: Dirección Nacional de Desarrollo Universitario y Voluntariado

Periodo: 2014

Código de Identificación: Resolución SPU N° 4016/13

Participa como: Miembro del equipo

Proyectos colaboración extranjera bilateral.

Integrante del Proyecto RAICES-SIEMBRA “**Funcionalización de matrices en base a quitosano para su aplicación biomédica y en agricultura a partir del sistema modelo de la proteína multifuncional IPG**”. MINCyT Argentina-España. Aprobado 2013- en vigencia.

17. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO.

- Coordinadora del Proyecto: “Innovación de fitosanitarios con inocuidad agroalimentaria y ambiental”, el cual obtuvo el 3° Premio SENASA a la INVESTIGACION, TRANSFERENCIA Y COMUNICACIÓN 2014-2015.

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.*

1) Año 2011- actualidad: Jefe de Trabajos Prácticos regular desde 1 de septiembre de 2011 (OCA N° 539/11) Anatomía Humana (2° cuatrimestre) y Fisiología Humana (1° cuatrimestre). Faculta de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata. Carga horaria: 10 horas semanales.

2) Docente colaborador del Curso de Postgrado “Fundamentos y aplicaciones de la citometría de flujo en Bioquímica y Biología Molecular” (OCA N° 2917/14) a realizarse del 13 al 18 de abril de 2015.

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.*

1) Formación de Recursos Humanos:

Tutor de Prácticas de Investigación realizada por la Srta Carolina Rojas. Título: “Actividad antimicrobiana de derivados de quitosano en microorganismos de interés agronómico.” Agosto 2014-diciembre 2014.

2) Organización de reuniones y congresos

- Integrante del comité organizador de la VIII Encuentro Anual de Biólogos en Red. Universidad Nacional de Mar del Plata, 20 y 21 de noviembre de 2014. Publicación de acta de resúmenes ISSN 1853-3426 (versión electrónica).

3) Antecedentes de gestión:

- Integrante de la Comisión de Seguridad e Higiene, Instituto de Investigaciones Biológicas, UNMDP. Desde marzo de 2013.

4) Antecedentes de extensión:

- Integrante del taller “AGUAcadabra: Química y Vida”. Universidad Nacional de Mar del Plata en el marco de la Semana Nacional de la Ciencia y la Tecnología 2014 organizada por el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la Nación
- Integrante de proyecto de Extensión AGUAcadabra: Química y Vida, financiado por la Universidad Nacional de Mar del Plata. OCS N° 823/14

21. TÍTULO 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.*

TÍTULO: Estudio y valoración de compuestos antimicrobianos de origen biológico con fines de aplicación en agrobiotecnología

La alta actividad agrícola tiene un importante efecto negativo sobre el cambio climático. A través del Manejo Integrado de Plagas (establecido por la FAO, organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) se intenta desarrollar el máximo beneficio económico para el productor con el mínimo efecto nocivo sobre la población humana y el medioambiente. Esto es importante en países como la Argentina y muy especialmente en la región de la **Provincia de Buenos Aires** donde la producción agrícola tiene gran incidencia económica. Es por esto que es imprescindible el desarrollo de alternativas que brinden calidad, efectividad e inocuidad a los productos que se aplican como pesticidas, atendiendo cuestiones fundamentales como la salud humana (baja toxicidad) y preservación del ambiente. En este sentido, la utilización de compuestos naturales constituye una alternativa de solución a la problemática actual.

Se ha descrito que algunos inhibidores de serina proteasa (ISP) de origen vegetal poseen actividad antifúngica y/o antimicrobiana inhibiendo la actividad de proteasas secretadas por el patógeno o permeabilizando la membrana plasmática de las células (Mosolov y col, 2001). Estos compuestos antimicrobianos presentan gran interés como alternativas naturales y más sustentables para su uso como biocidas o potenciadores de la respuesta de defensa de las plantas frente a estrés bióticos (Valueva & Mosolov, 2004). En nuestro laboratorio se ha aislado un ISP de hojas de trigo denominado Inhibidor de Proteasa tipo Gemina (**IPG**) (Segarra y col, 2003). Este inhibidor presenta además, otras actividades enzimáticas: superóxido dismutasa (SOD) y actividad de adenosina difosfato glucosa pirofosfatasa (AGPP) (Segarra y col, 2003; Mansilla y col, 2012). Por otra parte, recientemente se demostró la actividad antimicrobiana de IPG sobre patógenos de plantas (Marchetti, 2013).

El quitosano y sus derivados son compuestos inocuos y biodegradables con amplias potencialidades en el campo de la agricultura (Ghormade y col, 2011; El Hadrami y col, 2010). La capacidad de estos polímeros catiónicos de permeabilizar las membranas plasmáticas los convierten en compuestos ideales para actuar como antimicrobianos o citotóxicos según el blanco celular y como potenciadores de la respuesta de defensa de las plantas (El Hadrami y col, 2010).

Teniendo en cuenta los antecedentes para la proteína IPG, se pretende ahondar en las propiedades biológicas de los quitosanos combinados con esta proteína y su potencial impacto sobre patógenos vegetales. En este sentido, la ventaja es doble ya que dicho producto se puede obtener de un residuo pesquero con bajo costo industrial

El objetivo del presente proyecto es caracterizar la actividad antimicrobiana del quitosano y sus derivados (DQ) sobre diversos patógenos vegetales de importancia agronómica con el fin de proyectar su interés agrobiotecnológico en combinación con la proteína IPG.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO

Objetivo 1: Estudiar la actividad antimicrobiana de los DQ sobre patógenos vegetales.

- a) Analizar la actividad antimicrobiana de los DQ
- b) Analizar el mecanismo de acción los DQ sobre patógenos vegetales.
- c) Comparar el efecto combinado de IPG/IPGr y los DQ sobre los patógenos estudiados

Material biológico: Se dispone de suspensiones de micelio y esporas de aislamientos locales de *Phytophthora infestans*, (razas compatibles), cepas patógenas fúngicas de *Fusarium solani f sp eumartii* y suspensiones bacterianas de *Pseudomonas syringae* (Mendieta y col, 2006; Mansilla y col, 2013).

Se dispone de derivados de quitosanos (DQ) de diferente peso molecular y grado de deacetilación y derivados con sustituciones químicas, como por ejemplo, derivado hidrosoluble N-metilén fosfónico (NMPC), quitosano N-lauril-metilén fosfanato (LMPC), quitosano N-propil-N-metilén fosfonato (PNMPC), y quitoooligómeros solubles de bajo peso molecular. Dichos compuestos son provistos por el Laboratorio de Investigaciones Básicas y Aplicadas de Quitina (LIBAQ, INQUISUR-UE, UNS-CONICET) de la Universidad Nacional del Sur a través de un proyecto en colaboración con la Dra. Casalagué.

Análisis de la actividad antimicrobiana de los DQ

Se evaluará la actividad biológica de tipo antimicrobiana de los DQ sobre la germinación de estructuras reproductivas de los siguientes patógenos de plantas: *F. solani* y *P. infestans*. Para tal fin se incubarán suspensiones de estructuras reproductivas de cada patógeno con diferentes concentraciones de dichos compuestos. Se evaluará y cuantificará la inhibición de la germinación de esporas con cámara de Neubauer y bajo observación microscópica (NIKON Eclipse E2100) (Mendieta y col, 2006). La actividad antibacteriana sobre *P. syringae* se evaluará incubando cultivos celulares en etapa exponencial con distintas concentraciones de los DQ. A distintos tiempos se tomarán alícuotas y se cuantificará la Abs en 600 nm como medida del crecimiento bacteriano (Mendieta y col, 2006; Mansilla y col, 2013). Se obtendrán los valores de IC50 que indican la dosis que causa un 50% de inhibición del crecimiento del patógeno.

Análisis del mecanismo de acción de los derivados de quitosano sobre patógenos vegetales.

Efecto biocida de los DQ

Las propiedades biocidas de los compuestos se determinará incubando una suspensión de las estructuras reproductivas con distintas cantidades de cada uno de los compuestos y luego de días de cultivos en medios frescos se cuantificarán las unidades formadoras de colonia (Mendieta y col, 2006). La actividad bactericida sobre cultivos bacterianos de *P. syringae* se analizará en la etapa exponencial. Alícuotas de cultivo bacteriano se incubarán con distintas concentraciones de cada compuesto a estudiar y se cuantificarán las UFC (Muñoz y col, 2010). Los valores de dosis letal media (LD50) (concentración requerida para reducir el 50% de la viabilidad) se determinarán a partir de las curvas dosis-respuesta (Mendieta y col, 2006). También se evaluará el efecto microbiocida en curvas de tiempo para cada uno de los patógenos y compuestos. (Mendieta y col 2006). Para validar el efecto biocida se analizará también la viabilidad celular a través de la tinción con el colorante azul de Evans y con las sondas fluorescentes de yoduro de propidio (Muñoz y col, 2010).

Interacción y permeabilización de la membrana celular.

Los DQ se marcarán con la sonda fluorescente rodamina, según describen Ma y col (2008). Los ensayos de interacción con la superficie celular se realizarán incubando una suspensión de esporas (*F. solani* y *P. infestans*) o de cultivos celulares de *P. syringae* con distintas concentraciones de quitosanos-FITC/rodamina y se observará al microscopio de fluorescencia (NIKON Eclipse E2100) y al microscopio confocal (Nikon Eclipse C21 Plus, Laboratorio de microscopía, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata). La cuantificación de la fluorescencia se realizará con un equipo Fluoroskan Ascent (Thermo Electron Company, Vantaa, Finland) (Mendieta y col, 2006). La evaluación de la integridad de las membranas plasmáticas de los patógenos estudiados se realizará utilizando el marcador fluorescente SYTOX Green (Molecular Probe) (Mendieta y col, 2006).

Detección y cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Para entender parte del mecanismo antimicrobiano, se propone estudiar la presencia de ROS en las estructuras reproductivas de los patógenos tratados con DQ. La detección endógena de H₂O₂ se llevará a cabo mediante la tinción histoquímica dependiente de peroxidasas utilizando el reactivo 3,3'-diaminobenzidina (DAB) según se describe en Mendieta y col, 2006.

Evaluación de la toxicidad selectiva

La capacidad antimicrobiana de tipo selectiva por parte de los DQ, de IPG e IPGr sobre los patógenos microbianos versus células de origen vegetal, se evaluará según Muñoz y col, 2010. Se utilizará como sistema modelo, cultivos celulares de tabaco BY2 disponibles y mantenidas en el laboratorio. Las células serán tratadas con distintas concentraciones de IPG o IPGr. Se determinará la viabilidad celular mediante el agregado de azul de Evans o el marcador fluorescente SYTOX Green. Las células se observarán al microscopio (Nikon Eclipse E200) y se cuantificará la fluorescencia por Fluoroskan Ascent (Thermo Electron Company, Vantaa, Finland) (Muñoz y col, 2010).

Comparación del efecto combinado de IPG/IPGr y los quitosanos sobre los patógenos estudiados

Para evaluar la posible acción sinérgica del quitosano y la proteína IPG/IPGr se realizarán ensayos de medición de la actividad antimicrobiana según se detalló anteriormente incubando las esporas fúngicas y cultivos celulares de *P. syringae* con concentraciones de cada una de las proteínas bioactivas y se combinarán con concentraciones de los DQ en órdenes de magnitud significativamente menores a las que mostraron individualmente efectos biocidas. De esta manera, la capacidad aditiva de los DQ permitirá identificar las concentraciones combinadas más efectivas. La estimación de la actividad sinérgica se realizará según la ecuación de Limpel, como describen Romanazzi y col (2006). La fórmula con la que se determinará la interacción sinérgica entre dos tratamientos es la siguiente: $E_e = X + Y - (XY/100)$, en la cual E_e corresponde al efecto de la respuesta aditiva de los dos tratamientos y X e Y corresponden al efecto obtenido para los tratamientos individuales. De esta manera se describirá sinergismo, si la combinación de los dos agentes produce un valor de inhibición mayor que el calculado para E_e .

Para el próximo período se cuenta con tres subsidios de los cuales soy el investigador responsable (PICT 2013-2693; EXA 700/14, CIC RN° 243/13) (ver sección 20, punto 4: Subsidios solicitados y adjudicados en el periodo informado que permitirán el financiamiento del próximo período)

Referencias bibliográficas

- Mosolov VV, Grigor'eva LI, Valueva TA. (2001). Plant proteinase inhibitors as polyfunctional proteins (a review). Applied Biochemistry and Microbiology 37: 545-551.
- Valueva TA, Mosolov VV. (2004). Role of Inhibitors of Proteolytic Enzymes in Plant Defense against Phytopathogenic Microorganisms. Biochemistry (Moscow) 6: 1305-1309.
- Segarra C, Casalongué C, Pinedo M, Ronchi V, Conde RD. (2003). A germin-like protein of wheat leaf apoplast inhibits serine proteases. Journal of Experimental Botany 54: 1335-1341.
- Mansilla AY, Albertengo L, Rodríguez MS, Debbaudt A, Zúñiga A, Casalongué CA. (2013) Evidence on antimicrobial properties and mode of action of a chitosan obtained from crustacean exoskeletons on *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. Applied Microbiology and Biotechnology en prensa.

- Mansilla AY, Segarra CI, Conde RD. (2012). Structural and functional features of a wheat germin-like protein that inhibits trypsin. *Plant Molecular Biology Reporter* 30: 624-632 (2012).
- Ghormade V, Deshpande MV, Paknikar KM. (2011). Perspectives for nano-biotechnology enabled protection and nutrition of plants. *Biotech Adv* 29: 792–803.
- El Hadrami A, Adam LR, El Hadrami I, Daayf F. (2010). Chitosan in Plant Protection. *Mar Drugs* 8: 968-987.
- Mendieta JR, Pagano MR, Muñoz FF, Daleo GR, Guevara MG. (2006). Antimicrobial activity of potato aspartic proteases (StAPs) involves membrane permeabilization. *Microbiology* 152: 2039-2047.
- Muñoz FF, Mendieta JR, Pagano MR, Paggi RA, Daleo GR, Guevara MG. (2010). The swaposin-like domain of potato aspartic protease (StAsp-PSI) exerts antimicrobial activity on plant and human pathogens. *Peptides* 31: 777-85.
- Romanazzi G, Mlikota Gabler F, Smilanick JL (2006). Preharvest chitosan and postharvest UV irradiation treatments suppress gray mold of table grapes. *Plant Disease* 90: 445-450.
- Marchetti, 2013. Tesis para optar al título de Lic en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Mar del Plata.

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.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.