

# CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO Informe Científico<sup>1</sup>

PERIODO <sup>2</sup>: 2011-2012

Legajo N°:

## 1. DATOS PERSONALES

*APELLIDO: Estrella*

*NOMBRES: María Julia*

*Dirección Particular: Calle: N°:*

*Localidad: Chascomús CP: 7130 Tel:*

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

## 2. TEMA DE INVESTIGACION

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

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

## 3. DATOS RELATIVOS A INGRESO Y PROMOCIONES EN LA CARRERA

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

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

## 4. INSTITUCION DONDE DESARROLLA LA TAREA

*Universidad y/o Centro: IIB-INTECH, sede Chascomús*

*Facultad: -*

*Departamento: -*

*Cátedra: Laboratorio de Microbiología del Suelo, Unidad Biotecnológica 3*

*Otros: -*

*Dirección: Calle: Av. Intendente Marino (ex Cam Circun) N°: Km 8,2*

*Localidad: Chascomús CP: 7130 Tel: 02241-430323*

*Cargo que ocupa: Investigador Adjunto*

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

*Apellido y Nombres: -*

*Dirección Particular: Calle: N°:*

*Localidad: CP: Tel:*

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

<sup>2</sup> 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.

Dirección electrónica:

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

.....  
Firma del Investigador

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

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

Uno de los planes de trabajo propuestos contempla el estudio de los mecanismos involucrados en la tolerancia a estreses abióticos de los rizobios simbiotes de *L. tenuis* tolerantes a salinidad y/o alcalinidad. Para ello, se realizaron experimentos de mutagénesis al azar de cepas de rizobios tolerantes o sensibles a NaCl y/o alcalinidad, mediante conjugación con una cepa de *E. coli* portadora de un transposón Tn5. Las cepas de rizobios utilizadas, forman parte de una colección de rizobios aislados de la Pampa Deprimida del Salado y caracterizados a nivel de género y especie por técnicas moleculares de identificación taxonómica (Estrella et al., 2009) y se seleccionaron luego de realizar ensayos de tolerancia a salinidad y/ o alcalinidad en condiciones controladas de laboratorio tanto en vida libre como en simbiosis con *L. tenuis* (informe 2010).

Luego de realizar los ensayos de conjugación con la cepa tolerante, se evaluó el crecimiento de 6000 clones transposantes, en condiciones control, de salinidad (NaCl 400 mM) y alcalinidad (pH11). Del total de clones analizados, se obtuvieron 8 cuyo crecimiento se afectó en condiciones de salinidad. Se realizaron perfiles Box-PCR a partir de ADN genómico de la cepa tolerante (wt) y de los clones transposantes sensibles a salinidad para confirmar que las mismas derivan de la cepa wt y descartar la presencia de colonias sensibles a salinidad originadas por contaminaciones. Se realizaron ensayos de PCR con cebadores específicos para el miniTn5, con el objetivo de confirmar que dichos clones contienen una inserción del miniTn5 y que efectivamente son mutantes.

Por otra parte, se realizaron ensayos de mutagénesis al azar con cepas sensibles, con el objetivo de obtener cepas tolerantes a salinidad y/o alcalinidad, mediante la inserción del transposón en algún gen regulador que pueda estar afectando negativamente la tolerancia a dichos estreses. En este caso no se logró obtener clones transposantes tolerantes a ninguna de las condiciones antes mencionadas.

El otro tema propuesto abarca el estudio y evaluación del efecto promotor del crecimiento vegetal, de cepas solubilizadoras de fosfato mineral, aisladas de la rizosfera de *L. tenuis*. Luego de caracterizar una colección de aislamientos (Castagno et al., 2011) se seleccionó una cepa de dicha colección para realizar ensayos de inoculación de *L. tenuis* a campo, en presencia de distintas fuentes de fósforo (roca fosfática, superfosfato triple, sin fosfato). Se observó un incremento en la producción de biomasa de 41% en plantas inoculadas respecto de las no inoculadas. Además se realizó el trazado de la bacteria inoculante mediante la técnica de huella digital BOX-PCR, para confirmar la presencia de la cepa en el interior de las plantas inoculadas, dado que en condiciones de laboratorio se había observado que dicha bacteria se comportaba como endofito y era capaz de colonizar raíz y hojas de *L. tenuis*. Los resultados de dicho estudio se presentaron en el congreso latinoamericano de rizobiología en septiembre del 2011 en la ciudad de Piriápolis, Uruguay y actualmente se está escribiendo un manuscrito para su publicación.

Por otra parte, en el marco del proyecto PICT start-up, se realizaron evaluaciones del ensayo de inoculantes realizado en la Chacra Experimental Integrada Chascomus,

Ministerio de Asuntos Agrarios, INTA junto con la empresa Biagro SA, durante el transcurso del año 2011.

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

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

1-Sannazzaro AI, Bergottini VM, Paz, RC, Castagno, LN, Menendez, AB, Ruiz, OA, Pieckenstain, FL, and Estrella, MJ. Comparative symbiotic performance of native rhizobia of the Flooding Pampa and strains currently used for inoculating *Lotus tenuis* in this region", *Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology*, publicado on line el 02/ 09/ 2010, publicado en papel 99: 371-379, 2011.

Abstract : The Flooding Pampa(FP) is the most important area for cattle breeding in Argentina. In This region, persistence and yield of typical forage legumes are strongly limited by soil salinity and alkalinity, which affect around 30% of the total area.

Instead, naturalized *Lotus tenuis* is the main forage legume in this region. Rhizobial strains currently used for inoculating *L. tenuis* in the FP are exotic or native from non-saline soils of this region, their taxonomic identity being unknown. Assuming that rhizobia native from the most restrictive environments are well adapted to adverse conditions, the use of such isolates could improve the productivity of *L. tenuis* in the FP. Hence, the goal of this study was to evaluate the symbiotic efficiency of selected *L. tenuis* rhizobia native from the FP, as compared with strains currently used for field inoculation of this legume. Under non-stressing conditions, the symbiotic performance of native strains of FP exceeded those ones currently used for *L. tenuis*. Moreover, the symbiotic performance of the native strain ML103 was considerably high under salt stress, compared with strains currently used as inoculants. Analysis of 16S rRNA gene sequencing revealed that unclassified rhizobia currently used for field inoculation of *L. tenuis* and native strains grouped with the genus *Mesorhizobium*. As a whole, results obtained demonstrate that soils of the FP are a source of efficient and diverse rhizobia that could be used as a sustainable agronomic tool to formulate inoculants that improve forage yield of *L. tenuis* in this region.

En este trabajo, la Investigadora María Julia Estrella participó como autora de correspondencia, dado que tuvo un rol protagónico en el diseño los experimentos, análisis de resultados y en la elaboración de conclusiones. Además tuvo un rol protagónico tanto en la redacción como en la corrección del manuscrito.

2- L.N.Castagno, M.J.Estrella, A.I.Sannazzaro, A.E.Grassano, and O.A.Ruiz. Phosphate-solubilization mechanism and in vitro plant growth promotion activity mediated by *Pantoea eucalypti* isolated from *Lotus tenuis* rhizosphere in the Salado River Basin (Argentina) *Journal of Applied Microbiology* 101: 1151-1165, 2011.

**Aims:** To isolate and characterize phosphate-solubilizing strains from a constrained environment such as the Salado River Basin and to assess their phosphate-solubilizing mechanisms, to further selection of the most promising strains to inoculate and improve the implantation and persistence of *Lotus tenuis* in the most important area devoted to meat-cow production in Argentina.

**Methods and Results:** Fifty isolates were obtained and through BOX-PCR analysis, 17 non-redundant strains were identified. Subsequently, they were found to be related to *Pantoea*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* and *Enterobacter* genera, via 16S rRNA gene sequence analysis. This was in agreement with the clusters obtained by antibiotic resistance analysis. All isolates were tested for their phosphate-solubilizing activity and selected strains were inoculated onto *L. tenuis* plants. The most efficient isolate, was identified as *Pantoea eucalypti*, a novel species in terms of plant growth-promoting rhizobacteria.

**Conclusions:** The isolates obtained in this study showed a significant in vitro plant-growth promoting activity onto *Lotus tenuis* and the best of them solubilizes phosphate mainly via induction of the metabolism through secretion and oxidation of gluconic acid.

**Significance and Impact of the Study:** The use of these bacteria as bioinoculants, alone or in combination with nitrogen-fixing micro-organisms, could be a sustainable practice to facilitate the nutrient supply to *Lotus tenuis* plants and preventing negative side-effects such as eutrophication

En este trabajo, la Investigadora María Julia Estrella participó activamente en el diseño de los experimentos, en el análisis de resultados y elaboración de conclusiones. Además participó en la redacción y en la corrección del manuscrito.

-

3- Escaray FJ, Menendez AB, Garriz A, Pieckenstein FL, Estrella MJ, Castagno LN, Carrasco P, San Juan J and Ruiz OA "Ecological and agronomic importance of the plant genus *Lotus*. Its application in grassland sustainability and the amelioration of constrained and contaminated soils", *Plant Science*, 182: 121-133, 2012.

**Abstract:**

The genus *Lotus* comprises around 100 annual and perennial species with world wide distribution. The relevance of *Lotus japonicus* as a model plant has been recently demonstrated in numerous studies. In addition, some of the *Lotus* species show a great potential for adaptation to a number of abiotic stresses.

Therefore, they relevant components of grassland ecosystems in environmentally constrained areas of several South American countries and Australia, where they are used for livestock production. Also, the fact that the roots of these species form rhizobial and mycorrhizal associations makes the annual *L. japonicus* a suitable model plant for legumes, particularly in studies directed to recognize the mechanisms intervening in the tolerance to abiotic factors in the field, where these interactions occur. These properties justify the increased utilization of some *Lotus* species as a strategy for dunes revegetation and reclamation of heavy metal-contaminated or burned soils in Europe.

En este trabajo, la Investigadora María Julia Estrella participó activamente en la redacción del capítulo correspondiente a los simbioses del género *Lotus* y en la 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.*

**7.4 TRABAJOS TERMINADOS Y AUN NO ENVIADOS PARA SU PUBLICACION.**

*Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo.*

1-Rosalía C Paz, María J Estrella, Osvaldo N Fernández, Néstor O Maceira, Luis N Castagno, Rubén A Rocco, Verónica M Bergottini, Analia I Sannazzaro, Oscar A Ruiz,

Establishment of *L. tenuis* in saline-alkaline soils of the Salado River Basin (Argentina) and their symbiotic response to the inoculation with specific rhizobia.

Abstract: The Flooding Pampa constitutes the most important area devoted to cattle production in Argentina. This activity relies mostly on natural pastures where soil alkalinity appears as a main restriction for forage legumes implantation and persistence in the prevailing Natraqualf type soils. In spite of its successful naturalization, the exotic legume *Lotus tenuis*, considered a "keystone species" for these environments, presents survival problems during the seedling stage (its critical demographic stage). Several controlled experiments were performed to analyze soil and rhizosphere limiting factors affecting *L. tenuis* establishment. We studied the emergence and growth responses of this forage legume under laboratory and glasshouse conditions, using hydroponics techniques and soils microcosms with typical soils from Flooding Pampa, respectively. Furthermore, we evaluated the performance of *L. tenuis* plants in symbiotic association with Mesorhizobium strains adapted to different soil conditions and currently used for the inoculation of *L. tenuis* in this region. According to our results, *L. tenuis* establishment and growth are primarily controlled by edaphic variables. In turn, the success of infection by selected rhizobial strains is subordinated to the ability of both symbionts to overcome the edaphic limitations separately and reach the symbiosis under these conditions.

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

(2011) Promoción del crecimiento de *Lotus tenuis* en suelos de la Pampa Deprimida del Salado bajo condiciones de fertilización fosforada e inoculación con la cepa solubilizadora de fosfato *Pantoea eucalypti* M91. Castagno LN, García IV, Bailleres MA, Rocco RA, Sannazzaro AI, Estrella MJ, Ruiz OA y Mendoza RE. Relar XXIV Reunión Latinoamericana de Rizobiología, Piriápolis, Uruguay, 5 al 9 de septiembre.

(2011) Caracterización de sistemas simbióticos en especies de bacterias que nodulan *Lotus tenuis*. Facundo Tonucci, María Julia Estrella, Oscar Ruiz, Analía Sannazzaro. Relar XXIV Reunión Latinoamericana de Rizobiología, Piriápolis, Uruguay, 5 al 9 de septiembre.

(2011) El *Lotus tenuis* y sus simbiontes como modelos de interés en la producción ganadera de la Pampa Deprimida del Salado Castagno LN, Estrella MJ, Rocco RA, Mendoza RE, García IV, Sannazzaro AI, Menendez, AB, Bailleres MA, Ruiz OA. Congreso de Biología del Suelo.

(2011) Identificación de microorganismos endofitos y epifitos presentes en especies hortícolas susceptibles a los hongos fitopatógenos *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum*. Evaluación de su capacidad de degradar ácido oxálico. Romero FM, Marina M, Estrella MJ, Menéndez AB & Pieckenstain FL. XXV Reunión Latinoamericana de Rizobiología, I Congreso Nacional de Microorganismos Promotores de Crecimiento Vegetal. Piriápolis, Uruguay

(2012) Genetic diversity of *Lotus tenuis* rizobial symbionts is mediated by horizontal transfer of a symbiotic island. María Julia Estrella, Facundo Tonucci, Analía Sannazzaro. Plasmid Biology Conference, International Society for Plasmid Biology. 12-16 de Septiembre 2012, Santander, España

**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.*

La Investigadora María Julia Estrella forma parte de un proyecto PICT start-up 2007-02034 que fue aprobado y cuenta con financiación desde abril de 2010.

El proyecto se presentó en conjunto entre las Unidades de Biotecnología 1 y 3 del IIB-INTECh, por un lado, y la empresa semillera Gentos SA (Pergamino, Pcia de Buenos Aires, [www.gentos.com.ar](http://www.gentos.com.ar)) por el otro. Como parte de la misma se han iniciado estudios a campo destinados a conocer la eficiencia de cepas de rizobios simbiontes de *Lotus tenuis*. El objeto final de la colaboración es la formulación de inoculantes bacterianos para un cultivar de dicha leguminosa forrajera que ha sido desarrollado previamente por la empresa Gentos. Las cepas que está siendo evaluada actualmente, fue seleccionada previamente en condiciones de laboratorio por la Dra María Julia Estrella. El inoculante en desarrollo permitirá la fijación biológica de nitrógeno en simbiosis con plantas de *L. tenuis* y aumentará la productividad y capacidad de implantación de esta leguminosa en ambientes marginales, lo cual tendría un fuerte impacto favorable en la producción ganadera

de distintas regiones del país, incluyendo la Pampa Deprimida del Salado en la Provincia de Buenos Aires.

Durante el año 2011 se realizó un ensayo de evaluación de inoculantes en la Chacra Experimental Manantiales junto con la Empresa Biagro SA. El objetivo es evaluar la eficiencia de cepas comerciales y cepas nativas de rizobios caracterizadas evaluadas previamente en el laboratorio y seleccionadas en base a su comportamiento simbiótico con *L. tenuis*. También se pretende evaluar la eficiencia de distintas formulaciones de una misma cepa de rizobio y para ello se han incluido tratamientos con tres formulaciones distintas para cada cepa testeada.

Se realizaron muestreos de plantas de cada tratamiento a los 4 meses post-siembra para evaluar eficiencia de nodulación. El número total de nódulos no varió significativamente entre los tratamientos, sin embargo si se observó una disminución del número de nódulos grandes y medianos en el testigo sin inocular y en el tratado con urea respecto a los otros tratamientos. Además se observó que la mayor cantidad de nódulos se detectó en plantas inoculadas con una de las cepas nativas de nuestra colección..

Por otro lado se determinó la profundidad de los primeros nódulos formados. Se sabe que cuanto más temprano ocurra la infección más cerca de la corona se forman los primeros nódulos, y esto a su vez está relacionado con la eficiencia de nodulación de los distintos tratamientos. En ese sentido se determinó que la cepa que noduló más rápido, o sea la más infectiva es la cepa nativa ES1, en sus tres tratamientos, luego la cepa nativa ES2 líquido. La ES2 turba, pellet, la cepa comercial LL32 turba y caldo, tuvieron una respuesta más tardía a la infección dado que los nódulos se formaron a mayor profundidad y a una distancia similar a los nódulos infectados con cepas nativas como en los tratamientos sin inocular y con fertilizante

También se analizó la producción de materia seca luego del 1er corte, y no se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos de inoculación y el control sin inocular. Sin embargo si se observaron diferencias significativas entre el tratamiento fertilizado con urea y algunos tratamientos de inoculación. El tratamiento fertilizado tuvo mucha maleza en comparación con los otros tratamientos. La fertilización permitió que crezcan malezas que compiten con *L. tenuis*, desfavoreciendo su crecimiento, y en consecuencia disminuyendo su producción respecto de los tratamientos inoculados con la cepa nativa ES1.

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

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

Dr Juan Sanjuan Pinilla, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Departamento de Microbiología de Suelos y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín. Prof. Albareda 1, E-18008 , Granada, España, teléfono: +34-958-121011. Ext.259, Fax:+34 958-129600, e-mail: [juan.sanjuan@eez.csic.es](mailto:juan.sanjuan@eez.csic.es)

Dr Mariano Pistorio , Investigador Adjunto CONICET, en IBBM-UNLP-CONICET

• Profesor Adjunto en Facultad de Ciencias Exactas, UNLP e-mail: [pistorio@biol.unlp.edu.ar](mailto:pistorio@biol.unlp.edu.ar)

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**

Desde 2011, Profesor Adjunto en materias Microbiología y Laboratorio de Microbiología de la carrera de Técnico Universitario de laboratorio, Universidad Nacional de San Martín, dictada en el IIB-INTECH, sede Chascomús.

**10.2 DIVULGACIÓN**

Paz, R, Ruiz OA, y MJ Estrella. Capítulo 3: La Importancia de los rizobios en *Lotus tenuis*,. En *Lotus tenuis*: un recurso forrajero estratégico para la ganadería de la Pampa Deprimida. INTA (Ed).p 13-16, 2012. ISBN: 978-987-697-133-5

En este trabajo, la Investigadora María Julia Estrella participó activamente en la redacción del capítulo correspondiente a los simbiontes del género *Lotus* y en la corrección del manuscrito.

Participación como oradora en la Chacra Experimental Integrada Chascomus, Ministerio de Asuntos Agrarios, INTA, dirigida a alumnos de la escuela agrotécnica de Chascomús, en la X Semana nacional de la Ciencia y la Tecnología, 11 al 22 de Junio de 2012.

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

1-Co-dirección de la Dra Analía Sannazzaro, Inv Asist. CONICET desde 2008-actualmente.

Título del Trabajo: la especificidad simbiótica y la tolerancia a estreses abióticos como criterios de mejora para los inoculantes bacterianos específicos del género *Lotus*.

- 2-Co-dirección de beca post-doctoral tipo II, CONICET del Lic. Nazareno Castagno, en el IIB-INTECH, desde 2012- actualmente

Título de trabajo: Estudio de aspectos biotecnológicos de la simbiosis *L. tenuis*-*Rhizobium loti* y de bacterias solubilizadoras de fósforo para el incremento de la productividad de suelos salino-alcalinos.

-3-Co-dirección de beca Post- Doctoral CONICET de Dr Francisco Escaray. 2012-actualmente

Título del trabajo: Evaluación de la regulación génica de la biosíntesis de los taninos condensados en el género *Lotus* y su relación con la simbiosis bacteriana"

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

1- Co-dirección de Tesina de grado del estudiante Facundo Tonucci desde marzo a diciembre de 2011

Título del trabajo: Caracterización de sistemas simbióticos en especies de rizobios no convencionales que nodulan *Lotus tenuis*

Fecha de defensa: 29 de Diciembre de 2011

Calificación: sobresaliente



2-Dirección de trabajo final de la estudiante Lucrecia Iriarte para optar al título de Técnico Universitario de laboratorio de UNSAM, 2012

3-Dirección de Tesina de grado del estudiante Alejandro Villa, en ejecución, desde marzo del 2012

Título del trabajo: Caracterización de genes que confieren una mejor adaptación a los suelos salino-alcálinos de la Pampa Deprimida del Salado, en rizobios simbiotes de *L. tenuis*

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

Asistencia a XXIV Reunión Latinoamericana de Rizobiología, Piriápolis, Uruguay, 5 al 9 de septiembre de 2011. Presentación de trabajos en forma de poster.

Título de los trabajos:

1-Promoción del crecimiento de *Lotus tenuis* en suelos de la Pampa Deprimida del Salado bajo condiciones de fertilización fosforada e inoculación con la cepa solubilizadora de fosfato *Pantoea eucalypti* M91. Castagno LN, García IV, Bailleres MA, Rocco RA, Sannazzaro AI, Estrella MJ, Ruiz OA y Mendoza RE.

2- Caracterización de sistemas simbióticos en especies de bacterias que nodulan *Lotus tenuis*. Facundo Tonucci, María Julia Estrella, Oscar Ruiz, Analía Sannazzaro.

3- Identificación de microorganismos endofitos y epifitos presentes en especies hortícolas susceptibles a los hongos fitopatógenos *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum*. Evaluación de su capacidad de degradar ácido oxálico. Romero FM, Marina M, Estrella MJ, Menéndez AB & Pieckenstein FL

4- Presentación de poster en Plasmid Biology Conference, International Society for Plasmid Biology, en Santander, España, del 12 al 16 de Septiembre 2012

Título del trabajo: Genetic diversity of *Lotus tenuis* rhizobial symbionts is mediated by horizontal transfer of a symbiotic island. María Julia Estrella, Facundo Tonucci, Analía Sannazzaro.

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

Asistencia a curso- taller Internacional sobre aprovechamiento agrícola de microorganismos útiles para la agricultura, en Santa Cruz de la Sierra, Bolivia, del 11 al 13 de abril, como Profesor Invitado

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

No soy titular de ningún subsidio, pero he participado como parte del grupo colaborador de los siguientes subsidios:

1- TITULO DEL PROYECTO Obtención de nuevos cultivares comerciales de *Lotus* spp y sus inoculantes específicos para el mejoramiento de la producción ganadera

ENTIDAD FINANCIADORA: PICT-start up 2007-02034

Período de ejecución: 2009/2012

Financiamiento obtenido: 319.280 pesos

En este proyecto, la Dra María Julia Estrella forma parte del grupo colaborador.

2-TITULO DEL PROYECTO: Evaluación de las bases fisiológicas, anatómicas y moleculares de la tolerancia a la alcalinidad de especies del género Lotus.

ENTIDAD FINANCIADORA: PICT-2008-1560

Año: 2010/2013

3-TITULO DEL PROYECTO: Red iberoamericana de Biofertilizantes Microbianos para la Agricultura (BIOFAG)

ENTIDAD FINANCIADORA: CYTED (Ciencia y Tecnología para el Desarrollo). Año: 2005 /2011.

4-TITULO DEL PROYECTO: Subsidio para la Asistencia de Reuniones Científicas y Tecnológicas 2011, aprobado el 18 de Agosto de 2011 por resolución 1352.

ENTIDAD FINANCIADORA: Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires

Período de ejecución:2011

Financiamiento obtenido: 2500 pesos

5-TITULO DEL PROYECTO: Variabilidad genética entre rizobios simbioses de L. tenuis mediada por la transferencia horizontal de una isla simbiótica.

ENTIDAD FINANCIADORA: CONICET, PIP 112 201101 01122

Año: 2013/2016

Financiamiento obtenido: 12.000 pesos /año. El proyecto fue aprobado pero aún no cuenta con financiación.

En este proyecto soy parte del grupo responsable.

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

**17. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO.**

**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.*

Durante el año 2011 y 2012, me desempeñé como Profesor Adjunto de la Universidad Nacional de General San Martín, en las materias Microbiología y laboratorio de Microbiología de la Carrera de Técnico Universitario de Laboratorio, dictada en el IIB-INTECh. Porcentaje aproximado de tiempo demandado: 15%.

Profesor Invitado al 2do taller Internacional de Aprovechamiento Agrícola de microorganismos útiles para la Agricultura: Santa Cruz de la Sierra, Bolivia, del 11 al 13 de abril de 2012

. Profesor invitado al curso de post-grado " Nutrición mineral en plantas" dictado en el IIB-INTECH, sede Chascomús, organizado por el Dr Santamaría. durante el año 2012.

**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-Jurado Suplente de Tesis doctoral del Lic Gonzalo Torres Tejerizo (24 de junio de 2011), Institución: IBBM, Universidad Nacional de la Plata

2-Jurado Titular de tesis doctoral de Licenciado Nahuel Wayllace (23 de septiembre 2011)

Institución: IIB-INTECH, Universidad Nacional de Gral. San Martín

3-Jurado Titular de tesis doctoral de la Licenciada María Eugenia Gómez Lobato (24 de febrero 2012) Institución: IIB-INTECH, Universidad Nacional de Gral. San Martín

Revisor de trabajos científicos en la revista *Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology* (2010)

Revisor de trabajos científicos en la revista *Microbiological Research* (2012)

**21. TITULO Y PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PROXIMO PERIODO.** *Desarrollar en no más de 3 páginas. Si corresponde, explicita la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.*

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

En relación a este tema, queda pendiente: 1) Identificar y caracterizar los genes implicados en la tolerancia a salinidad en los clones transposantes sensibles a diferentes tipos de estrés. Para ello se utilizarán dos aproximaciones experimentales: Por un lado se detectará la presencia del transposón en todos los clones transconjugantes sensibles a salinidad seleccionados en el punto anterior mediante ensayos de hibridación de ADN genómico de cada aislado, con una sonda preparada con fragmentos del transposón. Los fragmentos de restricción de ADN genómico que llevan la inserción del transposón se seleccionarán y clonarán en un vector de clonado. La identificación de genes que llevan la inserción del transposón se realizará mediante secuenciación de los fragmentos de ADN genómico clonados en el punto anterior. Por otro lado, se fragmentará el ADN de las cepas mutantes con una enzima de restricción, y se realizarán ligaciones para obtener fragmentos de ADN circular que se utilizará como molde para reacciones de PCR utilizando cebadores específicos que se unen a regiones del miniTn5. De este modo se amplificarán fragmentos adyacentes al sitio de inserción del transposón. Su identificación se realizará mediante secuenciación de los fragmentos de ADN amplificados.

Por otra parte, para confirmar que los genes caracterizados tienen la capacidad de otorgar tolerancia a salinidad, los mismos serán transferidos a cepas de rizobios con alta eficiencia simbiótica en condiciones control pero sensibles a dichos estrés, mediante ensayos de complementación con dichos genes clonados en vectores de expresión adecuados. De este modo se evaluará la tolerancia en vida libre de las cepas transformadas en condiciones in vitro (en medio de cultivo agarizado) y también in vivo (en muestras representativas de suelo salino de la región de la Pampa Deprimida del Salado).

Además se evaluará el efecto biofertilizante (o promotor del crecimiento vegetal) de las mutantes sensibles a salinidad, en *L. tenuis*, bajo condiciones control y de estrés salino. Se realizarán ensayos de nodulación en cámara de cultivo climatizada, siguiendo el protocolo descrito por Sannazzaro et al., 2011. Las plantas se cultivarán en jarras Magenta, en una mezcla 1:1 de sustrato estéril (perlita: vermiculita), regada con solución

nutritiva Evans, sin nitrógeno, con y sin sal (NaCl). En el caso de las plantas cultivadas con sal, las mismas se regarán en solución Evans, sin nitrógeno, suplementada con 100mM de NaCl. Se realizarán controles sin inocular con y sin sal. Para la inoculación, se prepararán cultivos de cepas tipo salvaje y de mutantes y se inocularán plantas de *L. tenuis* con cultivos de cada una de las cepas a testear. El diseño del ensayo es completamente al azar. Se realizarán 4 réplicas por tratamiento. Las plantas se cosecharán al cabo de 30 días post- inoculación y la eficiencia simbiótica se evaluará a través de la determinación del peso seco de la parte aérea. Además se valorará el número de nódulos y el peso seco de los mismos.

Por otra parte en los próximos dos años se va a comenzar con un tema nuevo titulado: Variabilidad genética entre rizobios simbiotes de *L. tenuis* mediada por la transferencia horizontal de una isla simbiótica.

El presente proyecto tiene como objetivo estudiar el impacto de la transferencia horizontal de una isla simbiótica similar a la presente en *Mesorhizobium loti* a otras bacterias del suelo. Los objetivos específicos son: 1. Determinar si los aislamientos de *L. tenuis* provenientes de suelos típicos de la Pampa Deprimida del Salado y no relacionados con el género *Mesorhizobium*, han ganado la capacidad de nodular esta leguminosa, a través de la adquisición de una isla simbiótica. 2. Desarrollar una herramienta genética para la detección de eventos de transferencia génica horizontal de la isla simbiótica desde una cepa de *M. loti* a bacterias de otros géneros que habitualmente colonizan la rizosfera de *L. tenuis*. 3. Evaluar las condiciones bajo las cuales la isla simbiótica de la cepa de *M. loti* marcada (obtenida en el punto anterior) puede ser transferida *in vitro* y/o *in vivo* a bacterias del suelo de diferentes géneros y especies. Caracterización genómica y funcional de los nuevos simbiotes.

Se evaluará la presencia de la isla en una colección de simbiotes de *L. tenuis* de los géneros *Rhizobium* y *Agrobacterium*, aislados de suelos de la Pampa Deprimida del Salado. Se utilizarán cebadores para amplificar un fragmento del extremo de la isla (P4-like integrase) y la región adyacente al mismo, donde se integra esta isla generalmente (Phe-tRNA). También se realizarán amplificaciones de genes *nodC* y *nifH*. La localización de estos genes simbióticos se determinará mediante la técnica de Southern blot. Para desarrollar una herramienta genética que permita evaluar los posibles eventos de transferencia horizontal se marcará la isla simbiótica de la cepa *M. loti* MAFF303099 con un gen de resistencia a antibiótico y/o el gen de la proteína verde fluorescente (GFP), expresados bajo el control del promotor Lac (*plac*), que a su vez estará reprimido por el producto del gen *lacI*. Así, la marcación no se verá expresada en las células de la bacteria dadora pero sí en las receptoras, que no contendrán el represor. Por último se evaluarán las condiciones bajo las cuales la isla simbiótica de la cepa de *M. loti* marcada puede ser transferida *in vitro* y/o *in vivo* a bacterias del suelo de diferentes géneros y especies. Se caracterizarán desde el punto de vista genético y funcional a los nuevos simbiotes.

Además, se prevee continuar y avanzar con los estudios más aplicados con rizobios y bacterias solubilizadoras de fosfato, pero en este caso el interés se va a centrar en evaluar su efecto promotor en condiciones de alcalinidad. Se ha observado que gran parte de la colección de bacterias solubilizadoras de fosfato que tenemos en el laboratorio posee además la capacidad de producir sideróforos, que son compuestos quelantes de hierro. Los suelos alcalinos se caracterizan por presentar baja disponibilidad de nutrientes esenciales, entre ellos el hierro (Fe). El principal síntoma de deficiencia de Fe en las plantas se denomina clorosis férrica y se caracteriza por afectar la eficiencia del fotosistema II. En este sentido, la aplicación de microorganismos solubilizadores de fosfato que además son productores de sideróforos, en plantas que

crecen en ambientes alcalinos, resultará beneficioso dado que pueden favorecer la captación de este elemento por parte de las plantas, mejorando su nutrición.

Para ello se prevee: 1- Aislar bacterias solubilizadoras de fosfato tolerantes a alcalinidad a partir de plantas de *L. tenuis* provenientes de ambientes alcalinos de la Pampa Deprimida del Salado. 2- Evaluar la eficiencia solubilizadora de fosfato y producción de sideróforos en condiciones de alcalinidad, en la colección de bacterias solubilizadoras de fosfato. 3- Evaluar en condiciones controladas y semicontroladas, el efecto promotor del crecimiento de plantas de *L. tenuis*, de aislamientos seleccionadas en el objetivo anterior en base a su alta eficiencia de solubilización de fosfato en condiciones de alcalinidad. 4- Evaluar el efecto de distintas combinaciones de rizobios tolerantes a alcalinidad (presentes en la colección de aislamientos de nuestro laboratorio) y microorganismos solubilizadores y/o mineralizadores de P en plantas de *L. tenuis* cultivadas bajo condiciones de pH alcalino y seleccionar la/s combinación/es que sea/n más eficiente/s en promover el crecimiento y absorción de P y N por parte de las plantas.

---

### **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](mailto: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.