CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO

Informe Científico[1]

PERIODO [2]: 2017

1. DATOS PERSONALES

APELLIDO: BARTEL

NOMBRES: LAURA CECILIA

Dirección Particular: Calle:

Localidad: ENSENADA CP:

Dirección electrónica (donde desea recibir información, que no sea "Hotmail"):

2. TEMA DE INVESTIGACION

Identificación y caracterización de metabolitos bioactivos producidos por bacterias Gram-positivas aisladas de miel. Posible utilidad como herramienta de control biológico contra microorganismos patógenos de importancia agronómica

PALABRAS CLAVE (HASTA 3) biocontrol Loque americana miel

3. DATOS RELATIVOS A INGRESO Y PROMOCIONES EN LA CARRERA

INGRESO: Categoría: ASISTENTE Fecha: 01.12.2016

ACTUAL: Categoría: ASISTENTE desde fecha:

4. INSTITUCION DONDE DESARROLLA LA TAREA

Universidad y/o Centro: UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Facultad: CIENCIAS AGRARIAS Y FORESTALES

Departamento: CENTRO DE INVESTIGACIONES DE FITOPATOLOGIA

Cátedra: FITOPATOLOGIA

Otros:

Dirección: Calle: 60 Y 119 Nº: SN

Localidad: LA PLATA CP: 1900 Tel: 4236758 int423

Cargo que ocupa: Investigador Asistente

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

Apellido y Nombres: Adriana Mónica Alippi

Dirección Particular: Calle:

Localidad: La Plata CP: 1900 Tel:

Dirección electrónica:

....

[1] Art. 11; Inc. "e"; Ley 9688 (Carrera del Investigador Científico y Tecnológico).
[2] El informe deberá referenciar a años calendarios completos. Ej.: en el año 2017 deberá informar sobre la actividad del período 1°-01-2015 al 31-12-206, para las presentaciones bianuales. Para las presentaciones anuales será el año calendario anterior.

Firma del Director (si corresponde) Firma del Investigador

6. RESUMEN DE LA LABOR QUE DESARROLLA

Descripción para el repositorio institucional. Máximo 150 palabras.

Las tareas desarrolladas tuvieron como objeto de estudio a los metabolitos secundarios producidos por bacterias esporuladas Gram positivas antagonistas de microorganismos patógenos de abejas. La identificación química y caracterización biológica de los metabolitos involucrados en estas reacciones antagónicas permite avanzar en alternativas de control biológico de dos patologías apícolas de relevancia para la provincia de Buenos Aires, como son la loque americana y la cría yesificada. A partir de cepas antagónicas seleccionadas, se estudió la producción de metabolitos difusibles y volátiles en distintas condiciones in vitro. Se llevó a cabo la extracción e identificación de los mismos por medio de técnicas analíticas complejas como la espectrometría de masas, así como la evaluación biológica de sus propiedades bioactivas, buscando aquellas cepas más potentes y con potencial aplicación a campo

7. 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, explicite la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.

Desde mi ingreso al grupo dirigido por la Dra Alippi, continué la caracterización de cepas de bacterias de los géneros Bacillus y Brevibacillus aisladas de fuentes de apiario, con antagonismo frente a dos patógenos apícolas relevantes, Paenibacillus larvae (PL) y Ascosphaera apis (Aa). En base a un screening previo de cepas antagónicas frente a ambos patógenos, se eligieron unas 40 cepas de distintas especies de Bacillus y Brevibacillus para profundizar la caracterización. Posteriormente, se buscó identificar quimica y biológicamente los metabolitos secundarios involucrados en estas reacciones antagónicas, para avanzar en el conocimiento y posible acceso a alternativas de control biológico de loque americana y otras patologías apícolas.

Complementariamente a la caracterización bioquímica de las cepas realizada por la Dra Alippi, evalué crecimiento a diferentes pH, TºC y concentración salina, entre otras variables, además de la caracterización morfológica de células vegetativas y sus esporas. Estos resultados junto con la caracterización molecular realizada por la Dra Alippi, permitieron identificar a nivel de especie a las cepas seleccionadas.

Se evaluó antagonismo in vitro de sustancias difusibles y volátiles frente a distintas cepas de PL y Aa. Se aplicó análisis multivariado buscando relacionar antagonismo por sustancias difusibles o volátiles con cepas, medio de cultivo y presencia de marcadores genéticos de síntesis de péptidos antimicrobianos (PAM). Se estudió la producción de biosurfactantes en distintas condiciones (Técnica gota colapsada; 4 medios de cultivo, siete días, TºC óptima según especie). La producción de lipopéptidos bioactivos y/o bacteriocinas se evaluó por precipitación a pH 2 ó con (NH4)2SO4, respectivamente, seguidas de extracción con solventes y rotaevaporación. Por espectrometría de masas, se analizaron extractos proteicos de la cepa B. subtilis m334, una de las mejores antagonistas, sin identificar metabolitos activos debido a la complejidad proteica de la muestra.

En colaboración con la Dra J. Minnaard (CIDCA; UNLP/CICPBA/CONICET) evalué citotoxicidad de las fracciones activas de 12 cepas entre las más potentes exponiendo células epiteliales (Caco-2 TC7) a sobrenadantes filtrados y/o extractos proteicos evaluando desprendimiento de la monocapa celular (Cristal violeta), viabilidad celular (MTT) y necrosis (tinción con Ioduro de propidio). Se detectaron cepas antagónicas con leve y con alta actividad citotóxica. Los resultados fueron inconclusos, debido a la variabilidad en la actividad de estos extractos biológicos. Finalmente, se realizó un ensayo a campo evaluando efecto probiótico de concentrados de esporas (cepas B.

cereus m6c y m387, 18 meses) y se adaptó protocolo de cría de larvas de abejas en laboratorio para futuros estudios in vivo.
Se seleccionaron las 5 cepas más potentes vs ambos patógenos, correlacionando con actividad de sustancias difusibles y/o surfactantes y presencia de secuencias homólogas a genes de síntesis de 7 PAM. Los resultados indican la necesidad de purificar los extractos para reducir la variabilidad y mejorar las posibilidades de identificación y separación de los metabolitos activos de interés. Parte de estos resultados se comunicaron en XIV Congreso Argentino de Microbiología, 2016 (Screening de cepas de Bacillus y Brevibacillus con potencia antagónica frente a patógenos de abejas y correlación con la presencia de marcadores genéticos de péptidos antimicrobianos. AM Alippi, AC López, E Abrahamovich, LC Bartel, se adjunta copia del resumen) y se enviaron a publicar en 2017 (ver punto 8.3 del presente informe).
La dificultad principal encontrada a lo largo de este periodo fue la limitada factibilidad para concretar el plan previsto originalmente. Por ello, luego de acordar con la directora de este plan, se solicitó a principios del corriente año el cambio de línea de trabajo y director, permaneciendo dentro del CIDEFI.

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

***8.1 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. Asimismo, para cada publicación deberá indicar si se encuentra depositada en el repositorio institucional CIC-Digital.*

***8.2 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, deber á escribir una breve justificación.*

1- Hybrid bacterial cellulose - pectin films for delivery of bioactive molecules. Maximiliano L. Cacicedo, German A. Islan, M. Florencia Drachemberg, Vera A. Alvarez, Laura C. Bartel, Alejandro D. Bolzan, Guillermo R. Castro. New Journal of Chemistry Enviado 15/10/2017, aceptado 26/03/2018. Disponible online Doi:10.1039/C7NJ03973E
Novel biopolymeric films based on bacterial cellulose (BC) modified with high methoxylated pectin (HMP) were developed for drug delivery. The ability of films to incorporate an antibiotic, levofloxacin (Levo), was analyzed. Incorporation efficiencies were determined using films with different proportions of HMP (from 0.1% to 2.0%) with a maximum drug payload of 6.23 mg/g. Characterization studies

revealed the existence of a cooperative network between both polymers and deep structural changes in BC matrix. Besides, HMP presence decreased water loss in the BC film from 93% to 75% after 90 min. Additionally, film incorporation capacity of macromolecules, using Human Serum Albumin (HSA) as a model protein, was studied. HMP presence enhanced in more than 3.5 times the EE of HSA and no pH dependence was observed. Release kinetics of both molecules showed hyperbolic profiles with sustained release. On independent experiments, HMP presence generated around 50% decrease on both macromolecules release rates. Additionally, the incorporation of HSA into BC-HMP matrix exhibitied a modulation on Levo release profile. The antimicrobial activity of Levo released from the BC-HMP-HSA films was confirmed using Staphylococcus aureus. In-vitro studies revealed no apparent cytotoxicity of the released compounds in mammalian CHO cells.

Resultado del trabajo conjunto realizado en el IMBICE (UNLP/CICPBA/CONICET) en colaboración con investigadores del CINDEFI (UNLP/CONICET), mientras trabajaba como becaria postdoctoral (04.2013-03.2014, Beca retorno Fund. Alexander von Humboldt). Evalué la citotoxicidad de distintas matrices biopoliméricas que encapsulaban antibióticos, por medio de ensayos in vitro con células en cultivo. Participé en la escritura y revisión del manuscrito.

8.3 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.

Antagonism and genetic markers in Bacillus and Brevibacillus strains: potential biocontrollers of Paenibacillus larvae and Ascosphaera apis. Laura C Bartel, Eliana Abrahamovich, Consuelo Mori, Ana C López, Adriana M Alippi. Enviado a Journal of Apicultural Research (15.05.2017). Solicitud de revisiones mayores (10.05.2018), correcciones en desarrollo actualmente.

Species of Bacillus and Brevibacillus associated with honeybees are sources of bioactive compounds with potential uses in apiculture. Most Bacillus species produce a broad range of antimicrobial compounds that include peptides, lipopeptides, bacteriocins and BLIS. With a combination of biological and molecular tools, we evaluated the antagonistic activity of 34 bacterial strains against Ascosphaera apis and Paenibacillus larvae, the causal agents of American Foulbrood and Chalkbrood diseases. The antagonistic response obtained was strain-specific and species-specific, and also medium dependent. Despite the variability observed by testing diffusible and volatile compounds, we could select the most potent antagonists against one or both pathogens. The presence of homologous sequences to 6 genes encoding for the synthesis of the antimicrobial peptides Bacillomycin L, Fengycin, Bacilysin, Subtilin, Iturin A, and Surfactin was assayed by PCR. The distribution and frequency of these genes within the bacterial antagonists were also strain-dependent and highly variable, being the most frequent surfactins, iturins and bacilysin. We also identified those antagonists active against different P. larvae genotypes. This is the first report of the association between antagonism and genetic markers in Bacillus and Brevibacillus strains isolated from apiarian sources and its biocontrol potential against P. larvae and A. apis in vitro.

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

A protocol for the isolation and culture of porcine fetal intestinal cells. Laura C.Bartel, Michael T. Empl, Gerhard Breves, Pablo Steinberg

Basic and applied veterinary gastrointestinal research uses primary cell cultures or whole animals, being suitable for short-term studies or ethically questionable, respectively. Thus, the access to established intestinal cell lines would be of great importance. The aim of this work was to establish normal intestinal epithelial cell lines derived from porcine fetal colonic tissue. In order to obtain primary cell cultures

from colonic tissue of pig fetuses, crypt-enriched suspensions were obtained by combining the enzymatic and mechanic digestion of the tissue plus several centrifugations and washing steps. Colonic crypt cells were grown in OptiMEM® medium with low serum content on collagenated plates. Then, cells were immortalized (SV40 large T antigen), maintained and subcultured for more than 15 passages without showing senescence. The partial characterization of two clones was carried out evaluating proliferation; epithelial character (immunostaining / western blot analysis) and general morphology (transmission electron microscopy). Cells appeared as compact cuboidal to spindle-shaped, and ultrastructurally, villi and tight junctions were observed. The expression of several cytokeratins as well as vimentin or s-m actin was detected. In conclusion, the cell isolation and culture protocols described herein led to the establishment of two new cell lines that might be used for gastrointestinal research. Resultados obtenidos durante 2011-2013 como becaria postdoctoral (Fund Alexander von Humboldt) en Hannover, Alemania.

2-"Reference of plasmatic cholinesterase activity in adult population from la Pampa"
Sofía N Mandrile, Vanina N Bogino, Silvia L Fanelli, Laura C Bartel.
Routine monitoring of intoxications due to exposure to pesticides includes the measurement of the activity of plasma cholinesterase (pChe) in rural workers. A decrease of 30% in this activity correlates directly with intoxication. This enzyme presents large fluctuations, wide ranges of normality within a population and differences between populations. Reference values in particular populations are fundamental to implement toxicological surveillance. The objective was to obtain baseline pChE values for a control adult population among residents of the city of Realicó (La Pampa), representative of the age group exposed in working conditions. We included 100 volunteers, both sexes, attending routine check-ups, investigating personal, work and clinical data. A commercial kit was used to measure pChe activity. The influence of gender, age, preexisting chronic diseases (ECP) and rural occupation were evaluated. The pChe range obtained for the whole population was 6.1-16.1 U/L, wider and slightly higher than that reported by the kit manufacturer. The t-test and multivariate descriptive analysis did not showed a direct influence of the variables on the mean pChe value. Rural occupation, age, gender or presence of ECP did not defined significant changes. This population presents basal values of pChe highly variable and within established parameters. Resultados de tesina de grado UNLPam, aprobada julio 2017.

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

"Bioensayos para la evaluación toxicológica de efluentes. Aplicaciones y Usos" Poggio Herrero V, Rodríguez C, Bartel, L, Fanelli S. 1º Primer Congreso Provincial de Vinculación y Transferencia, UNLPam. Santa Rosa, 3 y 4 de Agosto de 2017. Presentación libre en póster. Se adjunta resumen.

***8.6 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. Indicar en cada caso si se encuentra depositado en el repositorio institucional CIC-Digital.*

9. TRABAJOS DE DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS.

***9.1 DESARROLLOS TECNOLÓGICOS.** Describir la naturaleza de la innovación o mejora alcanzada, si se trata de una innovación a nivel regional, nacional o internacional, con qué financiamiento se ha realizado, su utilización potencial o actual por parte de empresas u otras entidades, incidencia en el mercado y niveles de facturación del respectivo producto o servicio y toda otra información conducente a demostrar la relevancia de la tecnología desarrollada.*

9.2 PATENTES O EQUIVALENTES *Indicar los datos del registro, si han sido vendidos o licenciados los derechos y todo otro dato que permita evaluar su relevancia.*

9.3 PROYECTOS POTENCIALMENTE TRANSFERIBLES, NO CONCLUIDOS Y QUE ESTAN EN DESARROLLO*. Describir objetivos perseguidos, breve reseña de la labor realizada y grado de avance. Detallar instituciones, empresas y/o organismos solicitantes.*

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

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

10. 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.*

11. PUBLICACIONES Y DESARROLLOS EN:

11.1 DOCENCIA

11.2 DIVULGACIÓN

Café científico, UNLPam: "Mujeres en la Ciencia: experiencias, tensiones y desafíos de una práctica de tradición (todavía) masculina",junto con Dra. Paula Laguarda y Dra. Claudia Montalvo. Desarrollado en el "Cine Club", Santa Rosa, La Pampa, 12/05/2017. http://www.unlpam.edu.ar/CPA/charlas-y-conferencias/mujeres-en-la-ciencia-cafe-cientifico-unlpam/.
No se encuentra depositado en el repositorio CIC-digital.

En cada caso indicar si se encuentran depositados en el repositorio institucional CIC-Digital.

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

13. 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.*

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

15. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC. *Señalar características del curso o motivo del viaje, período, instituciones visitadas, etc.*
CURSO: "Espectrometría de masas de péptidos y proteínas. Aplicaciones para estudios de proteómica funcional". Teórico-práctico, dirijido por Dr. S. Trejo, IMBICE (UNLP/CICPBA/CONICET), 77hs totales, 12 al 16 de junio de 2017, CCT La Plata. Se adjunta certificado.

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

Subsidio personal, Inv. Asistente, CICPBA, $16.000 (dic 2017). Gastos dirigidos a la compra de insumos básicos de laboratorio.

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

18. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO.

19. 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.*

20. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO. *Indicar el porcentaje aproximado de su tiempo que le han demandado.*

Grado: Profesora Adjunta, a cargo de la asignatura Toxicología de Alimentos (Lic. Química, Fac. Cs Exactas y Naturales, UNLPam), con dictado de clases teóricas y coordinación con los TP respectivos a cargo de otra docente, además de la toma de exámenes parciales y finales.

Posgrado: “Bioensayos: utilidad en la evaluación toxicológica”. Teórico-práctico, 40hs, 8 al 13 de noviembre de 2017. Fac. Cs Exactas y Naturales, UNLPam. Docentes: Fanelli SL, Bartel LC, Mastrantonio GE, Poggio Herrero IV y Rodríguez C. (Res CD 363/201).

Formación de recursos humanos: Dirección de tesis de grado de la estudiante Sofía Mandrile (Lic. Química, UNLPam), codirección Lic. Vanina Bogino. Tema: "Determinación de valores de referencia basales de colinesterasa plasmática en población adulta en Realicó, La Pampa”. Defensa y aprobación 070/7/2017.

Codirección de tesis de grado de la estudiante Micaela Mules (Lic Biotecnología, UNLP), dirección Dr. Guido Mastrantonio. Tema: "Estudio preliminar del metabolismo de benznidazol en un sistema in vitro". Defensa y aprobación 31/08/2017.

Comisión evaluadora. Jurado de dos tesinas de grado de las estudiantes de la Lic en Química, UNLPam: Luciana Paradiso (28/04/2017,Desarrollo de un método novedoso para la determinación simple y rápida de metales de desgaste por MPAES en aceites lubricantes usados”) y Camila Rodríguez (07/07/2017, "Uso de bioensayos para la evaluación toxicológica de efluentes provenientes de producción láctea en la provincia de La Pampa").

Las actividades antes citadas fueron cubiertas con la dedicación simple del cargo docente. Se adjunta certificacion de cada punto.

21. 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.*

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

Caracterización química y biológica de metabolitos microbianos de interés agronómico. Rol de los metabolitos de Stemphylium lycopersici en el desarrollo de la mancha gris del tomate.

Los patógenos de plantas producen sustancias tóxicas que juegan un rol fundamental en la patogénesis y en las interacciones planta-patógeno. De allí la

importancia de conocer aquellas fitotoxinas con capacidad para dañar a las plantas, así como la reacción del huésped frente a las mismas (Scheffer & Briggs, 1981).Entre los distintos microorganismos patógenos, los hongos representan una fuente prolífica de moléculas bioactivas, muchas veces subvalorada (Loureiro et al., 2018). Así, el descubrimiento de nuevos fármacos y la identificación de toxinas patógenas pasó a complementarse con la utilidad de los metabolitos secundarios y los genes que los sintetizan en la clasificación taxonómica, filogenia y evolución fúngica, así como los procesos genéticos que regulan su biosíntesis (Stadler & Keller, 2008).

Los metabolitos que producen los hongos endófitos pueden tener actividad antimicrobiana, antiparasitaria y citotóxica. Las aplicaciones derivadas de su bioactividad se complementan con la información que pueden dar respecto de los mecanismos de interacción entre el patógeno y el huésped (Aly et al., 2011). Muchos productos de las vías metabólicas asociadas a la síntesis de metabolitos bioactivos aún no han sido identificados, por no lograr su expresión en condiciones de laboratorio. Esto sugiere que el contexto metabólico ofrecido por el huésped es necesario para inducir la expresión génica por parte del agente infeccioso (Aly et al., 2011).

La expresión de peptidos antimicrobianos puede ser constitutiva o inducida durante la invasión microbiana o daño físico (Vriens et al., 2014). Las prácticas usuales de control de patógenos de plantas se basan mayormente en el uso de cultivares resistentes, prácticas de manejo culturales, así como la aplicación de pesticidas sintéticos y biopesticidas (Emmert & Handelsman, 1999). El estudio de los metabolitos secundarios potencialmente involucrados podría ayudar a descubrir compuestos con estructuras químicas o mecanismos de acción novedosos (Collemare et al., 2008).

Los metabolitos secundarios excretados durante la interacción con la planta son moléculas de bajo peso molecular con estructuras químicas diversas y usualmente polares (Zheng et al., 2010). Su acción puede ser específica o no, de acuerdo al huésped sobre el que actúan (Agrios, 2005) y se clasifican como poliquétidos, péptidos no ribosomales, terpenos o alcaloides (Collemare et al., 2008).

El estudio clásico de metabolitos implica el uso de filtrados de cultivos fúngicos para su análisis químico y estudios de patogenicidad. Aunque es accesible detectar sustancias tóxicas en los filtrados, usualmente es difícil relacionarlos con la etiología de una enfermedad. La necesidad de aislar la toxina de la planta enferma, purificarla y reproducir los síntomas de la enfermedad por reinyección de la toxina, es uno de los postulados clásicos que definen a las fitotoxinas. Debido a la labilidad de estos compuestos y que se suelen obtener pequeñas cantidades, este procedimiento es poco practicable. Por ello, cada toxina debe ser examinada aplicando diversos criterios y procedimientos (Scheffer & Briggs, 1981).

El aislamiento de sustancias químicas a partir de mezclas complejas requiere de la aplicación de técnicas con distintos grados de complejidad. Entre otras, la cromatografía en capa fina (TLC) es el método cromatográfico más versátil y flexible para la separación de sustancias orgánicas e inorgánicas solubles. Es comúnmente aplicada en el screening de sustancias debido a que permite el análisis simultáneo de hasta 30 muestras por placa (Sherma & Fried, 2005).

El presente plan de trabajo aplica un esquema de análisis químico de screening de metabolitos secundarios bioactivos para el patosistema Stemphylium-tomate. Se espera generar las bases necesarias para que, en el corto a mediano plazo, se adapte al estudio de metabolitos producidos por otros géneros de hongos de estructuras de tonalidad oscura (Dematiaceas) estudiados en el CIDEFI. Entre ellos se encuentran Alternaria, Bipolaris, Cladosporium, Dreschlera, Epicoccum y Pyricularia, asociados a patologías en cereales y hortícolas de relevancia económica para la zona.

Patosistema Stemphylium-Tomate.

El cultivo de tomate (Solanum licopersicon), originario de la zona andina de América del Sur, fue domesticado y luego llevado a Europa (siglo XVI). En la actualidad, se cultivan diferentes variedades en diversas regiones del mundo para su consumo fresco o industrializado, y son China y EEUU los productores líderes (Entio & Mujica, 2016, Jones et al., 2014). Según proyecciones actuales del ministerio de Agroindustria,

diversas regiones de Argentina tienen potencial para aumentar el área cultivada y la producción de tomate, que, en la actualidad cubren el 70% del consumo interno. Para el año 2016, se estimaban 15.000 has dedicadas al cultivo de tomate en las 4 regiones principales (Min. Agroindustria 2017) y de ellas, la mitad correspondían a la región bonaerense, todas bajo cubierta. En la provincia de Buenos Aires predominan dos zonas de producción de tomate, una rodea a la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y La Plata, y la otra rodea Mar del Plata. Además de cultivar híbridos comerciales, en el cinturón hortícola platense se cultiva predominantemente el tomate "platense", variedad local adaptada a las condiciones agroclimáticas y prácticas culturales de la zona (Entio & Mujica, 2016).

El cultivo bajo cubierta provee condiciones de temperatura y humedad relativa propicias para el desarrollo de distintos patógenos foliares, principalmente hongos (Jones et al., 2014). Bajo estas condiciones, el cultivo de tomate es afectado principalmente por el moho de la hoja (Cladosporium fulvum) y la mancha gris de la hoja (Stemphylium lycopersici)(Franco et al., 2017a; Ronco et al., 2008). En nuestro país, esta última enfermedad tiene incidencia en las principales provincias productoras, como son Corrientes, Buenos Aires, Salta y Mendoza. La mancha gris de la hoja es una de las enfermedades más destructivas en tomate (Franco et al., 2017a, Jones et al., 2014). Los hongos del género Stemphylium están ampliamente distribuidos en la naturaleza y tienen un amplio rango de hospedantes con los que establecen relaciones patogénicas, saprotróficas o endofíticas. Entre otros hospedantes, S. lycopersici afecta principalmente a tomate y pimiento (Franco et al., 2015, Franco et al., 2017b, Farr & Rossman, 2018). Las especies patogénicas pueden reducir severamente el rendimiento vegetal, derivando en pérdidas económicas en la producción de hortalizas y frutales (Nasehi et al., A 2014).

La necesidad de sostener la producción actual y de aumentarla paulatinamente, implica controlar a las patologías típicas de cultivos bajo cubierta. Para el control de la mancha gris de la hoja se recomienda el uso de cultivares resistentes y, cuando se utilizan variedades susceptibles, es necesaria la aplicación regular de fungicidas (Jones et al., 2014, Yang et al., 2017). Sin embargo, no hay antecedentes respecto de cómo responden los híbridos comerciales frente a S. lycopersici.

El inicio de la infección de una planta es determinante para el desarrollo posterior de la enfermedad y en ésta, los metabolitos secundarios juegan un rol fundamental. Los patógenos secretan moléculas efectoras que interfieren con procesos fisiológicos de la planta hospedante y disminuyen así su capacidad de defensa (Doehlemann & Hemetsberger, 2013). Al mismo tiempo que estos metabolitos actúan como factores de virulencia, desencadenan la respuesta de la planta induciendo muchas veces la Resistencia Sistémica Adquirida (RSA) (Yang et al., 2017) . Como resultado, se observan diferentes grados de inmunización frente a un amplio espectro de patógenos, generando reacciones de hipersensibilidad en hospedantes resistentes o intensidad variable de la enfermedad en hospedantes susceptibles (Shah et al., 2014).

Los hongos del género Stemphylium son productores de diversas fitotoxinas, entre las que se encuentran stemphylin, stemphyloxin I y II, stemphyltoxins I-IV, stemphyperylenol, stemphol y macrosporina (Andersen et al., 1995, Debbab et al., 2009, Zheng et al., 2010, Olsen 2018). Además, en diferentes estudios de quimiotaxonomía se han descripto otros metabolitos producidos por especies de este género, de estructura y función química desconocidas (Olsen et al., 2018, Zheng et al., 2010).

La identificación química y caracterización biológica de los compuestos asociados a factores de virulencia o a indicadores de RSA permitirá establecer estrategias para el manejo integrado de la mancha gris de la hoja en los cultivos de tomate de la región. En ese sentido, el estudio de los metabolitos producidos por cepas de S. lycopersici con diferentes grados de virulencia permitirá conocer variables asociadas potencialmente a la interacción patógeno-planta y así, avanzar en métodos de control biológico o químico del patógeno.

Se propone estudiar los metabolitos secundarios producidos por S. lycopersici y su potencial asociación con la inducción de RSA. Ésta última, una herramienta alternativa

importante para el manejo sustentable de patologías como la mancha gris de la hoja en cultivares susceptibles bajo cubierta, como los que se utilizan en nuestra región.

Hipótesis:

I-El perfil de metabolitos secundarios sintetizados en diferentes condiciones permite evaluar su rol en el desarrollo patogénico.

II-S. lycopersici sintetiza metabolitos secundarios bioactivos como resultado de su interacción con las plantas de tomate.

III-Los metabolitos secundarios actúan como factores de virulencia.

Objetivo general: Caracterizar química y biológicamente a metabolitos microbianos bioactivos asociados con diversas patologías vegetales. En particular, evaluar el rol de los metabolitos secundarios de S. lycopersici en el desarrollo de la mancha gris del tomate.

Objetivos específicos:

I-Poner a punto la extracción, separación e identificación de metabolitos secundarios de S. lycopersici por medio de metodologías analíticas de diversa complejidad.

II-Identificar metabolitos secundarios producidos por cepas de S. lycopersici que difieren en su virulencia y evaluar si su producción cambia luego de interaccionar con extracto de planta de tomate.

III-Analizar la respuesta de plantas de tomate susceptibles a la enfermedad frente a la exposición a metabolitos secundarios de S. lycopersici.

IV-Caracterizar biológicamente a los metabolitos secundarios obtenidos por medio de diferentes ensayos in vitro/in vivo.

V-Definir si los componentes por separado mantienen la bioactividad de la mezcla, de manera de diferenciar responsables específicos de la acción patogénica.

Metodología:

Se trabajará con las cepas CIDEFI-216 (virulenta) y CIDEFI-206 (poco virulenta) de S. lycopersici. El análisis bioinformático de la secuencia de CIDEFI-216 reveló gran cantidad de clusters de genes que codifican para la síntesis de metabolitos secundarios (Franco et al., 2017 a). Ambas cepas pertenecen al cepario del CIDEFI y fueron aisladas de plantas de tomate (Elpida) con sintomatología típica de la mancha gris de la hoja.

Se cultivarán en medio líquido comparando entre el medio base y el mismo medio suplementado con extracto de hoja de tomate. Los metabolitos secundarios excretados al medio se analizaran por distintas metodologías químicas buscando optimizar su extracción y separación, así como lograr identificar y caracterizarlos.

Por último, se evaluará la respuesta de plantas de tomate frente a los sobrenadantes y a los extractos purificados de éstos. La severidad de los signos se evaluará en plantas del cultivar comercial Torry (Syngenta), susceptible a Stemphylium spp. Se espera establecer una batería analítica sencilla que permita extraer, purificar e identificar a los metabolitos secundarios y evaluar si su producción se correlaciona con la diferente virulencia de ambas cepas en estudio.

Referencias (en orden de aparición)

Scheffer RP, Briggs SP (1981) Toxins in plant disease. 1st chapter, Introduction: a perspective of toxin studies in plant pathology. Durbin RD (Ed). Academic Press, New York.

Loureiro C, Medema MH, van der Oost J, Sipkema D (2018) Exploration and exploitation of the environment for novel specialized metabolites. Current Opinion in Biotechnology 5:206-13

Stadler M, Keller NP (2008) Paradigm shifts in fungal secondary metabolite research. Mycological Research 112:127-30.

Aly AH, Debbab A, Proksch P (2011) Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. Applied Microbiology and Biotechnology 90:1829-45.

Vriens K, Cammue BPA, Thevissen K (2014) Antifungal Plant Defensins: Mechanisms of Action and Production. Molecules, 19, 12280-303.

Emmert EAB, Handelsman J (1999) Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive persepctive. FEMS Microbiology Letters 171:1-9.

Collemare J, Billard A, Böhnert HU, Lebrun MH (2008) Biosynthesis of secondary metabolites in the rice blast fungus Magnaporthe grisea: the role of hybrid PKS-NRPS in pathogenicity. Mycological Research 112:207-15.

Zheng L, Rujing LV, Huang J, Jiang D (2010) Isolation, purification and biological activity of a phytotoxin produced by Stemphylium solani. Plant Disease 94:1231-7.

Agrios GN (2005) Plant Pathology. Chapter 4, Genetics of plant disease. Elsevier Academic Press Publications pp 145.

Sherma J, Fried B (2005) Handbook of thin-layer chromatography, (Chromatographic science series Vol 89), Ed. Taylor & Francis.

Entio L, Mujica M. (2016) Evaluation of Tomato Lines Derived from Landraces of “Tomate Platense” and a Commercial Hybrid in La Plata, Argentina. Journal of Agricultural Science and Technology B 6 (2016) 78-82 doi: 10.17265/2161-6264/2016.02.003

Jones JB, Zitter TA, Momol TM, Miller SA (2014) Compendium of tomato diseases and pests. Second Edition. APS Press, USA, 168p.

Informe del Mercado Externo del Tomate (2017) Subsecretaría de Mercados Agropecuarios Ministerio de Agroindustria. https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas

Franco MEE, Troncozo MI, López SMY, Lucentini G, Medina R, et al (2017a)A survey on tomato leaf grey spot in the two main production areas of Argentina led to the isolation of Stemphylium lycopersici representatives which were genetically diverse and differed in their virulence. European Journal of Plant Pathology, 1-18.

Ronco L, Rollán C, Larrán S, Mónaco C, Dal Bó, E (2008) Manual para el Reconocimiento de Enfermedades: TOMATE Y PIMIENTO – Cinturón Hortícola del Gran Buenos Aires. Ed. Universidad Nacional de La Plata, 56 pp. ISBN 978-950-34-0489-8.

Franco MEE, López SMY, Medina R, Lucentini CG, Troncozo MI, et al. (2017b) The mitochondrial genome of the plant-pathogenic fungus Stemphylium lycopersici uncovers a dynamic structure due to repetitive and mobile elements. PLoS ONE 12(10): e0185545. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185545

Farr DF, Rossman AY (2018) Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. Retrieved March 5, from https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/

Nasehi A, Kadir J, Nasr-Esfahani M, Abed-Ashtiani F, Wong M, et al. (2014) Analysis of genetic and virulence variability of Stemphylium lycopersici associated with leaf spot of vegetable crops. European Journal of Plant Pathology140:261–73.

Yang H, Zhao T, Jiang J, Chen X, Zhang H, et al. (2017) Transcriptome Analysis of the Sm-Mediated Hypersensitive Response to Stemphylium lycopersici in Tomato. Frontiers in Plant Science, 8, 1257.

Doehlemann G, Hemetsberger C (2013) Apoplastic immunity and its suppression by filamentous plant pathogens. New Phytologist 198: 1001–16 doi: 10.1111/nph.12277

Shah J, Chaturvedi R, Chowdhury Z, Venables B, Petros R (2014) Signaling by small metabolites in systemic acquired resistance. The Plant Journal 79, 645–658

Andersen B, Solfrizzo M, Visconti A (1995) Metabolite profiles of common Stemphylium species. Mycological Research 99(6): 672-76.

Debbab A, Aly AH, Edrada-Ebel RA, Wray V, Müller WEG, et al. (2009) Bioactive metabolites from the endophytic fungus Stemphylium globuliferum isolated from Mentha pulegium. Journal of Natural Products 72, 626-31.

Olsen KJK, Rossman A, Andersen B (2018) Metabolite production by species of Stemphylium. Fungal Biology 122 172-81.

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 22).
   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.gob.ar (puntos 1 al 22), 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.

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

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