

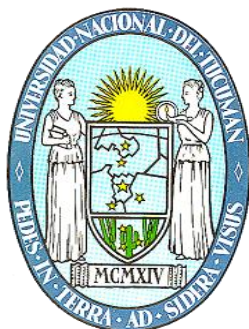
UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN
FACULTAD DE BIOQUÍMICA, QUÍMICA Y FARMACIA

**DESARROLLO DE ESTRATEGIAS DE BIOCONTROL PARA UN MANEJO
FITOSANITARIO SUSTENTABLE DE CULTIVOS DE
IMPORTANCIA REGIONAL**

Tesis Doctoral

Lic. Pía de los Ángeles Di Peto

-2017-



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN
FACULTAD DE BIOQUÍMICA, QUÍMICA Y FARMACIA

HONORABLE CONSEJO DIRECTIVO

Dra. Patricia Eugenia Álvarez

Dra. Gabriela Perdigón

Bioq. Farm. Ana María del Valle González

Dra. María Eugenia Mónaco

Dra. Carolina Serra Barcellona

Dra. María José Rodríguez Vaquero

Farm. Verónica Pastoriza

Sr. Walter Ricardo Gómez

Sr. Francisco Andrés Díaz

Srta. Ivana Micaela Núñez

Sr. Gonzalo Andrés Lascano

DECANA

Dra. Silvia Nelina González

VICE-DECANA

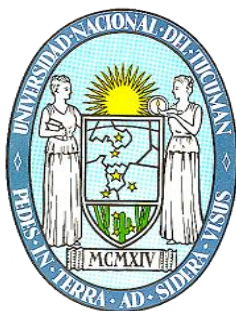
Dr. Edgardo Hugo Cutin

SECRETARIA DE ASUNTOS ACADEMICOS

Dra. Marta Elena Cecilia

JEFA DEL DEPARTAMENTO POSGRADO

Lic. Marta Quinteros



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN
FACULTAD DE BIOQUÍMICA, QUÍMICA Y FARMACIA

DEPARTAMENTO DE POSGRADO

AUTORIDADES

DIRECTOR

Dr. Sergio Enrique Pasteris

CONSEJO TITULAR

Dra. Inés del Carmen Ramos

Dra. María Carolina Navarro

Dra. Maria Cristina Gaudioso

Dra. Paula Andrea Vincent

Dra. Maria Cristina Rubio

CONSEJO SUPLENTE

Dra. Maria Graciela Benzal

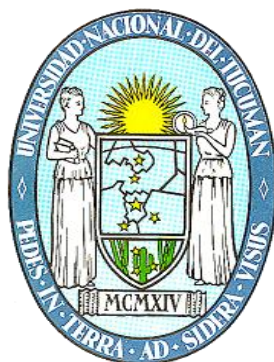
Dra. Clara del Valle Silvia de Ruiz

Dra. María Inés Nieva Moreno

REPRESENTANTE DE POSGRADO

ANTE LA SECRETARÍA DE POSGRADO DE LA UNT

Dra. Paula Andrea Vincent



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN
FACULTAD DE BIOQUÍMICA, QUÍMICA Y FARMACIA

TRABAJO DE POSGRADO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO ACADÉMICO
SUPERIOR DE DOCTOR/A EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

CARRERA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Acreditado y Categorizado “A” ante la
Comisión Nacional de Acreditación Universitaria (CONEAU)

Resolución n°: 615/07

Director

Dr. Atilio Pedro Castagnaro

Vice-Directora

Dra. Viviana Andrea Rapisarda

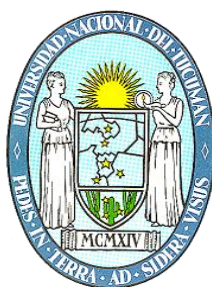
Comité Académico

Dr. Alfredo Grau

Dr. Raúl Pedraza

Dra. Lucia Clapz

Dra. Silvina Fadda



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN
FACULTAD DE BIOQUÍMICA, QUÍMICA Y FARMACIA

TRABAJO DE POSGRADO TITULADO:

**DESARROLLO DE ESTRATEGIAS DE BIOCONTROL PARA UN MANEJO
FITOSANITARIO SUSTENTABLE DE CULTIVOS DE
IMPORTANCIA REGIONAL**

TESISTA

Lic. Pía de los Ángeles Di Peto

DIRECTOR

Dra. María Paula Filippone

CODIRECTOR

Dra. Alicia Mamaní de Marchese

COMISION DE SUPERVISION

Dr. Juan Carlos Diaz Ricci

Dra. Catiana Zampini



ESTACION
EXPERIMENTAL
AGROINDUSTRIAL
OBISPO COLOMBRES
Tucumán | Argentina



Este trabajo de Tesis Doctoral se realizó en la Sección Biotecnología del Instituto de Tecnología Agroindustrial del Noroeste Argentino (ITANOA), Unidad Ejecutora de doble dependencia entre CONICET y la Estación Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC).

El apoyo financiero para la realización de este trabajo de Tesis Doctoral fue provisto por la EEAOC y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a Dios por ser la esencia de todo en mi vida, y el doctorado no fue la excepción en el proceso de la evolución espiritual, guiado por esa esencia.

A mi familia por acompañarme paso a paso en estos difíciles años de trabajo, disfrutando los pequeños logros y alentándome en los nuevos desafíos. A mis padres, Julia y Antonio, por enseñarme con su ejemplo a crecer como persona día a día, y a que todo en la vida se puede conseguir con humildad, dedicación y sacrificio. A mis hermanas Chanty y Anto, por escucharme y aconsejarme en los momentos difíciles y festejar los buenos. A mi cuñada y amiga, Romina por sus enseñanzas de vida. A mi gran amor y compañero de vida, Esteban, le agradezco por su tierna compañía y su apoyo incondicional. Gracias por compartir mi vida y mis logros, esta tesis también es suya. A mis hijos, Tomy y Lucianito, por la alegría y las fuerzas que me dan para seguir adelante.

Quiero expresar sincero agradecimiento a mis directoras, Paula y Mony por guiarme y enseñarme el arte de la ciencia, por aportar cada una desde su especialidad y experiencia. Y especialmente por haberme comprendido en momentos difíciles que pudieran haber interrumpido la continuidad de mis tareas, y por las veces que sacrificaron de su tiempo personal para avanzar en este proyecto.

A todas mis amigas de la vida, Cele, Ivanna, Marisa, Anita, Nadia, Carlitos, Rocío, Carlita que siempre estuvieron acompañando mis tristezas y alegrías. Gracias por los momentos compartidos.

A mis amigos y compañeros de la EEAOC; con quienes compartí charlas y experimentos. Crecí con ellos como persona y profesionalmente, gracias por sus conocimientos, paciencia, apoyo y colaboración brindada y sobre todo por el cariño recibido en cada día.

Gracias a todos de corazón...

A los Dres. Juan Carlos Diaz Ricci y Catiana Zampini, que siendo en conjunto mi comisión de supervisión, hicieron aportes valiosos para la interpretación de mis resultados y la corrección de este trabajo.

RECONOCIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Tucumán por ser el espacio de mi formación académica desde la etapa de grado, que ha posibilitado que me convierta en profesional y me perfeccione.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas que me otorgó la beca que hizo posible este trabajo de doctorado.

A la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC), que constituyó el lugar de realización de este trabajo de Tesis Doctoral.

Al Instituto de Química Biológica “Dr. Bernabé Bloj”, de la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia y al Departamento Bioquímica de la Nutrición del Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO) que me permitió llevar a cabo parte de mis ensayos.

A mi país, la República Argentina, que permite la formación universitaria libre y gratuita, tanto de grado como de posgrado.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA RELACIONADA CON EL TEMA DE TESIS

TRABAJOS PUBLICADOS

Hael Conrad V, Perato SM, Arias M E, Martínez Zamora M G, Di Peto P, Martos GG, Chalfoun NR (2017). The elicitor protein AsES induces a SAR response accompanied by systemic microbursts and micro-HRs in *Fragaria ananassa*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*.

Filippone MP, Di Peto P, Grellet Bornounville C, Chalfoun NR, Tórtora ML, Vera L, Mamaní A, Castagnaro AP (2017). Bioproductos y sanidad vegetal. *Avance Agroindustrial*. Vol. 38- Nº 1. pag. 24-32. ISSN: 0326-1131.

PRESENTACIONES EN EVENTOS CIENTÍFICOS

Di Peto, P.; Cerviño, A.M.; Grellet, C; Castagnaro, A.P.; Mamaní, A. y Filippone, M.P. “Evaluación de un extracto vegetal inductor de la defensa en plantas, para el control de la mancha anillada de la soja”. **X Simposio Nacional de Biotecnología REDBIO**. Septiembre de 2015. San Miguel de Tucumán, Argentina.

Cerviño, A. M.; Di Peto, P.; Grellet, C.; Castagnaro A. P.; Filippone, M. P. y Mamaní, A. “Efecto de los factores ambientales en el contenido de HeT, un compuesto vegetal que induce la defensa contra fitopatógenos”. **X Simposio Nacional de Biotecnología REDBIO**. Septiembre de 2015. San Miguel de Tucumán, Argentina.

Cerviño, A. M.; Di Peto P. “Variación estacional del contenido de compuestos fenólicos y de la actividad antibiótica de extractos de hojas de frutilla”. **V jornadas de Jóvenes Investigadores de la UNT**. Julio de 2012. San Miguel de Tucumán.

RESUMEN

Actualmente urge la necesidad de generar prácticas agrícolas sustentables apoyadas en la conservación de los recursos naturales elementales tales como el suelo, agua y biodiversidad, sin generar efectos dañinos en la salud humana y animal, contexto en el que los bioproductos o insumos biológicos, son elementos claves. Estos insumos son productos obtenidos a partir de organismos vivos o sus derivados, que mediante el uso de herramientas biotecnológicas permiten cubrir un amplio espectro de prestaciones generando un efecto benéfico sobre la sanidad o el crecimiento de los cultivos. En este trabajo de tesis se diseñó y optimizó la producción de un extracto acuoso vegetal (EAF) a partir de hojas de frutilla (*Fragaria x ananassa* Duch.), enriquecido en dos compuestos fenólicos previamente aislados y caracterizados (HeT y HgT) con propiedades antimicrobianas e inductoras de la defensa vegetal contra patógenos. Se logró poner a punto un protocolo para la obtención de EAF de bajo costo económico, simple e inocuo. El efecto protector de EAF contra enfermedades se evaluó en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* y en los cultivos de soja (*Glycine max*), caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) y limonero (*Citrus limon*).

En *A. thaliana* se evaluó el efecto de protección contra las enfermedades producidas por *Pseudomonas viridiflava* y *Botrytis cinerea*. Se determinó que el EAF redujo los síntomas de ambas enfermedades cuando se aplicaron concentraciones subinhibitorias (0,012 g PF/mL) 4 días antes de la inoculación con los patógenos. Se comprobó que el fenómeno de protección sería consecuencia de la inducción de las defensas vegetales innatas ya que se produjeron eventos bioquímicos asociados, tales como la acumulación de Especies Reactivas del Oxígeno (EROs), incremento de los depósitos de calosa, del contenido de compuestos fenólicos totales, y la inducción de genes relacionados a las principales vías de señalización de las defensas: *PR1* (ácido salicílico), *PDF1.2* (ácido jasmónico/etileno), *PR2* y *PR4* (etileno) y *VSP1* (ácido jasmónico).

En soja se determinó que el EAF también ejerce un efecto de protección mediante la inducción de las defensas innatas de la planta. La aplicación foliar del EAF 3 días previos a la inoculación disminuyó en un 40% los síntomas de la enfermedad de la mancha anillada causada por *Corynespora cassiicola*, e indujo la acumulación de EROs, calosa y compuestos fenólicos totales, y la sobreexpresión de los genes de defensa *PR1*, *PR10* (ácido jasmonico/etileno), *SCaM4* y *SCaM5* (señalización de calcio).

En caña de azúcar, el tratamiento externo con EAF no produjo una reducción significativa en la severidad de los síntomas producidos por la inoculación con *Acidovorax avenae*, agente causal de la estría roja, pero si redujo la incidencia de la enfermedad.

En citrus, se evaluó la capacidad antimicrobiana de EAF para controlar las enfermedades causadas por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*, agente causal de la canchrosis de los cítricos) y por *Penicillium digitatum* (agente causal de la podredumbre verde). Se determinó la CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) de EAF para *Xcc* (0,05 g PF/mL) y para *P. digitatum* (0,2 g PF/mL). En el tratamiento con EAF de frutos infectados naturalmente con *Xcc*, se observó una disminución de la población bacteriana de la superficie en tres unidades logarítmicas. Igualmente, los tratamientos preventivos y curativos de limones inoculados con *P. digitatum*, disminuyeron la severidad e incidencia de la enfermedad de manera significativa.

Los resultados obtenidos permitieron demostrar que el extracto EAF es eficaz para el control de enfermedades vegetales mediante un efecto directo sobre el patógeno o indirecto por medio de la inducción de los mecanismos de defensa de la planta. Se proyecta realizar ensayos en condiciones no controladas (a campo) para avanzar en la caracterización del EAF con vistas a la obtención de una formulación comercial.

PALABRAS CLAVES: Bioproductos, Inducción de la Defensa Vegetal, Sanidad Vegetal

ABSTRACT

Now a day, it is necessary to generate more sustainable agricultural practices based on the conservation of natural resources such as soil, water and biodiversity without causing harmful effects on human and animal health, context in which bio-products or biological inputs are key elements. These inputs are products obtained from living organisms or their derivatives, which through the use of different biotechnological tools cover a wide spectrum of benefits that produce a positive effect on plant health or growth. In this work we designed and optimized the production of an aqueous plant extract (EAF) from strawberry leaves (*Fragaria x ananassa* Duch.), enriched in two phenolic compounds previously isolated and characterized (HeT and HgT) with antimicrobial and plant pathogen defense inductive properties. It was possible to optimized an inexpensive, simple and harmless protocol for obtaining EAF. The protective effect against diseases of EAF was evaluated in the model plant *Arabidopsis thaliana* and the crops soybean (*Glycine max*), sugarcane (*Saccharum officinarum*) and lemon (*Citrus limon*).

In *A. thaliana* the effect of protection against diseases caused by *Pseudomonas viridiflava* and *Botrytis cinerea* was evaluated. EAF reduced the symptoms of the two diseases when pathogen subinhibitory concentrations (0,012 g leaves fresh weight /mL) were applied 4 days prior to pathogen inoculation. It was demonstrated that the protective effect was a consequence of the induction of innate plant defenses as it produced associated biochemical events, such as an oxidative burst (ROS), callose deposition and total phenolic compounds accumulation, and induction of known pathogen defense related genes such as *PR1* (salicylic acid), *PDF1.2* (jasmonic acid/ ethylene), *PR2* and *PR4* (ethylene) and *VSP1* (jasmonic acid).

In soybean it was determined that EAF also exerts a protective effect by inducing plant's innate defenses. Leaf application of EAF, 3 days prior to pathogen inoculation, decreased in a 40% the symptoms of target spot disease caused by *Corynespora cassiicola*. Also induced the accumulation of ROS, callose, total phenolic compounds, and the expression of known pathogen defense genes such as *PR1*, *PR10* (jasmonic acid/ ethylene), *SCaM4* and *SCaM5* (calcium signaling).

In sugarcane, foliar application of EAF did not result in a significant reduction of red stripe symptoms caused by the bacterial pathogen *Acidovorax avenae*, but reduced the disease incidence.

In citrus, the antimicrobial capacity of EAF was assayed to control citrus canker disease caused by *Xanthomonascitri* subsp. *citri* (*Xcc*) and green rot disease caused by *Penicillium digitatum*. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of EAF was 0.05 g fresh weight of leaves per mL and 0.2 g fresh weight of leaves per mL, for *Xcc* and *P. digitatum*, respectively. In naturally *Xcc* infected fruits treated with EAF, the superficial bacterial population decreased 3 log units. Likewise, preventive or curative treatments of *P. digitatum* inoculated lemon fruits significantly decreased the severity and incidence of this postharvest disease.

These results have demonstrated that EAF treatment exerts an effective control of plant diseases by means of a direct effect on the pathogen or an indirect effect by activation of the plant immunity. The next step will be to conduct experiments under uncontrolled conditions in fields, to acquire more knowledge before developing a commercial formulation based on EAF.

Key words:Bio-products, Induction of Plant Defense, Plant Health

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

I.1 Los problemas sanitarios de la agricultura	1
I.2 El uso de los agroquímicos de síntesis	2
I.3 Alternativas sustentables para el manejo de plagas y enfermedades	5
I.3.1 Bioproductos de origen microbiano	8
I.3.2 Bioproductos de origen vegetal	9
I.4 Los bioproductos en el mundo y en Argentina	11
I.5 ¿Por qué es importante el uso de bioproductos en la agricultura?	12
I.6 Antecedentes del grupo de trabajo	13

CAPÍTULO II

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II.1 HIPÓTESIS GENERAL DE TRABAJO	15
II.2 OBJETIVO GENERAL	16
II.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16

CAPÍTULO III

OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE UN EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE FRUTILLA ENRIQUECIDO EN LOS COMPUESTOS HgT Y HeT.

III.1 INTRODUCCIÓN	17
III.1.1 Metabolitos secundarios de las plantas	18
III.1.2 La frutilla: sus potencialidades como fuente de metabolitos activos	18
III.2 MATERIALES Y MÉTODOS	19
III.2.1 Material vegetal	22
III.2.2 Secado y molienda de hojas	22
III.2.3 Obtención del extracto acuoso	22
III.2.4 Microorganismos	23
III.2.5 Condiciones de crecimiento de los microorganismos	23
III.2.6 Ensayos de inhibición del crecimiento microbiano <i>in vitro</i>	24
III.2.7 Determinación de compuestos fenólicos totales	24
III.2.8 Evaluación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	25
III.3 RESULTADOS	25
III.3.1 Optimización del protocolo de obtención del EAF	26
III.3.2 Caracterización biológica del EAF	26
III.3.2.1 Actividad antimicrobiana	29
III.3.2.2 Contenido de compuestos fenólicos solubles totales	29
III.3.2.3 Presencia de los compuestos bioactivos HgT y HeT en el EAF	30
III.3.3 Propuesta de planta piloto para el escalado del EAF	31
III.4 DISCUSIÓN	33
III.5 CONCLUSIONES PARCIALES	36

CAPITULO IV
EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO CON EAF EN LA
INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA DE DEFENSA EN LA PLANTA MODELO
ARABIDOPSIS THALIANA

IV.1 INTRODUCCIÓN	41
IV.1.1 La defensa vegetal	42
IV.1.2 Imitar a la naturaleza	45
IV.2 MATERIALES Y MÉTODOS	46
IV.2.1 Producción de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	46
IV.2.2 Microorganismos	48
IV.2.3 Preparación de los inóculos	48
IV.2.4 Infección con bacterias	49
IV.2.5 Inoculación con <i>Botrytis cinerea</i>	49
IV.2.6 Evaluación de fitotoxicidad	50
IV.2.7 Evaluación de actividad antimicrobiana contra <i>P. viridiflava</i> y <i>B. cinerea</i>	50
IV.2.8 Tratamiento con el EAF	50
IV.2.9 Detección de especies reactivas del oxígeno	51
IV.2.10 Extracción de compuestos fenólicos	51
IV.2.11 Visualización de la deposición de calosa	52
IV.2.12 Análisis estadístico	52
IV.2.13 Análisis de expresión génica	52
IV.2.13.1 Extracción de ARN	52
IV.2.13.2 Retrotranscripción	53
IV.2.13.3 PCR cuantitativa en tiempo real	54
IV.3 RESULTADOS	56
IV.3.1 Optimización de la producción de plantas de <i>A. thaliana</i>	56
IV.3.2 Optimización de patosistemas en <i>A. thaliana</i>	57
IV.3.3 Actividad antimicrobiana del EAF contra <i>P. viridiflava</i> y <i>B. cinerea</i>	60
IV.3.4 Evaluación de la fitotoxicidad de EAF	61
IV.3.5 Ensayos fitopatológicos para evaluar el efecto de protección de EAF	61
IV.3.6 Caracterización bioquímica de la respuesta de defensa inducida por EAF	65
IV.3.6.1 Producción de especies reactivas del oxígeno	65
IV.3.6.2 Acumulación de depósitos de calosa	66
IV.3.6.3 Cuantificación de fenólicos totales	67
IV.3.7 Caracterización molecular de la respuesta de defensa inducida por EAF en <i>A. thaliana</i>	68
IV.4 DISCUSIÓN	71
IV.5 CONCLUSIONES PARCIALES	75

CAPITULO V
EVALUACIÓN DEL EAF EN LA PROTECCIÓN CONTRA PATÓGENOS EN
CULTIVOS DE IMPORTANCIA REGIONAL

V.1 INTRODUCCIÓN	76
V.1.1 Cultivo de la caña de azúcar	77

V.1.2 Cultivo de cítricos	78
V.1.3 Cultivo de la soja	80
V.2 MATERIALES Y MÉTODOS	83
V.2.1 SOJA	83
V.2.1.1 Obtención del material vegetal	83
V.2.1.2 Microorganismos	83
V.2.1.3 Preparación del inóculo	83
V.2.1.4 Inoculación con <i>C. cassiicola</i>	83
V.2.1.5 Evaluación de los síntomas	84
V.2.1.6 Actividad antimicrobiana de EAF contra <i>C. cassiicola</i>	85
V.2.1.7 Tratamientos con EAF	85
V.2.1.8 Detección de especies reactivas del oxígeno	86
V.2.1.9 Extracción de compuestos fenólicos	86
V.2.1.10 Visualización de la deposición de calosa	86
V.2.1.11 Análisis estadístico	86
V.2.1.12 Análisis de la expresión génica	86
V.2.1.12.1 Extracción de ARN	86
V.2.1.12.2 Retrotranscripción	87
V.2.1.12.3 PCR cuantitativa en tiempo real	87
V.2.2 CAÑA DE AZÚCAR	88
V.2.2.1 Material vegetal	88
V.2.2.2 Microorganismos	89
V.2.2.3 Preparación del inóculo	89
V.2.2.4 Actividad antimicrobiana contra <i>A. avenae</i>	89
V.2.2.5 Inoculación con <i>A. avenae</i>	89
V.2.2.6 Ensayo de protección frente estría roja	90
V.2.3 LIMONERO	90
V.2.3.1 Material vegetal	90
V.2.3.2 Microorganismos	91
V.2.3.3 Preparación del inóculo	91
V.2.3.4 Actividad antimicrobiana contra <i>Xcc</i>	91
V.2.3.5 Actividad antimicrobiana contra <i>P. digitatum</i>	92
V.3 RESULTADOS	95
V.3.1 SOJA	95
V.3.1.1 Optimización del patosistema Soja- <i>Corinespora cassiicola</i>	95
V.3.1.2 Efecto del tratamiento con EAF en la protección contra <i>Corynespora cassiicola</i>	96
V.3.1.3 Caracterización bioquímica de la respuesta de defensa inducida por EAF	99
V.3.1.3.1 Detección de EROs	99
V.3.1.3.2 Acumulación de compuestos fenólicos	100
V.3.1.3.3 Acumulación de depósitos de calosa	101
V.3.1.4 Caracterización molecular de la respuesta de defensa inducida por EAF en soja	102
V.3.2 LIMONERO	104
V.3.2.1 Efecto <i>in vitro</i> de EAF sobre <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	104

V.3.2.2 Efecto <i>in vivo</i> de EAF sobre <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	104
V.3.2.3 Efecto <i>in vitro</i> de EAF sobre <i>Penicillium digitatum</i>	106
V.3.2.4 Efecto de aplicaciones de EAF sobre el desarrollo de <i>Penicillium digitatum</i> en frutos de limonero	107
V.3.3 CAÑA DE AZUCAR	109
V.3.3.1 Ensayos de protección contra <i>Acidovorax avenae</i>	109
V.3.4 Cálculo de la capacidad potencial de producción del EAF en la provincia de Tucumán	111
V.4 DISCUSIÓN	114
V.5 CONCLUSIONES PARCIALES	120
CAPITULO VI CONCLUSIONES GENERALES Y PROYECCIONES	121
CAPITULO VII BIBLIOGRAFÍA	124

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

- Figura 1:** Triángulo de la enfermedad: la enfermedad depende de las interacciones entre la planta hospedera, el patógeno y el ambiente. 3
- Figura 2:** Porcentaje de uso agroquímicos por tipo de cultivo en Argentina. (Fuente: <http://observatoriosoja.org/nota-breve/uso-de-agroquimicos-en-soja/>) 7
- Figura 3:** Equipamiento para el secado y molienda de hojas: A) Estufa con aireación continua B) Termostato C) Molino a discos y D) interior del molino donde se muestra el detalle de las cuchillas. 22
- Figura 4:** Actividad antibacteriana (CE_{50}) contra *C. michiganensis* de los extractos metanólico (EM), acuoso con TFA (EA-TFA) y acuoso con jugo de limón (EAF). Los resultados se expresan como g PF/mL \pm desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas con $p \leq 0,05$. 30
- Figura 5:** Contenido de compuestos fenólicos totales en los extractos metanólico (EM), acuoso con TFA (EA-TFA) y acuoso con jugo de limón con y sin la precipitación con etanol (EAF y EAFs/EtOH). El contenido de compuestos fenólicos totales se determinó mediante el método Folin-Ciocalteu, expresando los resultados como mg GAE/g PF \pm desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas con $p \leq 0,05$. 31
- Figura 6:** Cromatogramas obtenidos del análisis mediante HPLC de los extractos A) EM, B) EA-TFA, C) EAFs/EtOH y D) EAF. El fraccionamiento se realizó en una columna C18, se eluyó con un gradiente de agua/metanol y se detectó a 285 nm. En cada cromatograma se indica el pico que corresponde al compuesto HeT (▲) y HgT (■). 32
- Figura 7:** Diagrama de flujo y equipamiento propuesto para el proceso de escalado del EAF en una planta piloto. 34
- Figura 8:** Equipo diseñado para la evaporación del etanol y concentración del EAF. A-Esquema del diseño de equipo (vista frontal), B- Fotografía del equipo instalado en la planta piloto de la EEAOC. 35
- Figura 9:** Esquema del modelo de zigzag que ilustra la respuesta cuantitativa del sistema inmune en plantas frente al ataque de patógenos. En la primera fase, los MAMPs (PAMPs, diamantes rojos) son reconocidos por sus PRRs para desencadenar la PTI. En la segunda fase, los patógenos más exitosos envían proteínas efectoras para interferir con la PTI, dando lugar a la ETS (del inglés, “Effector Triggered Susceptibility”). En la tercera fase, alguno de esos efectores (marcados en rojo) será reconocido por una proteína de la planta, que desencadenará la ETI, que amplificará la respuesta iniciada por la PTI, dando incluso lugar a la respuesta de hipersensibilidad (HR). Fuente: Jones y Dangl, 2006. 44
- Figura 10:** Esquema de producción de plantas de *Arabidopsis thaliana* en laboratorio. A- siembra *in vitro* de semillas en medio MS sólido. B- plántulas geminadas en medio MS sólido. C- aspecto de la plántula al momento del trasplante a sustrato. D- adaptación de las plántulas a sustrato a los 7 días del trasplante. E- plantas de tres semanas de trasplantadas, en condiciones para ser utilizadas en los ensayos; F- vista de la cámara de cría para *A. thaliana* en la EEAOC. 57
- Figura 11:** Síntomas producidos por las infecciones de *P. viridiflava* y *X. campestris* en plantas de *Arabidopsis thaliana*. En el “zoom” se observa un detalle de los síntomas de la enfermedad a los 5 dpi. 58

- Figura 12:** Recuento de la población de *P. viridiflava* en plantas de *A. thaliana* infectadas con distintas concentraciones de inóculo. Los resultados expresados como log (UFC/g PF) son el promedio \pm desvío estándar de tres experimentos independientes (n=5), a los 3 dpi. Letras diferentes indican diferencias significativas con $p \leq 0,05$ 59
- Figura 13:** Síntomas producidos por *Botrytis cinerea* en plantas de *A. thaliana* a los 2 dpi. 60
- Figura 14:** Síntomas de fitotoxicidad producidas por la aplicación del EAF en plantas de *A. thaliana*. La flecha amarilla indica la lesión necrótica provocada por el EAF a las 24 hs de la aplicación. 61
- Figura 15:** Recuento de bacterias viables en hojas de plantas tratadas con EAF. Las plantas fueron rociadas con EAF, HeT o HgT, 1 dai (A) y 4 dai (B) con una suspensión de 10^8 UFC/mL de *P. viridiflava*. El recuento de las células viables en el tejido infectado se realizó 1 y 3 dpi. Controles: plantas rociadas con agua (control de infección) o agua /limón (control del solvente), e inoculadas. Los datos obtenidos corresponden al promedio de tres experimentos independientes (n=5) y las barras de error indican el desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas con $p \leq 0,05$ 62
- Figura 16:** Síntomas causados por *P. viridiflava* en hojas de *Arabidopsis thaliana* previamente rociadas con agua/limón (Control) o con EAF a 1 o 4 dai. 63
- Figura 17:** Efecto del tratamiento de EAF contra *B.cinerea*. Plantas de *A. thaliana* de 4 semanas de edad fueron rociadas con el EAF 4 dai y luego inoculadas con una suspensión de *Botrytis cinerea* y el efecto del tratamiento se determinó en base a la presencia y tamaño de las lesiones sobre la hojas. Apariencia (A) y diámetro de las lesiones (B) de *B. cinerea* a los 2 dpi. Los datos obtenidos corresponden al promedio de tres experimentos independientes (n=5) y las barras de error indican el desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas con $p \leq 0,05$ 64
- Figura 18:** Tinción histoquímica de la acumulación de anión superóxido en *A. thaliana*. Plantas de *A. thaliana* fueron tratadas con EAF y agua/limón (Control) y teñidas con NBT al 0,1% a las 2, 4 y 6 hpt. La producción de superóxido se evidencia por la acumulación de depósitos azules. Se trabajó con tres hojas por planta y se utilizaron tres plantas por cada tratamiento (n=9). El ensayo fue realizado por triplicado de manera independiente con idénticos resultados. Se muestran fotografías representativas de cada tratamiento. 66
- Figura 19:** Detección de depósitos de calosa. Mediante la tinción con azul de anilina, la acumulación de calosa se visualiza por puntos brillantes utilizando microscopia de fluorescencia. Se tiñeron hojas de plantas de *A. thaliana* pretratadas con agua/limón, EAF, HeT o HgT sin inocular o inoculadas con *P. viridiflava*. Se colectaron tres hojas por planta, utilizando tres plantas por tratamiento (n=9). Las microfotografías representan los resultados obtenidos en tres experimentos independientes. 67
- Figura 20:** Contenido de compuestos fenólicos totales en hojas de *A. thaliana*. Se utilizaron hojas de plantas tratadas con el EAF recolectadas a los 0, 1 y 4 dpt. El contenido de compuestos fenólicos totales se determinó mediante el método Folin-Ciocalteu, expresando los resultados como mg GAE/g PF \pm desvío estándar. Control: plantas rociadas agua/limón. Letras diferentes indican diferencias significativas con $p \leq 0,05$. Se realizaron tres experimentos independientes, colectando cuatro hojas por planta, de un total de tres plantas por tratamiento (n=12). 68
- Figura 21:** Expresión cuantitativa de genes marcadores de las vías del AS, AJ y ET en plantas de *A. thaliana* tratadas con EAF. Expresión relativa de cada gen evaluado en las plantas tratadas con EAF con respecto a plantas controles rociadas con agua/limón, la cual está normalizada con respecto al gen de referencia EF1 (factor de elongación). Las barras representan valores promedios a partir de dos ensayos independientes con tres replicas biológicas para cada tratamiento (n=3). Los asteriscos indican diferencias significativas entre el control y las plantas tratadas con EAF, calculado mediante el programa LinReg ($p < 0,05$). Hay sobreexpresión génica por arriba de 0 y subexpresión por debajo de 0. 69

- Figura 22:** Escala esquemática para evaluar la severidad de la mancha anillada de soja, adaptada de Soares y col., 2009 84
- Figura 23:** Escala visual numérica de severidad en limones inoculados con *P. digitatum*. 93
- Figura 24:** Incidencia y severidad de plantas de soja inoculadas con *C. cassiicola* en diferentes concentraciones a los 7 dpi (A) y 10 dpi (B). Los datos obtenidos corresponden al promedio de tres experimentos independientes (n=9). Letras diferentes indican diferencias significativas con $p \leq 0,05$. Los diferentes colores indican niveles de severidad (superficie foliar afectada): ■ 1 (0-10%), ■ 2 (11-50%) y ■ 3 (>50%). 96
- Figura 25:** Inhibición *in vitro* del crecimiento de *C. cassiicola* en medio sólido con diferentes concentraciones de EAF (0,1 a 1 g PF/mL), a los 5 días de incubación. Control: agua/limón. 97
- Figura 26:** Incidencia y severidad de la mancha anillada en plantas de soja tratadas con EAF, previamente a la inoculación con *C. cassiicola*. Los folíolos de plantas de soja se rociaron con agua/limón (control de infección), con Bion 500 (control de inducción) o con el EAF 3 y 7 días antes (-3 y -7) de la inoculación. Los síntomas evaluados corresponden a los 7 dpi. Los datos obtenidos corresponden al promedio de tres experimentos independientes (n=9). Letras diferentes indican diferencias significativas con $p \leq 0,05$. Los diferentes colores indican niveles de severidad (superficie foliar afectada): ■ 1 (0-10%), ■ 2 (11-50%) y ■ 3 (>50%). 98
- Figura 27:** Incidencia y severidad de la mancha anillada en tratamiento sistémico de EAF en plantas de soja. El tratamiento con EAF fue aplicado en las hojas V1 y V2 3 y 7 días previos a la inoculación con *C. cassiicola* y la evaluación de los síntomas de la enfermedad se realizó en las hojas V3 y V4. El tratamiento EAF local corresponde a las plantas rociadas completamente con EAF 3 días previos a la inoculación. Los valores graficados corresponden a los síntomas evaluados a los 7 dpi. Los datos obtenidos corresponden al promedio de tres experimentos independientes (n=9). Los diferentes colores indican niveles de severidad (superficie foliar afectada): ■ 1 (0-10%), ■ 2 (11-50%) y ■ 3 (>50%). 99
- Figura 28:** Acumulación de anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en hojas de plantas de soja tratadas con EAF a las 2, 4 y 6 hpt. Se trabajó con tres folíolos de una hoja V3 y se utilizaron tres plantas por cada tratamiento (n=9). Los folíolos fueron teñidos con NBT, y la formación de una coloración azul indica acumulación de $O_2^{\cdot-}$. El ensayo fue realizado por duplicado de manera independiente con idénticos resultados. Se muestran fotografías representativas de un ensayo. Control: plantas rociadas con agua/limón. 100
- Figura 29:** Contenido de compuestos fenólicos totales en hojas de soja tratadas con EAF. Las hojas de plantas tratadas con EAF se recolectaron a los 0, 3, 5 y 7 días posteriores para determinar el contenido de fenólicos mediante el método Folin-Ciocalteu. Los datos se expresan como los valores medios de mg GAE/g PF \pm desvío estándar. Control: plantas rociadas con agua/limón. Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo al test LSD ($p < 0,05$). 101
- Figura 30:** Acumulación de calosa en hojas de soja tratadas con EAF. Los depósitos de calosa se detectaron por tinción con azul de anilina bajo luz UV a los 5 dpi. Tratamientos: A y C, plantas rociadas con agua/limón (control); B y D, con EAF. Las plantas en C y D fueron además inoculadas con *C. cassiicola* luego de 3 días del tratamiento. La flecha indica el síntoma inicial de la enfermedad. 102

Figura 31: Expresión cuantitativa de genes de defensa en plantas de soja tratadas con EAF. Expresión relativa de cada gen evaluado en las plantas tratadas con EAF con respecto a plantas controles rociadas con agua/limón, la cual fue normalizada con respecto al gen de referencia de β -tubulina. Las barras representan valores promedios a partir de dos ensayos independientes con tres replicas biológicas para cada tratamiento (n=3). Los asteriscos indican diferencias significativas entre el control y las plantas tratadas con EAF, calculado mediante el programa LinReg ($p < 0,05$). Hay sobreexpresión génica por arriba de 0 y subexpresión por debajo de 0. 103

Figura 32: Síntomas de cancrrosis en hojas de limonero. Las hojas fueron infiltradas con una suspensión de bacterias de la superficie de frutos sintomáticos, luego de que estos fueron sometidos a los siguientes tratamientos: A) agua destilada B) cloro 200 ppm C) jugo de limón al 5% en agua y D) EAF 0,05 g PF/mL. En el panel derecho se muestra una ampliación de la zona de la hoja seleccionada en cada caso. 105

Figura 33: Cuantificación de la carga bacteriana en la hojas de limonero. Recuento de *Xcc* por superficie de las hojas de limonero (UFC/cm²), infiltradas con la suspensión de las bacterias recuperadas de la superficie de frutos tratados con EAF. Tratamientos: agua, agua/limón, cloro 200 ppm, y EAF 0,05 g PF/mL. Los resultados son el promedio \pm desvío estandar de tres experimentos independientes (n=5), a los 7 dpi. Letras diferentes indican diferencias significativas con $p \leq 0,05$ 105

Figura 34: Inhibición de *P. digitatum* en medio solido con diferentes concentraciones de EAF. 106

Figura 35: Desarrollo de colonias de *P. digitatum* a partir de las esporas tratadas con diferentes concentraciones de EAF (0,2, 0,1 y 0,05 g PF/mL) y los controles agua (A) medio papa-glucosado (P), jugo de limón al 5 % en agua (L), durante diferentes tiempos de contacto 2, 3, 4 y 5 días. El ensayo se realizó por triplicado y se muestra una imagen representativa de cada tratamiento. La fotografía fue tomada a los 5 días de incubación. 107

Figura 36: Efecto del tratamiento curativo con EAF en la severidad e incidencia de *moho verde* en frutos de limón. Los frutos fueron inoculados con una suspensión de esporas de *P. digitatum* y a las 24 hs fueron tratados con: agua (Control), Imazalil 500 ppm (IMZ) y EAF 0,1 y 0,2 g PF/mL. Las barras representan valores promedios a partir de tres ensayos independientes con 2 repeticiones de 10 limones cada una (n=10). Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$. 108

Figura 37: Efecto del tratamiento preventivo con EAF en la severidad e incidencia de *moho verde* en frutos de limón. Los frutos fueron rociados con EAF (0,1 o 0,2 g PF/mL), agua (Control) o Imazalil (IMZ, 500 ppm), 6 hs previas a la inoculación con una suspensión de esporas de *P. digitatum*. Las barras representan valores promedios a partir de tres ensayos independientes con 2 repeticiones (n=10). Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$. 108

Figura 38: Ensayo curativo con EAF. Apariencia de los frutos inoculados con *P. digitatum* y a las 24 hs posteriores tratados con agua (A), Imazalil 500 ppm (B), EAF 0,2 g PF/mL (C) y EAF 0,1 g PF/mL (D). 109

Figura 39: Severidad e incidencia de la estría roja en plantas de caña de azúcar tratadas con EAF. Las plantas fueron rociadas con EAF o agua (control de infección), 5 días previos a la inoculación con una suspensión bacteriana. Variedades de caña de azúcar: TUC 77-42 (■) y LCP 85-384 (■). 110

TABLAS

Tabla 1: Actividad antimicrobiana de extractos de hojas de la variedad Camarosa de *Fragaria x ananassa* contra *C. michiganensis*. CIM, concentración inhibitoria mínima en gramos de peso fresco por mL (g PF/mL). 27

Tabla 2: Contenido de los compuestos HeT y HgT en mg/g PF en los diferentes extractos, determinado mediante el análisis por HPLC.	33
Tabla 3: Volumen de los “stock” de sales para preparar 1L de solución de Hoagland 1X	48
Tabla 4: Cebadores utilizados para el análisis mediante PCR en tiempo real en plantas de <i>A. thaliana</i>	55
Tabla 5: Resultados obtenidos de la evaluación de cinco protocolos para la producción de plantas de <i>A. thaliana</i>	56
Tabla 6: Diámetro de los halos de inhibición de EAF sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>P. viridiflava</i> .	60
Tabla 7: Cebadores utilizados para el análisis mediante PCR en tiempo real en plantas de soja	88
Tabla 8: Escala de severidad de estría roja en caña de azúcar de acuerdo a porcentaje de area foliar afectada (% de AFA)	90
Tabla 8: Inhibición de <i>Xcc</i> en medio líquido con distintas concentraciones de EAF y Cloro.	104
Tabla 9: Cálculo teórico de la producción de EAF para aplicar en diferentes cultivos.	112

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

I.1 Los problemas sanitarios de la agricultura

Las enfermedades de las plantas se conocen desde tiempos anteriores a los primeros escritos. La evidencia fósil indica que las plantas se vieron afectadas por enfermedades desde hace 250 millones de años. La Biblia y otros escritos mencionan enfermedades, tales como la roya, moho, y el tizón, los cuales han causado hambre y cambios drásticos en la economía de las naciones desde los albores de la historia registrada. Algunos ejemplos más recientes de brotes de enfermedades de cultivos que produjeron graves efectos de largo alcance incluyen el tizón tardío de la papa en Irlanda (1845-1860), el moho de la uva en Francia (1851 y 1878), la roya del café en Ceilán (a partir de la década de 1870), la enfermedad de Sigatoka y el “mal de Panamá” del banano en América Central (1900-1965), la roya negra del trigo (1916, 1935, 1953-1954), y el tizón de la hoja de maíz (1970) en los Estados Unidos (Perez, 2008; McCook, 2009; Fernández-Northcote, 2016).

Los daños que las enfermedades causan en los cultivos son mayores en los países menos desarrollados, ya que el acceso a los métodos fitosanitarios de control es limitado, y en algunos casos las pérdidas pueden ocasionar efectos catastróficos cuando el cultivo es un alimento fundamental para una comunidad, como fue el caso extremo del tizón tardío de la papa (*Phytophthora infestans*) que provocó la “hambruna de Irlanda”, causando la muerte y la migración masiva de la población irlandesa (Alarcón-Rodríguez y col., 2013), por lo que se considera que este hongo tuvo una enorme influencia en el desarrollo económico, político, y cultural en Europa y Estados Unidos.

Los seres humanos vienen seleccionando y cultivando las plantas que le brindan alimentos, vestimenta, vivienda, salud desde hace miles de años, mediante un minucioso proceso de domesticación en el que muchas veces no se eligen los genotipos más resistentes a enfermedades, por lo que estos no pueden sobrevivir en la naturaleza sin la intervención humana, (http://www.croppro.com.au/crop_disease_manual/ch01s01.php).

Para que una enfermedad infecciosa se desarrolle, es necesario que se produzcan las siguientes tres condiciones básicas:

- (1) el ambiente apropiado: los factores ambientales más importantes son la cantidad y la frecuencia de las lluvias o fuerte rocío, la humedad relativa y la temperatura del aire y del suelo,
- (2) la presencia de un patógeno virulento, y
- (3) una planta (hospedante) susceptible.

Esto conforma el triángulo de la enfermedad (Figura 1), uno de los paradigmas en Fitopatología. La enfermedad puede ser prevenida eliminando cualquiera de estos tres componentes causales (Francl, 2001), por lo tanto, las medidas eficaces de control de enfermedades están dirigidas a romper este triángulo ambiente-patógeno-planta, y estas se pueden dividir en una serie de prácticas culturales, biológicas y químicas (Escobar y Dandekar, 2003).

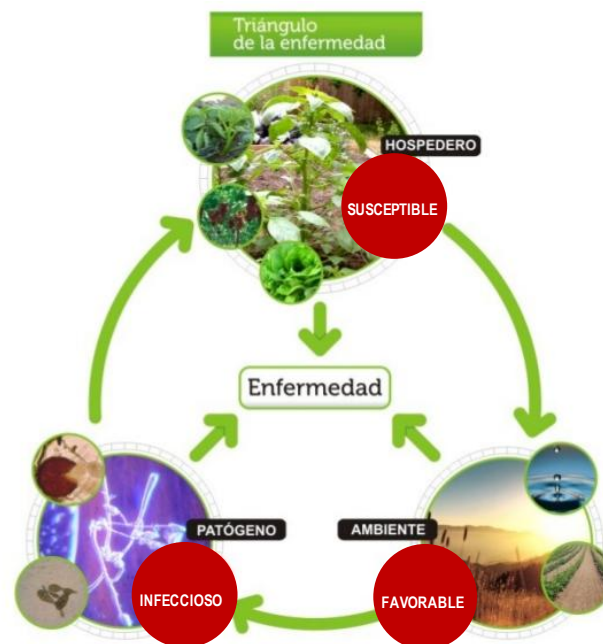


Figura 1: Triángulo de la enfermedad. Los tres factores que deben existir son la presencia de un agente patógeno, el entorno adecuado para el desarrollo de la enfermedad y una planta hospedera susceptible.

El control de la enfermedad requiere un conocimiento profundo del agente causal y el ciclo de la enfermedad, y de las interacciones planta-patógeno en relación con los factores ambientales.

Este se inicia con la elección del mejor genotipo vegetal, y continúa durante toda la vida de la planta y aún con posterioridad al ciclo del cultivo, incluso hasta el transporte, almacenamiento y comercialización. Relativamente pocas enfermedades son controladas por un solo método y en general se requieren de varias estrategias.

En el contexto de los valores sociales y ambientales actuales, el “control” de enfermedades es considerado un término absoluto y muy rígido. Sin embargo, esto generó un cambio de actitud y como resultado se han dado enfoques más multifacéticos para el manejo de enfermedades y manejo integrado de enfermedades. Medidas, a

menudo severas y únicas, como son la aplicación de pesticidas, fumigación de suelos o quemas, ya no se encuentran en uso. Es más, los procedimientos del manejo de enfermedades están frecuentemente determinados por la predicción o modelos de enfermedades, más que basados en un calendario de actividades o de una simple recomendación. El manejo de enfermedades puede visualizarse como proactivo mientras que el control de enfermedades es reactivo, aunque resulta a menudo difícil distinguir entre estos dos conceptos, especialmente en la aplicación de medidas específicas (Achicanoy López, 2001).

Las prácticas de manejo de enfermedades en plantas se basan en anticipar la incidencia de la enfermedad y en atacar puntos vulnerables en el ciclo de la enfermedad. Por ello se requiere de un diagnóstico adecuado de la enfermedad para identificar el patógeno. Para un manejo efectivo de cualquier enfermedad es esencial un entendimiento exhaustivo del ciclo de la enfermedad, incluyendo los factores climáticos y ambientales que influyen en dicho ciclo y de las necesidades de manejo cultural que la planta requiere.

Las muchas estrategias, tácticas y técnicas utilizadas en el manejo de enfermedades pueden ser agrupadas bajo uno o más principios de acción muy amplios. El sistema más simple consiste de dos principios, prevención y terapia. El primer principio (prevención) incluye tácticas de manejo de enfermedades que son aplicadas antes de la infección, el segundo principio (terapia o acción curativa) funciona con cualquiera medida aplicada después de que la planta ha sido infectada. Un ejemplo del primer principio es la aplicación de cuarentenas para prevenir la introducción de un agente causal de una enfermedad (patógeno) dentro de una región en donde no ha incidido previamente. El segundo principio se puede ilustrar con los tratamientos térmicos o químicos de material vegetativo tales como bulbos, cormos y estacas, para eliminar hongos, bacterias, nematodos y virus que se hayan establecido dentro del material vegetal. La quimioterapia es la aplicación de químicos a una planta infectada o enferma para detener el problema (ejemplo, erradicar la infección) (www.apsnet.org/edcenter/advanced/topics/Epidemiologia/Pages/Estrategias.aspx).

La mayoría de las medidas de control de enfermedades en plantas se dirigen a disminuir el inóculo del patógeno e incluyen los principios de:

a. Evasión, consiste en evitar las enfermedades mediante el establecimiento del cultivo en lugares o en fechas en que no exista el inóculo o bien cuando éste no es infectivo o es escaso.

b. Exclusión, consiste en evitar la introducción del inóculo o el establecimiento de un patógeno en un área libre. Los principios de evasión y exclusión se aplican mediante métodos culturales y regulatorios.

c. Erradicación, es la eliminación del patógeno de una parte de la planta, de grupos de plantas, de un campo, de una región o de un país.

d. Protección, es el establecimiento de una barrera o impedimento de índole diversa entre el hospedante y el patógeno que interfiera en la actividad de éste último.

Otra estrategia de control es la terapia que incluye medidas aplicadas una vez que el patógeno ha infectado la planta. La práctica más común es el control químico, el cual consiste en la represión del patógeno o la prevención de su desarrollo mediante el uso de sustancias químicas, (<http://www.britannica.com/science/plant-disease>).

Los compuestos químicos que se utilizan en la protección de los cultivos reciben el nombre genérico de pesticidas o plaguicidas. El éxito del control químico está supeditado al buen criterio que se tenga para decidir qué producto usar, en qué forma aplicarlo y en qué momento u oportunidad ejecutar el tratamiento. Estas decisiones exigen conocimientos sobre las características de los productos, los equipos de aplicación, las plagas y la planta cultivada. También hay que tomar en cuenta las prácticas culturales, las condiciones climáticas, las condiciones económicas del cultivo y del agricultor, y las características culturales y sociales del medio.

I.2 El uso de los agroquímicos de síntesis

La era de los agroquímicos modernos en la agricultura se inició inmediatamente después de terminada la Segunda Guerra Mundial. El descubrimiento de la acción insecticida del Dicloro-difenil-tricloroetano DDT (1939) y del Hexacloruro de benceno o BHC (1941), permitió combatir insectos vectores de enfermedades que afectaban a las tropas aliadas. Rápidamente su uso se extendió al combate de plagas agrícolas y del ganado. Y años más tarde su uso se había generalizado en casi todos los países del mundo (Sbarbati Nudelman, 2011). En la actualidad, existe una gran cantidad de compuestos insecticidas y otros pesticidas con características toxicológicas, físicas y químicas muy diversas.

Los agroquímicos constituyen recursos fundamentales contra las plagas y enfermedades, porque sus efectos son más rápidos que cualquier otra forma de control, y por ser fácilmente manejables. Se considera que su utilización ha jugado un rol importante en el incremento de la productividad agrícola de las últimas décadas, sobre

todo en los países más tecnificados. Con las primeras aplicaciones de agroquímicos modernos se especuló con erradicar las principales plagas. Desafortunadamente después de algo más de cuatro décadas de uso se puede comprobar que los problemas de plagas no han desaparecido y, en muchos casos se han agravado. La utilización de los pesticidas produjo fenómenos nuevos, no previstos, como el desarrollo de resistencia a los insecticidas y la aparición de nuevas plagas por la destrucción de sus enemigos naturales así también como la contaminación del medio ambiente poniendo en riesgo la salud del hombre y de los recursos genéticos de nuestro planeta (Rifkin, 2011, <http://www.thethirdindustrialrevolution.com/>), e incremento de los costos de producción.

Los efectos detrimentales sobre la salud humana relacionadas a la producción industrial de agroquímicos y a la forma de uso en las aplicaciones a campo, son los que revisten la mayor importancia. Una vez liberados en el entorno, los plaguicidas pueden contaminar los ríos, la capa freática, el aire, el suelo y los alimentos. La exposición de los seres humanos ocurre al respirar, beber, comer e incluso mediante la absorción cutánea. Las consecuencias de la exposición a plaguicidas para la salud humana dependen de numerosos factores, incluido el tipo de plaguicida y su toxicidad, la dosis de exposición, la duración, el momento y las circunstancias de exposición. En el caso de ciertos plaguicidas, la exposición crónica a bajas dosis puede causar alteraciones en el desarrollo del sistema nervioso, carencias en el sistema inmunológico e incluso cáncer (Hernández González y col., 2007).

Los agroquímicos llegan a los consumidores a través de los alimentos con elevados niveles de residuos o por medio de aguas contaminadas, consecuencia de un mal manejo durante la aplicación y posterior manipulación de recipientes, herramientas, materiales de descarte, etc. El problema se acentúa cuando se produce el manejo inadecuado de los agroquímicos y sus envases, los cuales constituyen un serio y creciente problema para el ambiente.

El uso excesivo y continuado de agroquímicos también ha afectado el equilibrio en los agroecosistemas. La falta de especificidad de dichos productos afecta a organismos benéficos, predadores naturales, y polinizadores, por un efecto directo o indirecto por alteración de su hábitat. Esto ocasiona su desaparición, alteración del ciclo y el resurgimiento de especies que, como el mosquito *Aedes aegypti*, son responsables de epidemias como las de dengue y fiebre amarilla, (<http://www.colmed7.org.ar/files/Trabajos/AGROQUIMICOS.pdf>). La aplicación continua de plaguicidas ejerce

además una presión sobre las plagas favoreciendo la aparición de organismos resistentes, y obligando así al uso de dosis mayores. Otro problema que generan, es el daño a otros cultivos en donde las pérdidas por efecto “deriva” pueden ser importantes. En este sentido las compañías incentivan a los productores a implementar un sistema de Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) apuntando a prevenir “malas” aplicaciones que inciden negativamente en cultivos vecinos y en la población rural. En realidad, en términos de sustentabilidad, una BPA debería ser el “no uso de esos productos”.

En Argentina, el mercado de fitosanitarios ha mostrado una evolución creciente y sostenida a lo largo del tiempo. En el año 1991 se utilizaban cerca de 100 millones de litros de productos fitosanitarios (herbicidas, insecticidas, fungicidas), mientras que en el año 2012 por ejemplo, se aplicaron cerca de 317 millones de litros. La producción de soja acaparó casi el 62% del total de los productos aplicados (Figura 2). Pero el aumento en la utilización de agroquímicos no está acompañado de aumentos proporcionales de las superficies cultivadas ni de la producción, (<http://observatoriosoja.org/nota-breve/uso-de-agroquimicos-en-soja>).

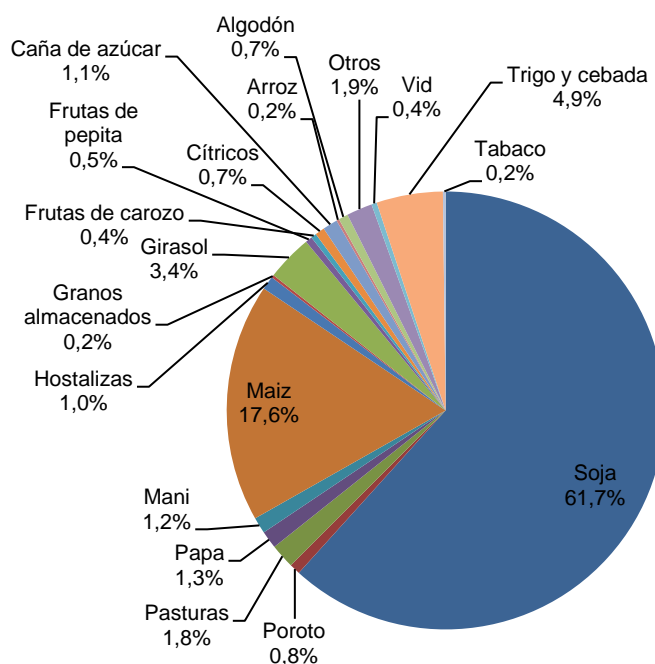


Figura 2: Porcentaje de uso agroquímicos por tipo de cultivo en Argentina. (Fuente: <http://observatoriosoja.org/nota-breve/uso-de-agroquimicos-en-soja/-2012>).

La problemática relacionada con el uso de los plaguicidas es compleja y dinámica e incluye varios actores con distintos intereses y posturas. En el año 2009, dada la creciente preocupación por la extensión en la aplicación de glifosato, y en particular por las denuncias sobre intoxicaciones en Ituzaingó, (Córdoba), se creó la Comisión Nacional de Investigaciones sobre Agroquímicos (CNIA). Uno de los puntos más débiles de la legislación son los mecanismos de control, ya que en muchos casos los problemas se producen por el uso de sustancias autorizadas, pero de maneras no previstas por las regulaciones.

Es necesario generar iniciativas tendientes a cambiar el modelo vigente, poniendo en práctica medidas que faciliten la transición hacia sistemas productivos sustentables. Las empresas deberán generar no sólo productos de menor impacto sino ponerlo al alcance de los agricultores, con el compromiso de asegurar un correcto uso y manejo de los mismos a través de capacitación y monitoreo. Es necesario contar con una regulación lo suficientemente rígida para proteger la salud de las personas y el medio ambiente, sin afectar la producción agrícola y el nivel de actividad económica.

I.3 Alternativas sustentables para el manejo de plagas y enfermedades

Ante los múltiples factores negativos de la agricultura convencional, emerge la concepción de la agricultura sustentable que promueve la producción agrícola apoyada en la conservación de los recursos naturales elementales tales como el suelo, agua y biodiversidad (Badgley y col., 2007; Barg Venturini y col., 2007).

Los mercados importadores de frutas y productos frescos o industrializados en general, han incrementado sus exigencias respecto a los niveles de residuos de agroquímicos, lo que demanda controles y estrategias de producción adecuadas.

Una alternativa de control que cada vez toma mayor participación en el esquema de manejo de los cultivos complementando al manejo convencional, es el uso de bioproductos (biofertilizantes, bioestimuladores y bioplaguicidas), ya que representan opciones económicamente atractivas y ecológicamente aceptables.

Un bioproducto es un producto basado en compuestos y/o extractos de microorganismos o plantas, o de microorganismos vivos, que producen un efecto benéfico sobre la sanidad o el crecimiento (o rendimiento) de los cultivos (<http://agriculturers.com/bioinsumos-de-uso-agricola-potencialidades-y-desafios/>; Beck y col., 2013; Gerwick y Sparks, 2014), sin generar impacto negativo en el agroecosistema. En el desarrollo de un bioproducto se utilizan estrategias que surgen del

estudio y caracterización de lo que sucede en las distintas interacciones de las plantas con su entorno. La idea es buscar en la propia naturaleza, donde existe una gran cantidad de productos que pueden utilizarse para el manejo sustentable de plagas y enfermedades de las plantas. Esta afirmación se basa en la premisa de que todos los organismos vivos están dotados de un sistema de defensa, los cuales en general tienen las características de ser de amplio espectro, lo que permite el poder extrapolarlos a otros organismos diferentes del que pertenecen. En este sentido, por ejemplo los microorganismos y las plantas constituyen una riquísima fuente de compuestos con propiedades antimicrobianas y con capacidad para inducir los mecanismos de defensa vegetal. En el caso específico de las plantas, cuentan con una diversidad de estrategias para defenderse de sus enemigos, y también de situaciones ambientales adversas, constituidas por mecanismos de defensa, tanto constitutivos como inducidos por la presencia del patógeno. El sistema de defensa vegetal es muy efectivo para detener o contrarrestar una infección, lo que hace que la muerte de plantas por enfermedad termine siendo una situación excepcional.

I.3.1 Bioproductos de origen microbiano

La interacción de las plantas con organismos microbianos al igual que con herbívoros y otras especies de plantas puede ser de carácter positivo, negativo o neutral. Aunque cada caso depende de una serie de vinculaciones complejas, sobre la mayoría de las cuales conocemos muy poco, los mecanismos químicos involucrados en estos tres tipos de interacciones pueden ser de naturaleza similar. La selección de un microorganismo y /o compuesto microbiano para ser utilizado en protección vegetal, deriva de la caracterización y conocimiento de esas interacciones, así por ejemplo la especificidad de las interacciones planta-patógeno sirve para seleccionar la interacción que proporcione una ventaja para una de las partes (patogénesis o resistencia), o para ambos organismos (simbiosis).

Las estrategias utilizadas en la formulación de un bioproducto para el control de patógenos son variadas, pero básicamente se pueden dividir en aquellas que actúan directamente inhibiendo al patógeno o en aquellas que inducen las defensas propias de las plantas. En el primer caso, se aprovechan compuestos microbianos que poseen actividad inhibitoria contra otros microorganismos, como por ejemplo pyrrocidina A, proveniente de *Acremonium zeae*, tiene actividad antibacteriana y antifúngica en maíz; y

brefeldin A obtenido a partir de *Aspergillus clavatus* strain H-037 con actividad antiviral y antifúngica en tejo (Wang y col., 2002; Wicklow y Poling, 2009)

En el caso de los inductores de la defensa de las plantas, se trata del uso de ciertas sustancias como carbohidratos, proteínas y pequeñas moléculas, que son capaces de desencadenar en las plantas mecanismos de defensa que confieren resistencia al ataque de patógenos. Los inductores de la defensa resultan de interacciones planta-microorganismo y pueden provenir del patógeno o de la misma planta (Maffei y col., 2012). Así, por ejemplo, ante la invasión de tejidos vegetales por un microorganismo, la respuesta defensiva inducible más temprana es la muerte del tejido hospedante, causada por el ataque del patógeno o por una reacción de hipersensibilidad, de la cual se liberan componentes de la pared celular vegetal que inducen la activación de defensa en tejidos adyacentes. De manera similar, la actividad de algunas enzimas hidrolíticas, producidas por la célula vegetal como reacción de defensa, liberan componentes de la pared celular de ciertos hongos que tienen un efecto inductor de defensa en los tejidos vegetales. El primer inductor caracterizado fue una proteína de bajo peso molecular, monilicolina A, aislada del hongo *Monilinia fructicola* por Cruickshank y Perrin en 1968. Desde entonces se han identificado numerosos inductores de naturaleza química diversa como por ejemplo: AsES, un péptido producido por el hongo *Acremonium sp*, que tiene capacidad para inducir los mecanismos de defensa en plantas de frutilla (Chalfoun y col., 2013); la proteína conocida como harpin, producida por *Erwinia amylovora*, induce la respuesta hipersensible en una gran cantidad de cultivos (Wei y col., 1992); el Gluticid, formulado a partir del sobrenadante de una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (mezcla de ácido salicílico, sideróforos, polisacáridos, etc.), tiene efecto biofungicida e inductor del crecimiento vegetal (Díaz de Villegas y col., 2002); el ácido araquidónico, aislado a partir de los hongos *Phytophthora* y *Mortierella*, fue evaluado en ensayos a campo en plantas de papa, tomate y remolacha, e incrementó la resistencia a enfermedades (Dedyukhi, 2014).

Otra estrategia muy utilizada en la formulación de bioproductos es utilizar directamente los microorganismos vivos, tales como microorganismos benéficos (simbióticos) o fitopatógenos atenuados (protección cruzada), muy utilizada esta última en la protección contra virus. En este grupo se encuentran por ejemplo los bioinoculantes para cultivos de leguminosas, formulados en base a los géneros *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, etc. (Bai y col., 2003; Panwar y col., 2005; Samoon y col., 2010; Bhardwaj y col., 2014; Santos y col., 2014).

I.3.2 Bioproductos de origen vegetal

Las plantas cuentan con una diversidad de estrategias para defenderse de sus enemigos y de situaciones ambientales adversas. Tales estrategias incluyen tanto defensas preformadas como inducidas por la presencia del patógeno. Las plantas presentan barreras estructurales, físicas y una gran diversidad de compuestos preformados con propiedades antimicrobianas, que evitan el ingreso y proliferación de patógenos en los tejidos vegetales. Además de la defensa local, la resistencia puede extenderse hacia regiones que no han sido lesionadas por el patógeno. Esta resistencia se denomina Sistémica Inducida o Adquirida. La respuesta tiene una duración de semanas a meses y es activa contra un amplio espectro de patógenos (Amil-Ruiz y col., 2011; Pieterse y col., 2009; Spoel y Dong, 2012; Rojas y col., 2014; Pandey y col., 2016).

Al igual que en el caso de los bioproductos de origen microbiano, la estrategia en el caso de los formulados en base a compuestos y/o extractos vegetales, sigue los mismos principios. Existen compuestos o extractos que actúan directamente inhibiendo el desarrollo de los patógenos (efectos curativos), o indirectamente induciendo los mecanismos de defensa propios de la planta (efecto preventivo).

La literatura registra innumerables reportes de compuestos y/o extractos vegetales con actividad antifitopatógena o como inductores de la defensa (Kessmann y col., 1994a, b; Cohen, 2001; Ton y col., 2005). Tal es el caso del producto denominado “ulvana”, biopolisacárido obtenido de la pared celular del alga verde *Ulva spp.* (Paulert y col., 2009) que en forma de aplicaciones foliares induce resistencia en manzana contra *C. gloesporioides* (Araújo y col., 2008); Bio-S y Neudo Vital, los cuales son productos comerciales a base de extractos de plantas que activan genes de defensa en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Von Rad y col., 2005); el extracto de bulbos de ajo, cuyo compuesto activo es la alicina, controla efectivamente la podredumbre del tallo causada por *Sclerotinia*, el tizón de la hoja causada por *Alternaria* y el moho blanco de la mostaza (Meena y col., 2013).

La explotación de la inducción de la resistencia en protección vegetal se ha transformado en una de las estrategias más prometedoras ya que en general se utilizan compuesto y/extractos a bajas concentraciones, y proveen una protección de larga duración y de amplio espectro.

I.4 Los bioproductos en el mundo y en Argentina

El mayor grado de concientización de los productores agrícolas sobre el cambio climático y la necesidad de utilizar métodos más amigables con el ambiente han impulsado el uso de bioproductos agrícolas, cuya tendencia creciente se observa de año a año. Mediante la utilización de bioproductos se puede lograr el control natural de plagas y enfermedades, y el productor puede acceder incluso a una certificación orgánica, lo cual ayuda a la inocuidad de los alimentos que consumimos.

Estimaciones optimistas proyectan ventas de biopesticidas cercanas al 10% en 2020, pero aún se necesitan muchos trabajos de investigación, desarrollo y de reglamentación, que son críticos para alcanzar esa cifra. El rápido crecimiento del mercado de pesticidas biológicos se debe al alto costo que implica el desarrollo de nuevos productos químicos, la mayor demanda de la sociedad y de los organismos reguladores para la producción de alimentos sin residuos (<http://www.abcbio.org.br>).

La tendencia de utilizar bioproductos para combatir plagas agropecuarias es cada vez más fuerte y ya se registran numerosos ejemplos internacionales y locales. La industria nacional de productos biológicos para el agro se afianza cada vez más. Es un mercado que crece con gran proyección internacional y a escala regional, la Argentina es referente. Se trata de un mercado que representa anualmente unos 75 millones de dólares y continúa en crecimiento, en el marco de una demanda mundial por productos más inocuos y de calidad, que a futuro puedan reemplazar a los de síntesis química. Existen numerosas empresas privadas como también instituciones nacionales que están realizando una fuerte actividad de investigación y de producción de bioinsumos. En Argentina existe alrededor de 100 empresas dedicadas a la producción de insumos biotecnológicos, así también como instituciones públicas que hacen importantes aportes tanto en la investigación como en el desarrollo de nuevas formulaciones. Así por ejemplo la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC) en colaboración con la empresa ANUIT, está a punto de lanzar al mercado un bioinsumo desarrollado en base a investigaciones básicas financiadas por la Universidad Nacional de Tucumán, el CONICET y la EEAOC. Este producto elaborado en base a un péptido fúngico, tiene la capacidad de inducir los mecanismos de defensa de la propia planta, así también como promover el crecimiento vegetal y el rendimiento de cultivos de importancia regional.

I.5 ¿Por qué es importante el uso de bioproductos en la agricultura?

La adopción y uso eficaz de bioproductos es considerada una tecnología clave para asegurar la sustentabilidad y productividad en la agricultura, sector de gran importancia para las economías y las sociedades de los países Iberoamericanos y del mundo. La posibilidad de aumentar los rendimientos agrícolas, mejorar la calidad de los productos y al mismo tiempo preservar el medio ambiente está irremediablemente ligada al uso generalizado de estos productos, como alternativa al uso masivo de plaguicidas y fertilizantes de origen químico. Sin embargo, la aplicación de bioproductos debe ser una práctica basada en el conocimiento, sujeto a las normas y con un alto grado de responsabilidad de los usuarios para su adecuado uso y manejo.

El desarrollo científico-técnico de los últimos años ha permitido generar diversos bioproductos con alto potencial de uso agrícola, lo cual abre muchas posibilidades para la aplicación de esta tecnología a prácticamente todos los cultivos de importancia regional, desde los cereales a las producciones hortícolas y forestales, lo que nos obliga a aumentar el nivel de conocimiento sobre los efectos de estos nuevos productos, con la creciente necesidad de generar normas y sistemas de control de calidad adecuados y exigentes.

I.6 Antecedentes del grupo de trabajo

En investigaciones previas realizadas por el grupo científico en el que se desarrolló este trabajo de tesis doctoral, se han aislado y caracterizado dos compuestos fenólicos a partir de variedades comerciales de frutilla (*Fragaria x ananassa* Duch.), con propiedades antimicrobianas e inductoras de la defensa vegetal contra patógenos. Ambos compuestos fueron aislados a partir de hojas de plantas sanas de frutilla, lo que implica que podrían formar parte de la barrera de defensa química pre-formada o pre-existente, pudiendo ser considerados como fitoanticipinas. La naturaleza química de estos compuestos fue identificada y pertenecen al grupo de los taninos hidrolizables, uno de ellos al subgrupo de los galotaninos con un PM de 316 Da denominado HgT (Filippone y col., 1999, 2001) y el otro, al subgrupo de los elagitaninos con un PM de 936 Da denominado HeT (Mamani y col., 2012). HgT fue caracterizado como 1-O-galoil- β -D-glucopiranososa y HeT como 1-O-galoil-2,3;4,6-bis-hexahidroxi-difeniloil- β -D-glucopiranososa. La estructura química y las propiedades antimicrobianas de estos compuestos ya habían sido estudiadas por varios autores (Ho y col., 2001; Mailoa y col.,

2014), sin embargo la capacidad para inducir una respuesta de defensa en plantas de frutilla y otras especies vegetales, fue informada por primera vez por nuestro grupo de trabajo. Esta investigación dio origen a una patente de transferencia de la propiedad intelectual con fines tecnológicos.

Los compuestos HeT y HgT se presentan en plantas sanas en un nivel basal, pero también se demostró que se acumulan en hojas de *Fragaria x ananassa* durante la interacción incompatible con un aislado avirulento de *Colletotrichum fragariae*, agente causal de la antracnosis, y se demostró que la actividad de ambos es ubicua ya que también inducen la defensa en otros patosistemas como por ejemplo en plantas de limero contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, agente causal de la cancrrosis en cítricos (Mamani y col., 2012).

CAPITULO II
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II.1 HIPÓTESIS GENERAL DE TRABAJO

Un extracto que esté enriquecido en los compuestos de frutilla HgT y HeT, puede potenciar la actividad biológica de ambos y ser utilizado para diseñar un bioproducto para el manejo sustentable de enfermedades en la agricultura.

II.2 OBJETIVO GENERAL

Diseñar un protocolo para aumentar la eficiencia y factibilidad de obtención de un extracto acuoso de hojas de frutilla (EAF) que contenga los compuestos HgT y HeT, con vista a desarrollar una formulación comercial para el control de enfermedades de cultivos de importancia regional.

II.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Optimizar un método de obtención del EAF que permita la extracción de los compuestos HgT y HeT, que sea simple, de bajo costo y de baja toxicidad.
- Evaluar la efectividad del EAF en la inducción de la respuesta de defensa en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*.
- Evaluar la efectividad del EAF como inductor de la defensa contra patógenos en cultivos de importancia regional, soja y caña de azúcar, y estudiar los parámetros bioquímicos y moleculares asociados.
- Evaluar la efectividad del EAF como antimicrobiano contra patógenos cuarentenarios y de poscosecha en frutos cítricos.

CAPITULO III

OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE UN EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE FRUTILLA ENRIQUECIDO EN LOS COMPUESTOS HgT Y HeT

III.1 INTRODUCCIÓN

III.1.1 Metabolitos secundarios de las plantas

Los organismos sésiles, como las plantas, están obligados a discriminar entre los diferentes desafíos que les plantea su entorno y responder a ellos. Estas respuestas a su ambiente biótico y abiótico, les permiten la mejor distribución de sus recursos para crecer, reproducirse y defenderse. En consecuencia, es lógico pensar que gran parte de las reacciones de defensa se reflejen en una diversidad bioquímica, la cual tiene muy pocos paralelos con otros grupos de organismos. De hecho, el enorme repertorio bioquímico de las plantas y el largo tiempo de evolución de este metabolismo han resultado en interacciones de complejidad creciente (Dixon, 2001).

El metabolismo de las células vegetales por lo general se diferencia en primario y secundario. El término Metabolito Secundario (MS) fue introducido por primera vez por Kossel (1891) hace más de un siglo, para denominar a todos aquellos compuestos que, a diferencia de los metabolitos primarios, no son esenciales para la vida del vegetal. Por muchos años se pensó que estos compuestos constituían productos de desecho del metabolismo primario, sin una función aparente. Este concepto ha sido desterrado y hoy se sabe que muchos MS son clave en numerosos mecanismos de la planta (Bennett y Wallsgrove, 1994; Patra y col., 2013). A diferencia de los metabolitos primarios, los MS no poseen una distribución universal en las plantas, por lo que pueden ser utilizados en estudios taxonómicos (quimiosistemática) ya que a menudo imparten una firma química específica de especie sobre un organismo. Más allá que el metabolismo secundario no siempre sea necesario para que una planta complete su ciclo de vida, desempeña un papel importante en la interacción de las plantas con el medio ambiente confiriéndole una multitud de ventajas evolutivas (Noel y col., 2005; Hukkanen y col., 2007; Cheynier y col., 2013).

Diversos cambios moleculares asociados al metabolismo especializado están a menudo preservados genética, funcional y estructuralmente como resultado de la alta adaptabilidad que tienen las plantas a ecosistemas diversos y muchas veces muy adversos. Muchos de estos compuestos actúan como señales químicas o como protectores para las plantas durante sus interacciones, constituyendo parte de un complejo sistema de defensa contra los diferentes factores adversos del entorno. Los MS poseen diversas propiedades tales como antimicrobianos, inductores de las defensas naturales, tóxicos, repelentes, o compuestos que hacen que los tejidos vegetales sean no

digeribles por los animales, etc., (Pichersky y Gang, 2000; Bhattacharya y col., 2010; Shalaby y Horwitz, 2015).

III.1.2 La frutilla: sus potencialidades como fuente de metabolitos activos

La frutilla (*Fragaria x ananassa* Duch.) es uno de los cultivos más importantes en la mayoría de las regiones templadas del mundo (Rubinstein, 2015). En nuestro país tiene una gran importancia socio-económica porque representa una alternativa de diversificación para pequeños y medianos productores. Tucumán posee ventajas comparativas con respecto al resto del país, tanto para la producción de fruta como para la de plantines (vivero), ya que debido a su ubicación geográfica, produce fruta primicia y posee un período de cosecha más extenso que el resto de las provincias productoras. Con respecto a vivero, nuestra provincia posee una zona de altura (2000 msnm) ideal para esta actividad declarada libre de virus, que por sus características de temperatura y heliofanía, produce plantines de excelente calidad sanitaria y fisiológica.

La frutilla, al igual que otras frutas finas, tiene una gran diversidad de compuestos con propiedades biológicas que pueden resultar útiles para diferentes aplicaciones. El fruto es excepcionalmente rico en compuestos fenólicos tales como flavonoles (derivados del kaempferol y la quercetina), antocianidinas (derivados de la cianidina y pelargonidina), proantocianidinas, taninos hidrolizables (galoilglucosos y elagitaninos), y ácidos fenólicos, siendo el ácido elágico el más abundante, llegando a representar hasta el 50% del contenido de fenoles en algunas variedades de frutilla (Häkkinen y col., 1999; Williner y col., 2003; Määttä-Riihinen y col., 2004; Terry y col., 2004; Halbwirth y col., 2006; Hanhineva y col., 2009).

El contenido y la diversidad de compuestos químicos en la frutilla se ve afectado por diferentes factores tales como el aporte de nutrientes (Hernanz y col., 2007), las prácticas agronómicas (Wang y col., 2002), el genotipo de frutilla, o las condiciones ambientales del cultivo (Tulipani y col., 2011; Josuttis y col., 2012, 2013). Las condiciones ambientales como temperatura del aire, intensidad y horas diarias de luz, humedad y nutrientes del suelo, en conjunto, afectan en forma impredecible al contenido y composición química de la planta de frutilla (Josuttis y col., 2013). Sin embargo estos estudios son válidos específicamente para los genotipos estudiados en cada caso, y las condiciones ambientales de cada región en particular.

Con respecto a los compuestos que tendrían una participación en la defensa contra patógenos, existen numerosas evidencias de compuestos caracterizados en ese

sentido y muchas veces existe una asociación al tipo de tejido, edad y genotipo de la planta y condiciones externas. Así, por ejemplo, Hébert y col., (2002), determinaron que las proantocianidinas como flavan-3-oles (dímeros y oligómeros), disminuyen la incidencia de *Botrytis cinerea* en poscosecha y actúan como antioxidantes aumentando la preservación de los frutos. Hirai y col., (2000), comunicaron la inducción de tres fitoalexinas triterpénicas en frutos verdes infectados con *Colletotrichum musae*. Estos compuestos fueron identificados como ácido euscáfico, torméntico y muriático, los que mostraron una fuerte actividad antifúngica. Yamamoto y col., (2000) demostraron que la (+)-catequina, un componente normal de las hojas de frutilla, se acumula en respuesta a la inoculación con esporas de *Alternaria alternata* inhibiendo la formación de hifas infecciosas. También se han caracterizado compuestos volátiles de frutilla con actividad antifúngica contra *Colletotrichum acutatum*, agente causal de la antracnosis, siendo el 2-hexenal el más efectivo (Arroyo y col., 2007). No obstante, la mayoría de los estudios en frutilla han sido realizados principalmente en el fruto, y relativamente poco se conoce sobre la fitoquímica en otros órganos tales como raíces y flores (Hanhineva y col., 2008) u hojas (Filippone y col., 1999; Himanen y col., 2005; Arroyo y col., 2007; Hukkanen y col., 2007; Nagpala y col., 2016), los cuales tienen mayor relevancia en la salud de la planta completa.

Como se menciona anteriormente, en nuestro grupo de trabajo se han aislado y caracterizado dos compuestos fenólicos a partir de las hojas de variedades comerciales de frutilla (*Fragaria x ananassa* Duch.) con propiedades antimicrobianas e inductoras de la defensa vegetal, HgT y HeT, obtenidos con agua/TFA o metanol, respectivamente. Se comprobó que la actividad biológica de los compuestos puros se mantenía en los extractos. Así por ejemplo, un extracto de hojas de Camarosa enriquecido en HgT presentó actividad antimicrobiana *in vitro* contra *Aspergillus niger*, *Penicillium digitatum*, *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum acutatum*, y disminuyó la incidencia de *Penicillium* y *Botrytis* en un cultivo de frutilla a campo (Tesis de grado de la Lic. A. Barbieri, 2009). En Mamani y col., (2012) se describe la actividad antimicrobiana e inductora de la defensa contra patógenos en frutilla y limonero, de un extracto metanólico enriquecido en el HeT.

También se estudió la influencia de los factores ambientales, del genotipo de frutilla y del estado fenológico del cultivo, en la calidad biológica de los extractos. Se comprobó que el factor ambiental fue el de mayor influencia, determinándose que la mayor actividad coincide con la época de máxima luminosidad y temperatura. Esto

corresponde hacia el final del cultivo en la zona de Famaillá (noviembre–diciembre, a 339 msnm) y al inicio del cultivo en Tafí del Valle (enero-febrero, a 2000 msnm) (tesis de grado de la Lic. Cerviño, 2014).

Considerando que el primer objetivo de este trabajo fue ajustar un protocolo que permitiera la obtención de un extracto enriquecido en los compuestos HgT y HeT como principio activo para ser aplicado como bioproducto, fue necesario diseñar un nuevo protocolo para ajustar parámetros compatibles con un futuro desarrollo, como por ejemplo la eliminación del uso del metanol y del TFA utilizados en los protocolos originales, ya que se trata de productos químicos tóxicos, contaminantes y/o de elevado costo. Para desarrollar un bioproducto con fines comerciales debíamos considerar una producción de bajo costo y un producto efectivo e inocuo tanto para la salud ambiental como humana.

III.2 MATERIALES Y MÉTODOS

III.2.1 Material vegetal

Los extractos se obtuvieron a partir de hojas jóvenes totalmente expandidas, de plantas de frutilla de la variedad Camarosa de *Fragaria x ananassa* Duch. provenientes de una finca comercial de la localidad Famaillá, provincia de Tucumán ubicada a 339 msnm y cuyas coordenadas geográficas son 27° 1' 3,34'' LS y 65° 22' 46,544'' LO, durante las campañas 2012-2013. La cosecha de las hojas se realizó en el mes de diciembre. Las hojas cosechadas fueron refrigeradas durante su traslado y pesadas para obtener el peso fresco (PF). Parte del material vegetal fue mantenido en freezer a -70°C hasta su utilización, y otra fue inmediatamente secado.

III.2.2 Secado y molienda de hojas

El secado de las hojas cosechadas se realizó a 40-45°C con aire continuo hasta peso constante. Para la molienda de hojas se usaron dos alternativas: a-triturado a mano, alcanzando un tamaño promedio de partícula de 6 mm, y b-triturado en molino a cuchillas, obteniendo un tamaño de partícula de 3 mm. En la Figura 3, se observan los equipos utilizados para realizar el secado y molienda. También se evaluó la calidad del extracto obtenido con hojas secas sin moler.

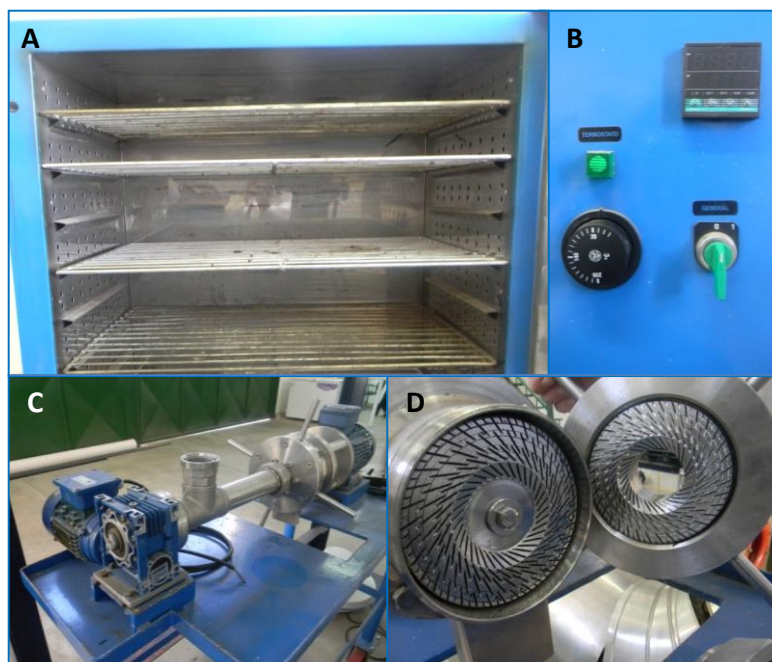


Figura 3: Equipamiento para el secado y molienda de hojas: A) estufa con aireación continua, B) termostato, C) molino a discos y D) interior del molino donde se muestra el detalle de las cuchillas.

III.2.3 Obtención del extracto acuoso

Se partió de un extracto acuoso preparado con hojas frescas homogeneizadas con agua destilada acidificada a pH 3,5-4, en una relación de 1g de PF de hoja por cada 10 mL de volumen de solvente. Como acidificantes se ensayaron diferentes alternativas: a)- ácido trifluoroacético (TFA) 0,1 % (v/v), utilizado como control; b)- jugo de limón al 5% (v/v); c)- concentrado industrial 10X de jugo de limón al 0,5 % (v/v); d)- HCl 5% (v/v), y e)- vinaza 20% (v/v) (pH 4,8- 5). La extracción se realizó durante 24 hs a 25°C con agitación constante y luego se llevó a cabo la filtración utilizando un embudo Büchner con algodón y vacío para acelerar la filtración. También se realizó una extracción con metanol puro que fue utilizada como control.

Con el fin de disminuir la densidad del extracto, éste fue sometido a dos tratamientos diferentes: a)- calentamiento en baño maría por 10 min y b)- agregado de 2 y 5 volúmenes de etanol comercial 96°, dejando reposar a 8°C y 25°C durante 1 y 24 hs. En todos los casos, luego de los tratamientos se realizó una nueva filtración a través de embudo Büchner con algodón y vacío. En el caso del extracto tratado con etanol, también se evaluó la alternativa de realizar sólo un paso de filtración. En este sentido se realizó una extracción con agua acidificada durante 24 hs, luego se adicionó etanol en el mismo homogenato, y finalmente se realizó una única filtración. El alcohol se eliminó de los extractos con evaporador rotatorio al vacío y se ajustó la concentración a 0,1g PF/mL.

Una vez definido el tipo de extracción más adecuado, se realizó la extracción con hojas secadas en estufa según se indica en III.2.2.

El extracto con mayor actividad fue seleccionado para continuar con los ensayos y éste fue denominado EAF.

III.2.4 Microorganismos

Para evaluar la efectividad de los distintos factores ensayados en el proceso de optimización de un protocolo de extracción, se determinó actividad antimicrobiana de los distintos extractos acuosos obtenidos utilizando como microorganismo control a la bacteria Gram positiva *Clavibacter michiganensis* subsp *sepedonicus* cepa C5 (origen: Dpto. de Biotecnología, ETSI Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, España). Estos ensayos se realizaron utilizando como control negativo el solvente en el medio ácido correspondiente utilizado para cada extracción.

III.2.5 Condiciones de crecimiento de los microorganismos

La bacteria *C. michiganensis* se cultivó en medio Luria Bertani (LB) (g L⁻¹: hidrolizado enzimático de caseína, 10; extracto de levadura, 5; NaCl, 5; pH 7,2-7,4), a 28°C con agitación a 100 rpm. La densidad de las suspensiones bacterianas se midió espectrofotométricamente a 600 nm.

III.2.6 Ensayos de inhibición del crecimiento microbiano *in vitro*

a)- por difusión en agar

Se llevó a cabo mediante el ensayo de difusión en agar de Parente y Hill (1992): sobre el medio sólido LB se colocaron 10 µL de diluciones sucesivas a partir de una concentración de extracto equivalente a 5 g PF/mL, se dejó secar al aire en flujo laminar y posteriormente se cubrió con una suspensión de 10⁷ UFC/mL (Unidades Formadoras de Colonias/mililitro) en medio blando (0,7% (v/v) de agar). Las placas se incubaron a 28°C durante 24 hs y la actividad antibiótica se estimó con la observación de zonas sin crecimiento alrededor de los puntos de siembra (halos de inhibición del crecimiento). Para cada extracto se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM), que es la menor concentración que tiene capacidad para inhibir al microorganismo.

b)- por microdilución en medio líquido

En una placa de microtítulo de 96 pocillos se hicieron diluciones sucesivas de la fracción a ensayar en medio de cultivo y se colocaron en los pocillos antes de la inoculación con el microorganismo. Luego se añadieron 10 µL de una suspensión de 10⁴ UFC/mL a cada pocillo de la placa (volumen final: 100 µL). En el control negativo de inhibición o control de crecimiento (100% de crecimiento), se colocó solo medio de cultivo con el inóculo y se sustituyó el volumen correspondiente a la muestra por agua estéril, y en el control positivo de inhibición se utilizó estreptomycin a una concentración de partida en el primer pocillo de 0,5 mg/mL. El crecimiento bacteriano se determinó después de 24 hs de incubación a 28°C, midiendo la absorbancia a 620 nm en un lector de placas de microtítulo (Appliskan, versión 1437). La actividad antibiótica se evaluó como porcentaje de inhibición del crecimiento con respecto al control de crecimiento, determinándose la concentración efectiva 50 (CE₅₀), la cual se define como la concentración capaz de producir la inhibición del 50% del crecimiento con respecto a un control sin tratamiento.

III.2.7 Determinación de compuestos fenólicos totales

El contenido de fenólicos totales de los extractos se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu con las modificaciones según Seong Soo y col. (2010). Los extractos se colocaron en una placa de microtítulo de 96 pocillos conteniendo agua destilada hasta obtener la concentración deseada. Luego se agregó el reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma) y una solución acuosa de Ca_2CO_3 20 % (p/v). La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 20 min. Finalmente se midió la absorbancia a 620 nm en un lector de placas de microtítulo (Appliskan, versión 1437). El total de fenólicos se calculó usando una curva de calibración establecida con una solución estándar de ácido gálico y se expresó como miligramos de equivalentes de ácido gálico por gramo de tejido fresco (mg GAE/g PF).

III.2.8 Evaluación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

El extracto EAF, ajustado a la concentración de 0,1g PF/mL, fue sometido a HPLC a fin de determinar el perfil de compuestos. Alícuotas de 50 μL fueron analizadas en el equipo de HPLC AKTA purifier (GE Healthcare, Uppsala, Suecia), usando la columna SPHERISORB C18 5 μm de 4,6 x 250 mm (Waters Associates, Milford, MA) en un gradiente de agua y metanol conteniendo TFA al 0,1%. El programa consistió en un lavado inicial de agua con 0,1% de TFA (solvente A) durante 10 min, un gradiente de 0% a 25% de metanol con 0,1% de TFA (solvente B) durante 4 min, 25% a 50% de B en 40 min, 50% a 100% de B durante 4 min, y un lavado final a 100% de B durante 10 min. El flujo de solvente utilizado fue de 1 mL/min y se colectaron fracciones de 1 mL. Los compuestos que eluyeron fueron monitoreados espectrofotométricamente usando un detector de absorción de luz UV a una longitud de onda de 285 nm. Todas las fracciones eluidas de la columna fueron ensayadas por su actividad inhibitoria del crecimiento de *C. michiganensis* por el método de difusión en agar.

III.3 RESULTADOS

III.3.1 Optimización del protocolo de obtención del EAF

El primer objetivo planteado en este trabajo, fue obtener un extracto enriquecido en al menos dos compuestos bioactivos (HeT y HgT) previamente caracterizados en nuestro grupo, pero ajustando ciertos parámetros del proceso de obtención que sean compatibles con un futuro desarrollo tecnológico. En este caso específico se debía redefinir el tipo de solvente a utilizar ya que para la purificación del compuesto HeT se utilizaron solventes orgánicos, y para el HgT el proceso de extracción incorporaba ácido trifluoroacético. Paralelamente se evaluaron otros parámetros con el objetivo de optimizar un método que también fuera lo más simple posible y que resultara, económico, inocuo y eficaz.

Las etapas que se consideraron para definir el proceso de obtención del EAF fueron las siguientes:

- 1- Procesamiento del tejido: secado y triturado de las hojas
- 2- Extracción: preparación del extracto e incubación.
- 3- Filtración del extracto.
- 4- Evaporación y concentración.

En función de los protocolos de obtención del HeT y HgT, se decidió utilizar agua como solvente de extracción acidificada a pH 3,5-4,0 para lo cual se evaluaron diferentes productos acidificantes como se describe en la sección III.2.3. Para la optimización del protocolo de extracción se utilizaron hojas frescas de la variedad Camarosa de frutilla, y para evaluar la efectividad del proceso se analizó la actividad antimicrobiana *in vitro* de los diferentes extractos obtenidos contra *C. michiganensis*.

En la Tabla 1 se observa que los extractos obtenidos a partir de una misma muestra de hojas con agua destilada acidificada con jugo de limón al 5% (v/v) y con un concentrado industrial 10X de jugo de limón al 0,5% (v/v), presentaron la mayor actividad antimicrobiana contra la bacteria control (CIM de 0,01 g PF/mL), en comparación al extracto metanólico con el cual se obtiene el HeT (EM, CIM de 0,03 g PF/mL) y al extracto obtenido con agua acidificada con TFA, con el cual se obtiene el HgT (EA-TFA, CIM de 0,03 g PF/mL). Los controles negativos correspondientes al solvente utilizado en cada caso, no inhibieron el crecimiento de la bacteria.

Tabla 1: Actividad antimicrobiana de extractos de hojas de la variedad Camarosa de *Fragaria x ananassa* contra *C. michiganensis*. CIM, concentración inhibitoria mínima en gramos de peso fresco por mL (g PF/mL).

Extractos	CIM g PF/mL
Metanólico	0,03
Acuoso/TFA	0,03
Acuoso/jugo de limón	0,01
Acuoso/concentrado industrial de jugo de limón	0,01
Acuoso/ácido clorhídrico	0,02
Acuoso/vinaza	0,10
Controles	
Metanol	-
TFA 0,1% en agua	-
jugo de limón 5%	-
concentrado industrial de jugo de limón 0,5%	-
ácido clorhídrico 5%	-
vinaza 20%	-

En base a estos resultados de inhibición, se seleccionó el extracto obtenido con agua destilada acidificada con jugo de limón, o su concentrado industrial, en base a dos criterios: por un lado, fue el de mayor actividad antimicrobiana (menor CIM), y por otro lado, el jugo de limón es un producto de la industria regional, de fácil disponibilidad, de bajo costo e inocuo.

Otro parámetro evaluado fue el grado de hidratación del tejido al momento de la extracción, es decir si utilizar hojas frescas o secas. Si bien el protocolo original de extracción del HeT usaba hojas liofilizadas, y el del HgT hojas frescas, ambos casos resultarían inadecuados para una producción a gran escala ya que la liofilización es un método costoso y para las hojas frescas se debería considerar un método de conservación. Teniendo en cuenta el objetivo de este trabajo, se evaluó si el secado en estufa a 40-45°C con aire forzado alteraba la actividad del extracto. Se eligió esta condición de secado para imitar las condiciones ambientales que normalmente se dan en invernadero en la época de disponibilidad del material vegetal (primavera-verano),

pensando en la posibilidad de utilizar esta forma de secado como una alternativa de bajo costo. El secado de las hojas en estufa no alteró la actividad antimicrobiana del extracto (CIM 0,01 g PF/mL) en comparación con las frescas.

Otro de los parámetros evaluados con respecto al material vegetal fue la influencia del tamaño de la partícula obtenida con la molienda de la hoja seca. Se evaluaron hojas sin moler, trituradas a mano y en molino a cuchillas. La mayor actividad antimicrobiana se obtuvo con las hojas trituradas con molino a cuchillas en el que se obtiene el menor tamaño de partícula (CIM 0,01 g PF/mL), mientras que con el triturado a mano y con las hojas sin moler, el valor de CIM fue de 0,03 g PF/mL, en ambos casos.

El extracto obtenido con las condiciones definidas hasta aquí, presentaba una densidad elevada debido a la presencia de microsedimentos y macromoléculas (ej., polisacáridos, proteínas solubles en agua), por lo que el paso de filtración resultaba lento y dificultoso. Para solucionar este problema, se evaluaron dos pretratamientos del extracto con el fin de disminuir la densidad y conseguir un extracto más fluido y de fácil aplicación. Uno de ellos fue someter el extracto a Baño María durante 10 min y el otro, el agregado de alcohol etílico. El tratamiento con calor, aunque no produjo cambios en la actividad antimicrobiana, no logró disminuir la densidad del extracto. Mientras que con el etanol se produjo un precipitado, que al eliminarlo permitió la obtención de un sobrenadante de menor densidad. Se pudo comprobar que el precipitado no presentó actividad biológica por lo que podría considerarse como contaminante del extracto. El tratamiento con alcohol es normalmente utilizado para la precipitación de polisacáridos (Koh y col., 2009). En este caso se evaluó el efecto del agregado de diferentes volúmenes de etanol, y diferentes temperaturas y tiempos de reposo (según se detalla en II.2.3). Considerando que no se observaron diferencias de las CIMs entre los diferentes pretratamientos con etanol, se seleccionó el de menor costo y tiempo de obtención (2 volúmenes de etanol y 1 hora de precipitación a 25°C).

Con el objetivo de simplificar el proceso, también se evaluó la posibilidad de realizar la precipitación con etanol antes de la filtración, es decir sin descartar el tejido vegetal, lo que también podría mejorar la extracción de compuestos activos. Esta alternativa permitió obtener un extracto con mayor actividad antimicrobiana (CIM 0,005 g PF/mL).

De acuerdo a las evaluaciones realizadas hasta este punto, las condiciones de cada etapa del proceso de obtención de un extracto acuoso bioactivo, quedaron establecidas como se describe a continuación:

- 1- Procesamiento del tejido: hojas secadas a 40-45°C hasta peso constante y triturado mecánico hasta tamaño promedio de partícula de 3 mm.
- 2- Extracción: una parte de tejido vegetal (peso) en 10 volúmenes de agua destilada acidificada con jugo de limón al 5% (v/v) (pH 3,5) e incubación con agitación continua durante 24 hs a 25°C.
- 3- Pretratamiento y filtración: agregado de 2 volúmenes de etanol 96° al extracto crudo, incubación durante 1 hora a 25°C y posterior filtración a través de embudo Büchner con algodón y vacío.
- 4- Evaporación y concentración: concentrar en evaporador rotatorio al vacío a 45°C hasta eliminar completamente el alcohol, y alcanzar la concentración de 0,1 g PF/mL.

El extracto obtenido según las condiciones establecidas en el protocolo arriba definido se denominó como EAF.

III.3.2 Caracterización biológica del EAF

Una vez definido el protocolo de obtención del EAF, el objetivo siguiente fue determinar las propiedades biológicas del mismo.

III.3.2.1 Actividad antimicrobiana

La evaluación de la actividad antimicrobiana del EAF en comparación con la de los extractos EM y EA-TFA se realizó mediante la CE_{50} (Concentración Efectiva 50) contra la bacteria *Clavibacter michiganensis*. También se evaluó al extracto acuoso EAF sin el pretratamiento con etanol (EAFs/EtOH). Los diferentes extractos se obtuvieron a partir de hojas de la variedad Camarosa provenientes de la localidad de Famaillá (provincia de Tucumán) colectadas en el mes de diciembre como se describe en Cerviño (2014, tesis de grado). En la Figura 4 se observa que el EAF presentó la mayor actividad antimicrobiana, mostrando una CE_{50} promedio de $0,06 \times 10^{-4}$ g PF/mL, mientras que el EM mostró una CE_{50} de $0,25 \times 10^{-4}$ g PF/mL, el EA-TFA de $0,2 \times 10^{-4}$ g PF/mL, y el EAFs/EtOH de $0,13 \times 10^{-4}$ g PF/mL.

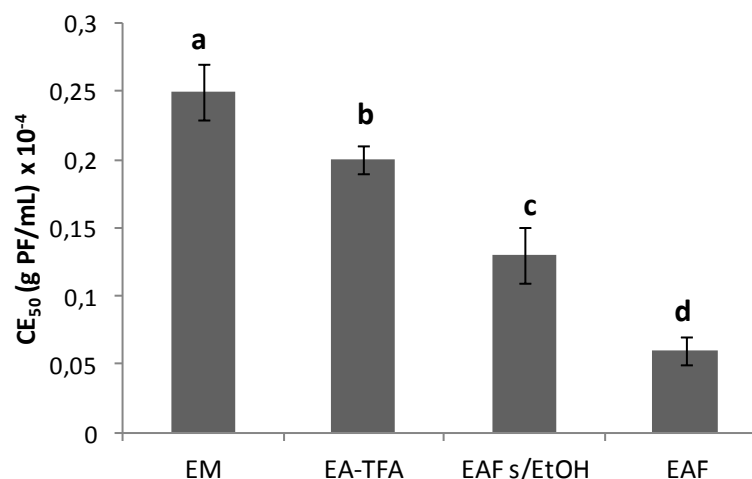


Figura 4: Actividad antibacteriana (CE₅₀) contra *C. michiganensis* de los extractos metanólico (EM), acuoso con TFA (EA-TFA) y acuoso con jugo de limón con y sin la precipitación con etanol (EAF y EAFs/EtOH). Los resultados se expresan como g PF/mL \pm desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas con $p \leq 0,05$.

III.3.2.2 Contenido de compuestos fenólicos solubles totales

En trabajos previos de nuestro grupo se determinó que el contenido de compuestos fenólicos del EM está directamente relacionado con la actividad antimicrobiana, por lo que para conocer si esto se mantenía en el EAF, se determinaron los compuestos fenólicos solubles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu (Cerviño, 2014). En la Figura 5, se observa que el EAF presentó el mayor contenido de compuestos fenólicos con respecto al EM y al EA-TFA. En esta figura también se observa que el contenido de compuestos fenólicos del extracto acuoso sin el pretratamiento con etanol (EAFs/EtOH) es menor al del EAF, por lo que el tratamiento con etanol enriqueció al EAF de compuestos fenólicos activos. En el control negativo de agua/limón no se detectaron compuestos fenólicos.

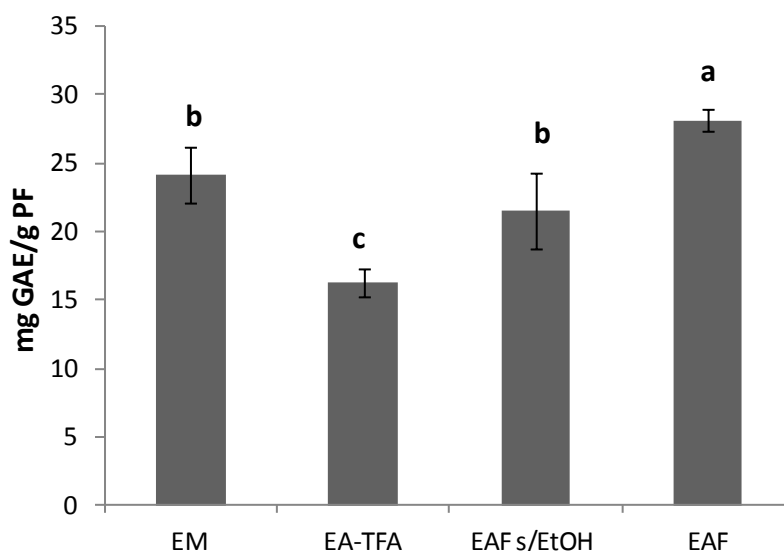


Figura 5: Contenido de compuestos fenólicos totales en los extractos metanólico (EM), acuoso con TFA (EA-TFA) y acuoso con jugo de limón con y sin la precipitación con etanol (EAF y EAFs/EtOH). El contenido de compuestos fenólicos totales se determinó mediante el método Folin-Ciocalteu, expresando los resultados como mg GAE/g PF \pm desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas con $p \leq 0,05$.

III.3.2.3 Presencia de los compuestos bioactivos HgT y HeT en el EAF

Mediante cromatografía líquida de alta resolución o HPLC, se comparó el perfil cromatográfico de EAF s/EtOH y EAF, con el del EM y EA-TFA, para evaluar la presencia de los compuestos activos previamente caracterizados por nuestro grupo. Cada fracción eluída fue monitoreada por la absorbancia a 285 nm y evaluada por la actividad antimicrobiana contra *C. michiganensis*. De ambos análisis se pudo determinar que los cuatro extractos tienen un perfil cromatográfico similar, que están presentes ambos compuestos activos (HgT y HeT), y que estos tienen actividad antimicrobiana. Sin embargo, los dos compuestos están en diferentes proporciones de acuerdo al método de extracción aplicado. La Figura 6A y B, muestra los cromatogramas correspondientes a los extractos controles, EM y EA-TFA, en donde se observa la elución del HgT a los 2,7 min y el HeT a los 26,7 min. En los cromatogramas correspondientes al EAF s/EtOH y EAF (Figura 6C y D), se observa la presencia de los picos correspondientes a HgT y HeT, y además que el pretamamiento con etanol produce un incremento general de los compuestos extraídos (Figura 6D).

En la cromatografía del EAF se determinó que el 90% de la actividad antimicrobiana contra *C. michiganensis* corresponde a las fracciones eluídas a los 2,7 y

26,7 min, y el resto de la actividad se encuentra en las fracciones eluidas en el rango comprendido entre los 55 y 65 min.

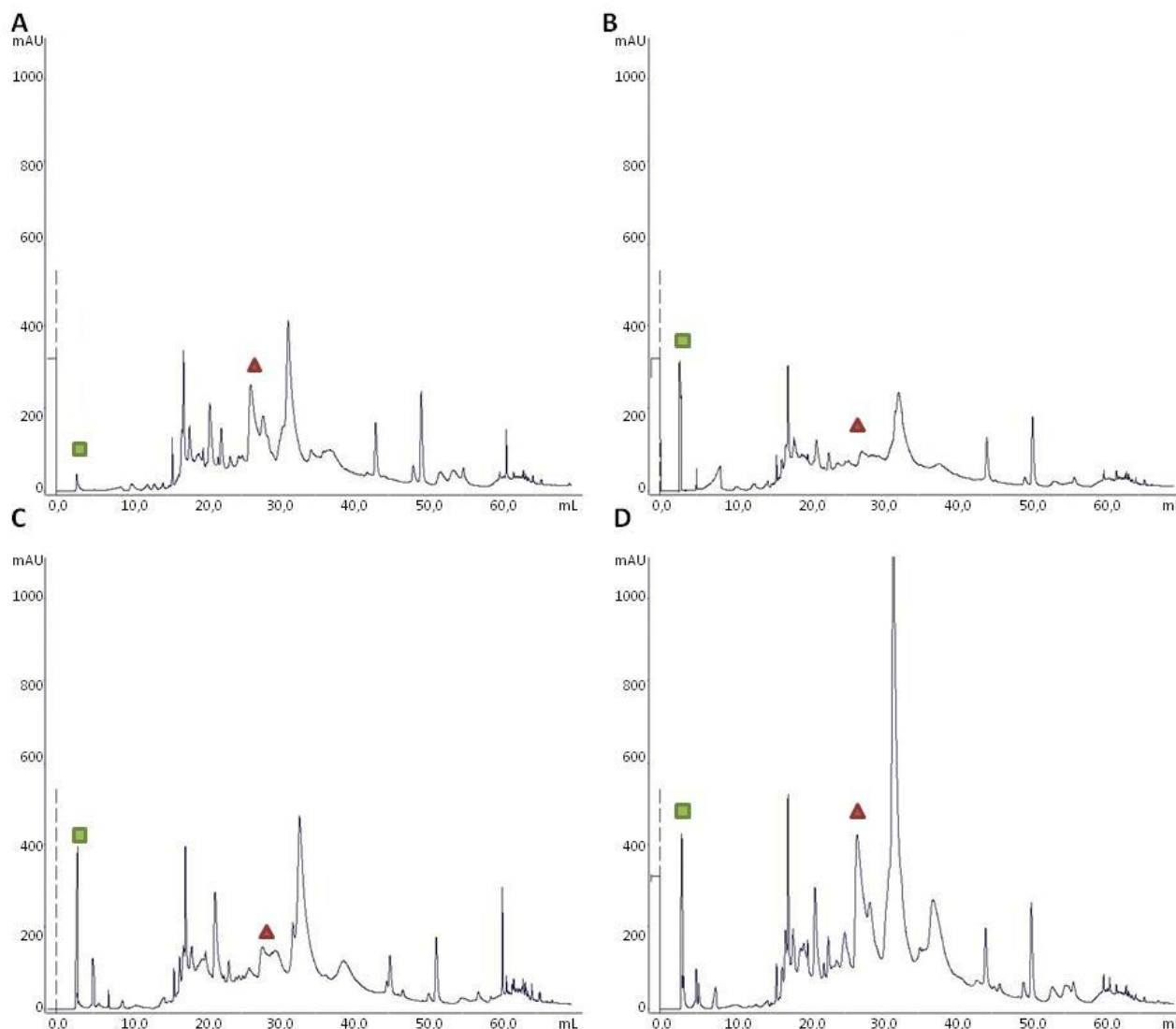


Figura 6: Cromatogramas obtenidos del análisis mediante HPLC de los extractos A) EM, B) EA-TFA, C) EAFs/EtOH y D) EAF. El fraccionamiento se realizó en una columna C18, se eluyó con un gradiente de agua/metanol y se detectó a 285 nm. En cada cromatograma se indica el pico que corresponde al compuesto HeT (▲) y HgT (■).

Mediante espectrometría de masa (Electrospray ionization negativa: ESI-) se confirmó que los picos del EAF eluidos a 2,7 min y a 26,7 min del HPLC, se corresponden con los compuestos HgT y HeT, respectivamente.

A partir de este análisis se pudo determinar las cantidades de los compuestos HeT y HgT presentes en los diferentes extractos (Tabla 2).

Tabla 2: Contenido de los compuestos HeT y HgT en mg/g PF en los diferentes extractos, determinado mediante el análisis por HPLC.

Extracto	HeT (mg/g PF)	HgT (mg/g PF)
EM	1,0	0,1
EA-TFA	0,2	0,9
EAF s/EtOH	0,3	0,9
EAF	1,3	1,0

III.3.3 Propuesta de planta piloto para el escalado del EAF

Considerando que este trabajo pretende aportar el “Know How” para la concreción de un desarrollo tecnológico que involucra el diseño de un bioproducto para el manejo sanitario de enfermedades agrícolas, resultó necesario plantear el proyecto de una planta piloto que replique las etapas realizadas en laboratorio, sirva de base para realizar ajustes del proceso y permita obtener volúmenes del extracto suficientes para realizar ensayos agronómicos de mayores dimensiones.

El fin que se persigue con una planta piloto es obtener información sobre un determinado proceso, que permita determinar si el mismo es técnica y económicamente viable, así como establecer los parámetros de operación óptimos para el posterior diseño y construcción de la planta a escala industrial.

En este sentido se realizó una propuesta de planta piloto para la producción del extracto con una capacidad operativa de las principales etapas del proceso las cuales se muestran en el esquema de la Figura 7 y se describen a continuación:

Obtención del material vegetal: las hojas se obtienen de un cultivo comercial colectadas al finalizar el ciclo del cultivo en los meses de noviembre-diciembre, utilizando una cosechadora de hortalizas de hojas, la cual tiene una capacidad de cosecha de 1,5 ha/h.

Secado: se realiza en invernadero, aprovechando las altas temperaturas del momento de la cosecha (verano), colocando las hojas sobre rejillas para favorecer la aireación de las mismas. El secado de las hojas se lleva a cabo durante 7 y 10 días con circulación de aire.

Molienda: se realiza en un molino a cuchillas que permita obtener partículas de 3 mm, el cual posee una potencia de 0,5 HP y una capacidad de 30 kg/h.

Extracción: se realiza en un equipo de extracción que cuenta con agitador tipo paletas a baja revoluciones (5-10 vueltas/min) y con una potencia de 1HP. El volumen de extracción por ciclo se define por la capacidad del equipo concentrador que elimina el etanol (10L/h). El equipo fue diseñado en el grupo de investigación de la EEAOC y construido por una empresa Argentina. De acuerdo a esto se propone realizar extracciones entre 30 y 40 L de extracto por día ya que a este volumen se homogenato se debería agregar entre 60 y 80 L de etanol.

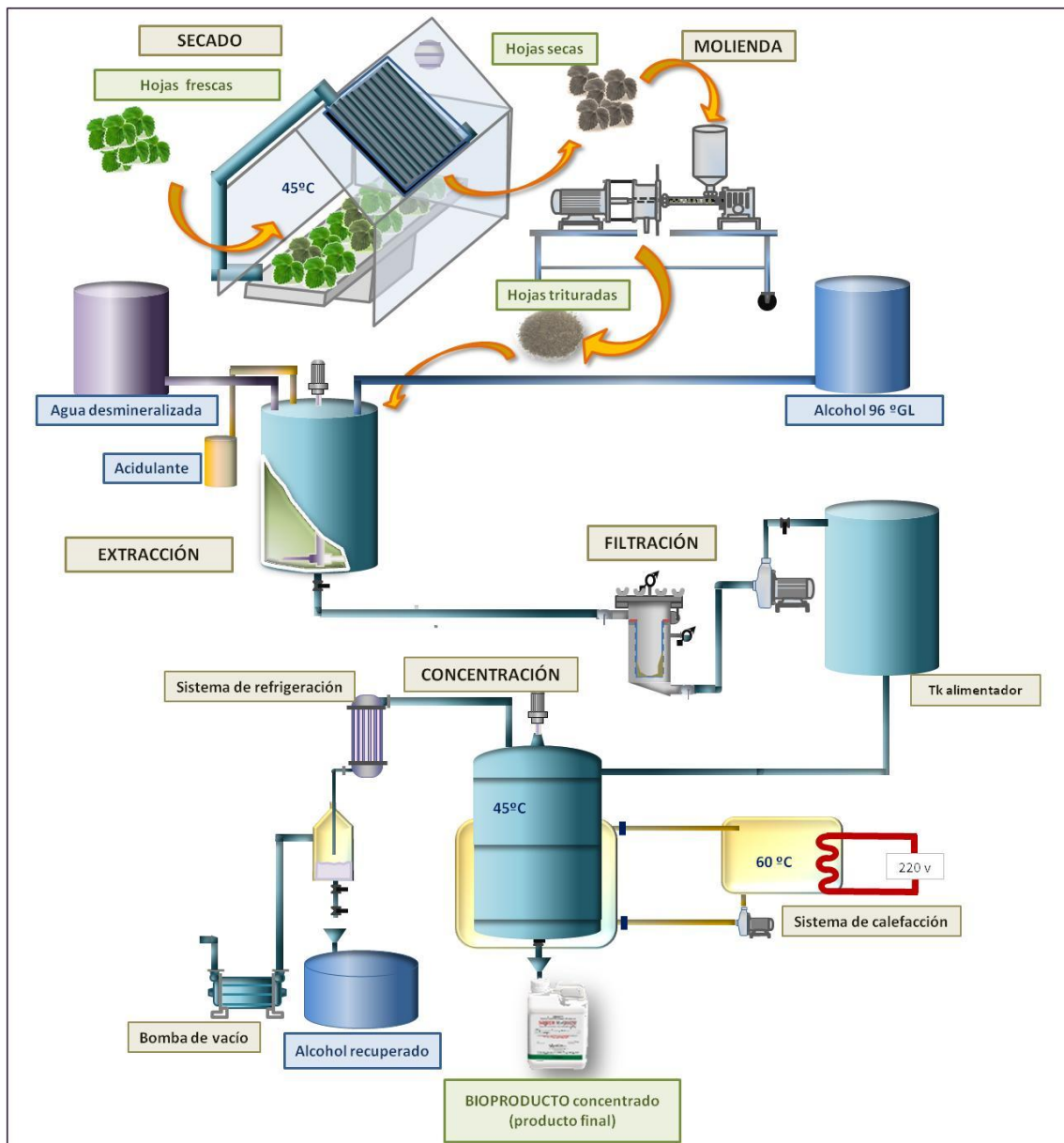


Figura 7: Diagrama de flujo y equipamiento propuesto para el proceso de escalado del EAF en una planta piloto.

III.4 DISCUSIÓN

En la actualidad, el manejo de las plagas y enfermedades vegetales se realiza fundamentalmente mediante el uso de agroquímicos de síntesis. Sin embargo, esta práctica presenta diversos inconvenientes tanto en el agro ecosistema como en la salud de la población productora y consumidora. El uso de bioproductos, ya sean de origen microbiano o vegetal, representa una alternativa a los agroquímicos de síntesis, y está tomando cada vez mayor participación en los sistemas de producción agrícola. En general los bioproductos son biodegradables, tienen actividad de amplio espectro, y actúan en bajas dosis, disminuyendo las posibilidades de generar resistencia en los patógenos (Sheikh y col., 2012). Nuestro país también se sumó a la tendencia de utilizar bioproductos para combatir plagas agropecuarias y ya se registran numerosos ejemplos. Así por ejemplo la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC) en colaboración con la empresa ANUIT SA, la UNT y el CONICET, está a punto de lanzar al mercado el bioinsumo denominado PSP elaborado en base a un péptido fúngico, el cual induce los mecanismos de defensa de la propia planta, promueve el crecimiento vegetal y el rendimiento de cultivos de importancia regional. También el INTA impulsó la creación de Microplaguicidas Argentinos (Micoplar), una planta piloto que desarrolla bioinsecticidas y bioplaguicidas basados en hongos benéficos. Otro ejemplo es BioExt SA, una empresa biotecnológica que produce extractos vegetales enriquecidos en componentes bioactivos reconocidos por su capacidad de impartir efectos biológicos claves, y Rizobacter que es una empresa que produce bioinoculantes y fertilizantes biológicos en base de microorganismos, son algunos ejemplos.

Como se mencionó anteriormente, los compuestos HeT y HgT fueron identificados tanto en extractos metanólicos de hojas de frutilla como en extractos acuosos acidificados con ácido trifluoroacético. Uno de los objetivos de esta Tesis fue adaptar el protocolo para la obtención de un extracto enriquecido en estos compuestos activos que no involucre la utilización de metanol, ni TFA debido al elevado costo y al riesgo que representa la manipulación de los mismos. En este sentido, se decidió usar agua como solvente, considerando que los compuestos son muy hidrofílicos, y para reemplazar el TFA se evaluaron diferentes alternativas como el HCl, vinaza, un desecho de la industria azucarera, o jugo de limón y su concentrado industrial, disponible en la agroindustria local. La efectividad de los diferentes métodos de extracción fue evaluada mediante ensayos de actividad antimicrobiana *in vitro*. Con el limón como acidificante

se obtuvo un extracto, al que denominamos EAF, el cual presentó la mayor actividad antimicrobiana de todas las alternativas evaluadas, incluso al obtenido con metanol o con agua y TFA. Esto sugiere que el jugo de limón mejoraría la recuperación de compuestos antimicrobianos, incluso teniendo un pH similar al agua acidificada con TFA, por lo que este resultado no sólo sería una consecuencia del pH bajo. Esto se pudo comprobar mediante la determinación del contenido de compuestos fenólicos y el perfil cromatográfico del EAF en donde se observó un incremento en el contenido de los principales compuestos bioactivos. Aproximadamente el 90% de la actividad antimicrobiana del EAF estuvo asociada a los compuestos HeT y HgT.

La adición de ácido al solvente de extracción podría actuar de diferentes maneras ya sea incrementando la estabilidad de los compuestos fenólicos (Friedman y Jürgens, 2000), favoreciendo la disolución de los mismos vía un mecanismo de hidrólisis ya que algunos forman parte de polímeros o están unidos a constituyentes de la pared celular, o mejorando la desintegración de la pared celular facilitando así la solubilización y difusión de los compuestos a partir del material vegetal (Chirinos y col., 2007).

Por otro lado, el uso del agua como solvente de extracción, si bien tiene numerosas ventajas, tiene el inconveniente de que el extracto obtenido presentó una alta densidad posiblemente debido a la presencia de polisacáridos y/o proteínas, lo cual dificultó la manipulación. Por ello fue necesario adicionar una etapa al proceso de obtención del EAF que permitiera solucionar este problema. El agregado de dos volúmenes de etanol y reposo a 25°C durante 1 hora, permitió obtener un extracto de fácil manipulación y mejor filtrabilidad, mejorando incluso la actividad biológica inicial. Este resultado podría deberse a que el etanol, aumentó la extracción de compuestos fenólicos totales, y específicamente enriqueció al EAF en el HeT. Esto se concluye al comparar los cromatogramas de EAF y EAF s/EtOH (Figura 6), donde se observa que el pico correspondiente a HeT es mayor en EAF. La incorporación del etanol en la extracción no tendría una gran incidencia en el costo del EAF ya que es un producto de la industria tucumana de fácil disponibilidad, y que además podría recuperarse para su reutilización.

Para la obtención de EAF se usaron hojas secas, porque se observó que la actividad antimicrobiana del extracto obtenido con este material se mantenía igual que el obtenido con las hojas frescas. Esto constituye una ventaja porque a la hora del escalado se necesitan grandes cantidades del material vegetal, y de esta manera se

facilita la conservación a temperatura ambiente. Otra característica importante es que se utilizaron hojas de frutilla colectadas al final del ciclo productivo. Este material es descartado por los productores, debido a que el cultivo se renueva todos los años, por lo que podría utilizarse como materia prima para la elaboración del bioproducto, incidiendo favorablemente en el costo de producción. En este trabajo, nos enfocamos en el cultivar Camarosa que era, hasta las campañas evaluadas, la variedad más ampliamente usada por los productores y en la actualidad aun sigue vigente. Sin embargo, en nuestro grupo se están evaluando nuevas variedades con propiedades similares o mejores a la Camarosa, que permitirían mejorar la calidad del extracto.

Según Cerviño (2014), el extracto obtenido a partir de las hojas cosechadas en enero, a principios del cultivo en Taffí de Valle (2014 msnm), tenía una actividad similar al extracto obtenido con hojas colectadas en diciembre de Famaillá (339 msnm). Esto estaría relacionado con la mayor incidencia de radiación UV, la cual es una de las condiciones ambientales que más influye en la síntesis de compuestos fenólicos (Luthria y col., 2006). Sin embargo, la cosecha de hojas en Famaillá, presenta las ventajas de tener mayor accesibilidad, distancias más cortas hasta la planta piloto, menores gastos de traslado, y mayor superficie de producción.

Usar un extracto crudo, en lugar de compuestos puros para el desarrollo de un bioproducto, puede presentar problemas para la estandarización de los principios activos, o los compuestos que acompañan al principio activo, pueden tener reacciones indeseables. Sin embargo, también se puede producir un efecto de sinergismo mejorando las cualidades del extracto (Ulrich-Merzenicha y col., 2010). Además los costos de producción de un extracto son menores a la obtención de compuestos puros.

En este trabajo, el proceso de extracción definido permitió la obtención de un extracto principalmente enriquecido en los dos compuestos activos de interés, los cuales han sido previamente caracterizados y además pueden ser detectados y cuantificados fácilmente en un solo paso cromatográfico por HPLC, lo cual podría emplearse como una herramienta para controlar la calidad de los diferentes lotes de producción (trazabilidad).

La optimización de un proceso consiste en estudiar cada una de las etapas que lo componen y determinar el valor de las variables que se pueden manipular a fin de obtener el mejor beneficio económico y un producto de calidad. Existen variables cualitativas que permiten tomar decisiones que pueden adoptarse en la escala de laboratorio y no requieren afinar el diseño de lo que sería la escala de producción:

habilitan o descartan alternativas de producción (por ejemplo: solvente, temperatura de extracción, etapas de purificación, etc). También existen variables de carácter cuantitativo que establecen relaciones de compromiso entre diferentes componentes del costo del futuro proceso de producción. El valor óptimo de estas variables no puede ser determinado sin considerar la escala de producción (considerando sus costos).

El diseño y puesta en marcha de una planta piloto permitirá realizar un estudio del proceso productivo para la optimización de diferentes parámetros de operación (variables cuantitativas) y obtener mayores volúmenes de EAF. Esto facilitará la realización de ensayos a campo y avanzar en el desarrollo de un bioproducto.

III.5 CONCLUSIONES PARCIALES

- Se definieron las condiciones para obtener un extracto acuoso a partir de hojas de frutilla (EAF) conteniendo los compuestos bioactivos HeT y HgT.
- Se reemplazó el metanol y el TFA, utilizados en los protocolos originales (EM y EA-TFA) para la obtención de los compuestos bioactivos, por agua y jugo de limón.
- El EAF presentó mayor actividad antimicrobiana y contenido de compuestos fenólicos con respecto EM y EA-TFA.
- Se enriqueció al EAF en el compuesto HeT, adicionando una etapa de precipitación con etanol, lo que además aumentó la fluidez del extracto.
- Se determinó que los compuestos HeT y HgT, son los responsables del 90% de la actividad antimicrobiana del EAF.
- Se realizó una propuesta de planta piloto para el escalado de la producción de EAF de acuerdo al protocolo de extracción definido en este capítulo.

CAPITULO IV

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO CON EAF EN LA INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA DE DEFENSA EN LA PLANTA MODELO *ARABIDOPSIS THALIANA*

IV.1 INTRODUCCIÓN

IV.1.1 La defensa vegetal

Las plantas constituyen una fuente de nutrientes y agua para los microorganismos y debido a ello, son infectadas por numerosos y diversos patógenos con estilos de vida muy variados. A lo largo de millones de años las plantas y los microorganismos han coevolucionado, cada nueva estrategia de “ataque” por parte de los patógenos estimula el desarrollo en las plantas de nuevos mecanismos defensivos generando lo que se puede considerar como una “guerra armamentística” sin fin (Hou y col., 2009).

Cuando un patógeno entra en contacto con una planta, las células vegetales reconocen moléculas microbianas conservadas activando la respuesta de defensa basal. Estas moléculas se conocen como patrones moleculares asociados a microbios (MAMPs del inglés “microbe-associated molecular patterns”, antiguamente llamados PAMPs, del inglés “pathogen-associated molecular patterns”, porque están asociadas al reconocimiento de un patógeno). Los MAMPs son moléculas altamente conservadas y abundantes en los microbios y cumplen funciones esenciales para su desempeño y supervivencia (Wang y col., 2015), tales como la quitina de los hongos, los glucanos β lineales de oomicetes, la flagelina (flg22), el factor de elongación Tu (EF-Tu) y los peptidoglicanos de bacterias (PGN), entre otros. Dado que las plantas no poseen estos MAMPs, reconocen a estas moléculas como extrañas y por ello desencadenan una respuesta contra el potencial patógeno. Además de los MAMPs, existe otra clase de moléculas endógenas, derivadas de las plantas, antiguamente llamadas “inductores endógenos” y hoy conocidas como DAMPs (del inglés “damage-associated molecular patterns”), las cuales aparecen en el espacio intercelular en respuesta al daño causado por un patógeno, por ejemplo. Entre los ejemplos de estas moléculas, se incluyen fragmentos de pared celular o efectores derivados de proteínas vegetales citoplasmáticas. Entre los DAMPs también se incluyen algunas moléculas que son sintetizados *de novo* por la planta en respuesta al ataque (Krol y col., 2010).

Los MAMPs son reconocidos por receptores (PRR del inglés “pattern recognition receptors”) ubicados en la superficie de la célula vegetal (Monaghan y Zipfel, 2012), los cuales activan las respuestas de defensa para detener al invasor. Tradicionalmente esta primera línea de defensa se denominó inmunidad inducida por PAMPs o PTI (del inglés “PAMP-triggered immunity”) (Boller y Felix, 2009).

Luego del reconocimiento, se desencadenan rápidamente cambios en el flujo de iones a través de la membrana plasmática, seguidos de una cascada de señalización que incluye la activación de MAP quinasas (MAPK, del inglés “mitogen-activated protein kinase”) y de quinasas dependientes de Ca^{2+} (CDPKs), la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), cambios en la expresión de genes, un refuerzo en la pared celular a través de la deposición de calosa y cambios en los patrones fotosintéticos (Segonzac y Zipfel, 2011; Gohre y col., 2012). La calosa está compuesta por un polímero amorfo de alto peso molecular que químicamente se corresponde con un glucano β -(1,3) lineal. Este polímero sirve como una matriz para que se depositen compuestos antimicrobianos sintetizados para la defensa, y así puedan estar concentrados en los sitios de ataque del patógeno (Luna y col., 2011). La producción de ERO es una de las respuestas de defensa más rápida, comenzando a pocos minutos luego del reconocimiento de los MAMPs. Se ha propuesto que la producción de ERO podría actuar directamente ejerciendo un efecto tóxico sobre el patógeno, o indirectamente participando en el reforzamiento de la pared celular para bloquear la entrada del patógeno o como segundos mensajeros locales y sistémicos para disparar respuestas adicionales, como la expresión de genes o el cierre estomático (Kadota y col., 2015).

Frente a la barrera de defensa impuesta por las plantas, los patógenos han evolucionado desarrollando estrategias para evadir la PTI, por ejemplo evitando el reconocimiento o inhibiendo y bloqueando la cascada de señales (Macho y Zipfel, 2015). Mientras que los patógenos desarrollaron efectores para sobrepasar las defensas de las plantas, éstas adquirieron la capacidad de reconocer estos efectores u otros factores de virulencia de los patógenos, mediante las proteínas llamadas R (de Resistencia). Esto se conoce como inmunidad inducida por efectores (ETI, del inglés “effector-triggered immunity”), la que se caracteriza por un rápido aumento de ERO y por la muerte celular en la zona atacada por el patógeno, también conocida como respuesta de hipersensibilidad o HR (del inglés “hypersensitive response”) (Bittel y Robatzek, 2007; Jones y Dangl, 2006). Mientras se cree que PTI y ETI incluyen una red de señalización común, ETI es por lo general cuantitativamente más fuerte que el PTI y está asociada a respuestas inmunes más sostenidas (Tsuda y Katagiri, 2010). Todo lo mencionado anteriormente puede sintetizarse en el modelo evolutivo conocido como “modelo zigzag”, que se resume en la Figura 9.

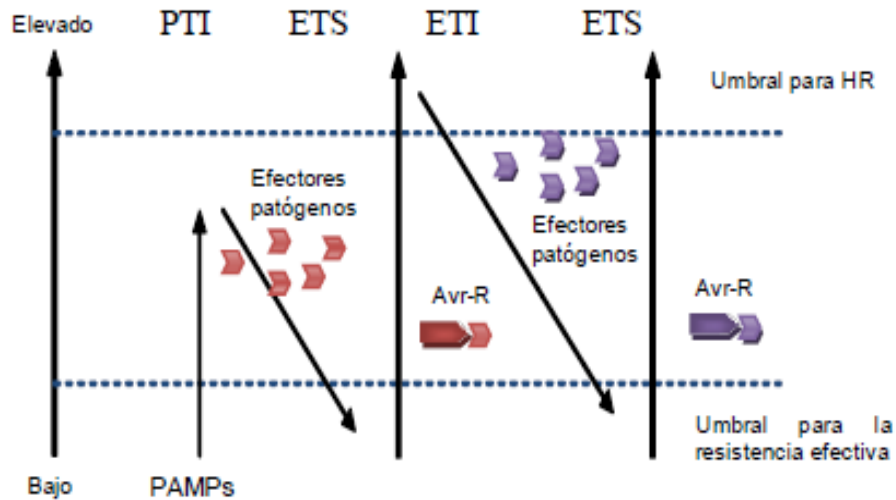


Figura 9: Esquema del modelo de zigzag que ilustra la respuesta cuantitativa del sistema inmune en plantas frente al ataque de patógenos. En la primera fase, los MAMPs (PAMPs, diamantes rojos) son reconocidos por sus PRRs para desencadenar la PTI. En la segunda fase, los patógenos más exitosos envían proteínas efectoras para interferir con la PTI, dando lugar a la ETS (del inglés, “Effector Triggered Susceptibility”). En la tercera fase, alguno de esos efectores (marcados en rojo) será reconocido por una proteína de la planta, que desencadenará la ETI, que amplificará la respuesta iniciada por la PTI, dando incluso lugar a la respuesta de hipersensibilidad (HR). Fuente: Jones y Dangl, 2006.

Las hormonas vegetales, como el ácido salicílico (AS), ácido jasmónico (AJ) y etileno (ET) son elementos claves en las redes de señalización implicadas en PTI y ETI. Las interacciones entre estas moléculas de señalización le permiten a la planta activar o modular un espectro de defensas apropiadas en función del estilo de vida del agente patógeno (necrótrofo o biótrofo). En general, los mecanismos de defensa dependientes del ácido salicílico desencadenan resistencia contra patógenos biotróficos y hemibiotróficos, mientras que los dependientes del ácido jasmónico y etileno activan la resistencia contra patógenos necrotrofos. Estas dos vías son en general antagónicas: la resistencia a biótrofos elevada se correlaciona a menudo con una mayor susceptibilidad a necrotrofos y viceversa (Robert-Seilantantz y col., 2011).

IV.1.2 Imitar a la naturaleza

El diseño de estrategias de manejo de los cultivos aprovechando la capacidad natural de las plantas para activar los mecanismos de defensa, mediante el uso de “inductores o elicitors” de estas defensas, representa una alternativa de manejo más amigable o compatible con el ambiente. Un inductor puede ser un microorganismo o un compuesto microbiano o vegetal, que aplicado a las plantas ayuda a reducir la incidencia de plagas y enfermedades. Es una molécula que luego de ser reconocida por la planta, activa señales que preparan o inducen una respuesta de defensa en la misma (Wiesel y col., 2014).

La efectividad de un inductor depende de una serie de factores como la concentración, el tiempo de elicitación requerido y su mecanismo de acción específico. El uso adecuado y controlado de estos inductores puede ser muy beneficioso para la lucha contra las plagas y enfermedades que afectan a los cultivos, y de hecho hoy se ha convertido en uno de los principales temas de investigación para el desarrollo agrícola mundial.

En el presente capítulo de la Tesis se describe cómo el tratamiento con el EAF produce una reducción de la enfermedad producida por patógenos en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (familia *Brassicaceae*), asociándola a una activación de los mecanismos de defensa vegetal, mediante la evaluación de marcadores bioquímicos y moleculares.

Se seleccionó a *Arabidopsis thaliana* como modelo vegetal para el estudio de la actividad de EAF debido a que esta planta es ampliamente utilizada en investigación. Esto se debe a que posee ciertas características como el corto tiempo de generación, tamaño pequeño lo que permite el análisis de un gran número de individuos en un mínimo espacio, produce semillas prolíficamente a través de la autopolinización, es la planta superior con el genoma más pequeño conocido, y por lo tanto, un sistema ideal para estudios genéticos y moleculares, y además es fácil de transformar con *Agrobacterium tumefaciens* (Koornneef y Meinke, 2010). El conocimiento que se obtiene de la planta modelo establecida como un sistema de referencia, permite avanzar rápidamente en la investigación de nuevos inductores defensa y transferirlos para el mejoramiento del manejo fitosanitario de cultivos de importancia económica.

IV.2 MATERIALES Y MÉTODOS

IV.2.1 Producción de plantas de *Arabidopsis thaliana*

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia (Col-0), provistas por el Banco de semillas del ITANOA, fueron conservadas a -20°C.

Para la producción de plantas se evaluaron distintos protocolos, cuyas etapas se describen a continuación:

Protocolo A

-Desinfección de semillas: se sumergieron las semillas en etanol 70 % (5 min), hipoclorito de sodio al 10% (10 min), y luego se realizaron 4 lavados de 1 min con agua destilada estéril.

-Siembra: en placas de Petri conteniendo medio Murashige & Skoog (MS, Murashige y Skoog, 1962) diluido a la mitad, 1% m/v de sacarosa y 0,7% m/v de agar (Sigma, EUA).

-Vernalización: se lleva a cabo durante dos días en oscuridad a 4°C.

-Germinación: durante 7 días, a 22-23°C y 16 hs de luz (intensidad lumínica $100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

-Transplante: a sustrato estéril (mezcla de turba-arena-perlome, 2:1:1), en macetas de 110 mL.

-Crecimiento: las plantas se colocaron en una bandeja cubierta con film para conservar la humedad, a 16 hs de luz (intensidad lumínica $100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Al cabo de 3 días, las plantas fueron gradualmente descubiertas hasta los 7 días momento en el cual se retiró completamente la cubierta de film. A partir de este momento fueron regadas cada dos días con solución nutritiva de Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950).

Protocolo B

-Desinfección de semillas: idem A.

-Siembra: idem A.

-Vernalización: idem A.

-Germinación: durante 7 días, a 22-23°C y 10 hs de luz (intensidad lumínica $100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

-Transplante: idem A.

-Crecimiento: las plantas se colocaron en una bandeja cubierta con film para conservar la humedad, a 10 hs de luz. Al cabo de 3 días, las plantas fueron gradualmente descubiertas hasta los 7 días momento en el cual se retiró

completamente la cubierta de film, aplicando riegos cada dos días con solución nutritiva de Hoagland.

Protocolo C

- Desinfección: Idem A
- Siembra: en frascos de vidrio conteniendo medio MS diluido a la mitad, 1% m/v de sacarosa y 0,22% m/v de phytigel (Sigma, EUA).
- Vernalización: Idem A
- Germinación y crecimiento: a 22-23°C y 16 hs de luz (intensidad lumínica $100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Las plantas se mantuvieron en esterilidad hasta el final del crecimiento.

Protocolo D

- Desinfección: no se realizó tratamiento. Las semillas fueron directamente resuspendidas en agua destilada estéril.
- Vernalización: Idem A
- Siembra: en sustrato estéril.
- Germinación y crecimiento: las plantas se colocaron en una bandeja cubierta con film para conservar la humedad, a 22-23°C y 16 hs de luz (intensidad lumínica $100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), y a los 10 días fueron gradualmente descubiertas hasta los 15 días, momento en el cual se retiró completamente la cubierta de film. Luego fueron regadas cada dos días con solución nutritiva de Hoagland.

Protocolo E

- Desinfección de semillas: Idem A.
- Siembra: en placas de Petri conteniendo medio MS líquido diluido a la mitad, 1% m/v de sacarosa.
- Vernalización: Idem A
- Germinación: durante 7 días, a 22-23°C y 12 hs de luz (intensidad lumínica $100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)
- Transplante: a medio MS líquido contenido en placas de 96 pocillos
- Crecimiento: Las placas se colocaron en una cámara a 22-23°C y 12 hs de luz, y se mantuvieron en esterilidad hasta el momento de ser utilizadas (4 semanas desde la siembra).

Para la solución nutritiva de Hoagland, se prepararon las soluciones “stock” de sales indicadas en la Tabla 3, a partir de los cuales se tomó el volumen necesario para preparar la concentración deseada en cada caso en agua destilada.

Tabla 3: Volumen de las soluciones “stock” de sales para preparar 1L de solución de Hoagland 1X.

Stock de Sales	mL del stock/L
KNO ₃ 1M	5
KH ₂ PO ₄ 1M	2,5
MgSO ₄ 1 M	2
Ca(NO ₃) ₂ 1 M	2
Fe-EDTA 1 M	2,5
Micronutrientes (H ₃ BO ₃ 70 mM; MnCl ₂ 14 mM; CuSO ₄ 0,5 mM; ZnSO ₄ 1 mM; NaMoO ₄ 0,2 mM; CoCl ₂ 0,01 mM)	1

IV.2.2 Microorganismos

Para los ensayos de desafío contra patógenos se utilizaron los siguientes microorganismos: una cepa de *Xanthomonas campestris* pv *campestris* (Xcc 8004) y una cepa de *Pseudomonas viridiflava* (Pvalb8) cedidas por Dr Adián Vojnov (Instituto Cesar Milstein, Bs As), y una cepa del hongo *Botrytis cinerea* (B1), cedida por el Dr Juan C. Diaz Ricci (INSIBIO, Tucumán).

IV.2.3 Preparación de los inóculos

La bacteria *Xcc* 8004 se cultivó en medio Cadmus (g L⁻¹: extracto de malta, 3; extracto de levadura, 3; peptona, 5; glucosa, 1,5; pH 7,2 – 7,4.), y la bacteria *Pvalb8* se cultivó en medio Luria Bertani (LB) (g L⁻¹: hidrolizado enzimático de caseína, 10; extracto de levadura, 5; NaCl, 5; pH 7,2-7,4) a 28°C con agitación constante, hasta saturación del cultivo. La densidad de la suspensión se midió espectrofotométricamente a 600 nm. Luego el cultivo se centrifugó a 5000 g por 10 min, se descartó el sobrenadante, se resuspendió en MgCl₂ 10 mM estéril y posteriormente se diluyó a la concentración deseada (10⁶, 10⁸ y 10¹⁰ UFC/mL).

El hongo *B. cinerea* se cultivó en placas de Petri en medio agar papa glucosado (APG) (g L⁻¹: agar, 15; glucosa, 20; infusión de papa, 4; pH 6,5-7,0) a 22°C, luz blanca

fluorescente ($100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y fotoperíodo de 16 hs de luz, durante 15 días para inducir la formación de esporas. Para preparar la suspensión de esporas, estas se recolectaron añadiendo 3 mL de agua destilada estéril sobre la superficie del micelio y raspando cuidadosamente la misma con ansa de siembra. La suspensión de esporas se obtuvo luego de filtrar a través de gaza estéril para separarlas del micelio, y la cuantificación de esporas se realizó con cámara de Neubauer. El inóculo se preparó a una concentración de 5×10^4 esporas/mL en caldo papa-glucosa.

IV.2.4 Infección con bacterias

Las inoculaciones de las suspensiones bacterianas se realizaron por rociado en todas las hojas (cara abaxial y adaxial) de las plantas de *A. thaliana* utilizando un aspersor, y agregando como agente surfactante Tween 20 a una concentración de 0,02% v/v. Luego de la inoculación, las plantas fueron mantenidas hasta el final del experimento en una bandeja cubierta con film para mantener alta humedad y a una temperatura de 25°C. Al cabo de 1 y 3 días posteriores a la inoculación (dpi), se tomaron tres hojas completamente desarrolladas de cada planta infectada (usando tres réplicas biológicas de tres plantas diferentes por tratamiento). Estas hojas fueron pesadas, lavadas, y homogeneizadas con una solución de MgCl_2 10mM estéril. Se realizaron diluciones seriadas del homogenato obtenido y se sembraron en placas de Petri sobre medio apropiado para la bacteria utilizada (Macho y col., 2012). Las placas fueron incubadas a 28°C y al cabo de 48 hs se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC).

IV.2.5 Inoculación con *Botrytis cinerea*

La inoculación con *B. cinerea* se realizó depositando una gota de 6 μL de la suspensión de esporas sobre la cara adaxial de todas las hojas completamente expandidas, de acuerdo a L' Haridon y col., (2011). Las plantas se mantuvieron en cámaras de infección con humedad de aproximadamente el 100%, en oscuridad, y a temperatura de 20-22°C. Los síntomas de infección fueron evaluados a los 2 dpi, midiendo el diámetro (en milímetros) de la lesión provocada por *B. cinerea* en cada hoja inoculada.

IV.2.6 Evaluación de fitotoxicidad

Para evaluar si las concentraciones del EAF utilizadas en los ensayos de protección contra patógenos producían algún tipo de daño por toxicidad, se rociaron las plantas con diferentes concentraciones del extracto y posteriormente se mantuvieron en las condiciones de cada ensayo realizando observaciones visuales directas durante 1 semana para evaluar la aparición de manchas o tejido necrosado en las hojas.

IV.2.7 Evaluación de actividad antimicrobiana contra *P. viridiflava* y *B. cinerea*

Se llevó a cabo mediante el ensayo de difusión en agar (Parente y Hill, 1992): sobre el medio sólido utilizado para cada microorganismo (LB, para la bacteria y APG, para el patógeno fúngico) se colocaron 10 y 50 μL de diluciones sucesivas del EAF realizadas a partir de una concentración de 0,1 g PF/mL, para la bacteria y el hongo, respectivamente y se dejó difundir en flujo laminar. Posteriormente se cubrió con una suspensión de 10^7 UFC/mL en medio blando (0,7% (v/v) de agar) para la bacteria, y de 10^5 esporas/mL para el hongo. Como control negativo de inhibición se utilizó una solución de jugo de limón al 5%. Se realizaron 3 repeticiones por placa. Las placas se incubaron durante 24 y 48 hs para la bacteria y el hongo, respectivamente. La actividad antibiótica se estimó con la observación de zonas sin crecimiento alrededor de los puntos de siembra (halos de inhibición del crecimiento) y se estimó la CIM en g PF/mL.

IV.2.8 Tratamiento con el EAF

Para evaluar si el EAF era capaz de proteger a las plantas de infecciones posteriores, se realizaron aplicaciones con concentraciones subinhibitorias del extracto para los patógenos utilizados y luego se desafiaron las plantas tratadas (ensayos preventivos), de acuerdo a como se describe a continuación:

- Pre-tratamiento. Todas las partes aéreas de las plantas fueron rociadas con el EAF hasta punto de goteo con una concentración subinhibitoria para el patógeno en estudio. Las plantas fueron mantenidas en condiciones controladas óptimas para su crecimiento.
- Inoculación con el patógeno. Al cabo de 1 o 4 días posteriores al tratamiento con el EAF, se realizó la inoculación con *P. viridiflava* o *B. cinerea*, como se describió anteriormente.
- Controles del ensayo utilizados:

- Control de infección: plantas rociadas con agua o agua/limón e inoculadas con los patógenos.

- Control de inducción de defensa: plantas pre-tratadas con una concentración subinhibitoria de HeT (0,03 mg/mL), HgT (0,02 mg/mL) puros o un inductor comercial, Bion 500 (Syngenta) 0,4mg/mL, y posteriormente inoculadas.

- Control negativo: plantas tratadas con agua, sin inocular.

El número de plantas para cada ensayo se indica en el pie de figura en la sección resultados.

IV.2.9 Detección de especies reactivas del oxígeno

Se realizó la detección del radical superóxido mediante la reacción de reducción del “Nitroblue tetrazolium” (NBT) la cual resulta en la formación de un precipitado azul de formazán, según se describe en Doke, (1983). Para este análisis se cortaron 3 hojas de cada planta a las 2, 4 y 6 horas posteriores al tratamiento (hpt) con el EAF y se sumergieron en una solución de NBT (0,1 %) preparada con azida sódica 1 mM, en “buffer” Fosfato de Potasio (KH_2PO_4 - K_2HPO_4 , 10 mM, pH 7,8). Las hojas sumergidas en estas soluciones se colocaron en una cámara a la que se le aplicó 1 min de vacío (100 mm Hg) dos veces y se mantuvieron en oscuridad durante 1 hora. Luego las hojas fueron decoloradas mediante lavados con etanol 95% y clarificadas con ácido láctico/glicerol/ H_2O (3/3/4).

IV.2.10 Extracción de compuestos fenólicos

Para el análisis de los compuestos fenólicos solubles se cortaron hojas de cada planta a diferentes tiempos (0, 1 y 4 días posteriores al tratamiento) y se guardaron en freezer a -70°C hasta el momento de la determinación. Se tomó una sola muestra por planta para evitar efectos por el corte. Las hojas fueron trituradas y sometidas a una extracción con 10 mL de metanol al 80% por cada 1 g de tejido fresco, con agitación y en oscuridad durante 1 hora.

La cuantificación de compuestos fenólicos totales se realizó mediante el método de Folin-Ciocalteu con las modificaciones según Seong Soo y col., (2010). Los extractos se colocaron en una placa de microtítulo de 96 pocillos conteniendo agua destilada hasta obtener la concentración deseada. Luego se agregó el reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma) y una solución acuosa de Ca_2CO_3 20 % (p/v). La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 20 min. Finalmente se midió absorbancia a

620 nm en un lector de placas de microtítulo (Appliskan, versión 1437). El total de fenólicos se calculó usando una curva de calibración establecida con una solución estándar de ácido gálico y se expresó como miligramos de equivalentes de ácido gálico por gramo de tejido fresco (mg GAE/g PF).

IV.2.11 Visualización de la deposición de calosa

Para visualizar la deposición de calosa, se cortaron 3 hojas por planta, las cuales fueron decoloradas en etanol 95% y tratadas de acuerdo a un método estándar (Currier y Strugger, 1956). Se realizó una hidratación por etapas sucesivas de 30 min en cada una de las siguientes soluciones: etanol 50%, etanol 25% y K_2HPO_4 67 mM (pH 12). Posteriormente se efectuó la tinción con azul de anilina (Sigma) al 0,05% durante 1 hora en oscuridad. Las muestras fueron colocadas en portaobjetos con la cara adaxial hacia arriba, montadas con glicerina 30% y se analizaron por microscopía de fluorescencia con luz UV (Microscopio Olympus BX51, filtro U-MWU2). Las fotografías fueron tomadas con una cámara conectada al microscopio.

IV.2.12 Análisis estadístico

El análisis estadístico para el recuento de UFC y cuantificación de fenólicos totales fue llevado a cabo usando el programa InfoStat, version 2013 (Di Rienzo y col., 2013). Las diferencias entre los promedios fueron evaluadas mediante el test LSD (valor $p \leq 0,05$).

IV.2.13 Análisis de expresión génica

IV.2.13.1 Extracción de ARN

La evaluación de la expresión de genes que se pudieran inducir por efecto del tratamiento con el EAF se realizó mediante PCR en tiempo real, midiendo los niveles del ARN mensajero de genes marcadores de la defensa seleccionados previamente.

Para la extracción de ARN, se colectaron hojas de *A. thaliana* las 1, 3, 6, y 24 hpt con el EAF e inmediatamente molidas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C hasta su utilización. El ARN total fue extraído con Trizol (Invitrogen), que contiene 38% fenol saturado, 0,8 M tiocianato de guanidina, 0,4 M tiocianato de amonio, 0,1 M acetato de sodio y 5 % glicerol, de acuerdo a las instrucciones del fabricante, y como se describe a continuación: 150 mg de tejido vegetal se homogeneizó con 1 mL de trizol, se incubó a -20°C durante 24 hs y se adicionaron 300 μL de cloroformo-isoamilico

(24:1). Las muestras se mezclaron con vortex durante 15 segundos, y se centrifugaron a 10.000 g (máxima velocidad), a 4°C durante 20 min. La fase superior conteniendo el ARN total (500 µL) se transfirió a un nuevo tubo de microcentrifuga, cuidando de no arrastrar la interfase (ADN), se adicionaron 500 µL de isopropanol mezclando manualmente por inversión y se incubó a -20°C por 30 min. Se centrifugó a máxima velocidad y en frío durante 20 min y se eliminó el sobrenadante. El pellet fue lavado con etanol 75% pre-enfriado a 4°C, se centrifugó a velocidad máxima en frío durante 15 min y se eliminó el etanol. Se dejó secar el pellet y se resuspendió en 40 µL de agua libre de RNAsas.

Para purificar el ARN total se trataron las muestras con DNAsa I (Promega), para eliminar el ADN genómico que podría quedar luego de la extracción. Para ello a 17 µL del ARN stock se agregó 1 µL de DNAsa I (1U/µL) y 2 µL del Buffer 10x (100 mM Tris-HCl, pH 7,5 25 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂) se mezcló y se incubó a 37°C durante 30 min, luego se detuvo la reacción por la adición de 2 µL de EDTA 0,5 M y se inactivó la DNAsa I por incubación a 65°C durante 10 min.

La calidad del ARN extraído fue determinada espectrofotométricamente mediante un Nanodrop (Biophotometer Plus, Eppendorf), determinandolas absorbancias a 230, 260 y 280 nm. Solo aquellas muestras con una relación A_{260}/A_{280} (ARN/proteínas) entre 1,8 – 2,0 fueron procesadas (grado de pureza aceptable). La integridad del ARN quedó confirmada por electroforesis en gel de agarosa al1%.

IV.2.13.2 Retrotranscripción

Posteriormente, se realizó la síntesis de la hebra de ADN (cADN) complementario al ARNm, usando la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Thermo Scientific), según las instrucciones del fabricante. A continuación queda resumido el protocolo para la síntesis de cADN.

Retrotranscripción PARTE I:

- ARN (no más de 5 µg totales en masa)
- 2 µL de oligodT (solución madre 0,25 µg/µL)
- Agua estéril libre de RNAsas hasta un volumen final de 12,5 µL

Incubar la mezcla 5 min a 65°C y luego 5 min en hielo

Retrotranscripción PARTE II: A cada tubo de la PARTE I, se le agrega:

- 4 µL de solución tampón MMLV

- 2 μL de solución de DNTPs (10 mM)
- 0,5 μL del inhibidor de RNasas (20 U)
- 1 μL de enzima MMLV (200 U)

Se incuban los tubos por 1 hora a 42°C y luego por 10 min a 70°C, para cortar la actividad de la enzima.

IV.2.13.3 PCR cuantitativa en tiempo real

Todos los experimentos de PCR cuantitativa en tiempo real se realizaron en el equipo Mini Opticon Real Time PCR System (BioRad).

Mezcla de reacción de qRT-PCR

- 12,5 μL de Mix (iQ SYBR Green Supermix, BioRad)
- 5,5 μL de agua estéril
- 2 μL de mezcla de cebadores (solución mezcla: 5 μM de cebador directo y 5 μM cebador reverso)
- 5 μL de cDNA dilución 1:10
- Volumen final de reacción: 25 μL

Programa

1 ciclo de 10' a 95°C	
15'' 95°C	} 40 ciclos
30'' 60°C	
40'' 72°C	

El factor de elongación 1 (EF1) fue usado como gen de referencia interna por su expresión constitutiva. Los cebadores usados en estos ensayos se detallan en la Tabla 4.

Los datos de fluorescencia crudos se obtuvieron del ciclador StepOne Plus y la eficiencia de amplificación para cada gen fueron calculadas usando el “software LinReg PCR” (Ramakers y col., 2003). El gen EF1 fue utilizado para estandarizar la expresión de los genes blanco; luego se calculó una relación entre tratamientos usando el algoritmo desarrollado por Pfaffl (2001). La determinación del grado de inducción de un gen y el análisis estadístico se realizaron mediante el “Software FgStatistics” (Di Rienzo, 2011) (valor $p \leq 0,05$, están indicadas con asteriscos).

Tabla 4: Cebadores utilizados para el análisis mediante PCR en tiempo real en plantas de *A. thaliana*

Gen	Cebador directo(5'3')	Cebador reverso(5'3')
EF1 (At1g18070)	AGCACGCTCTTCTTGCTTTC	GGGTTGTATCCGACCTTCTTC
PR1 (At2g14610)	GTCTCCGCCGTGAACATGT	CGTGTTGCGAGCGTAGTTGT
PDF1.2 (At5g44420)	TTTGCTTCCATCATCACCCCTTA	GCGTCGAAAGCAGCAAAGA
PR4 (AT3G04720)	ATCATACACAGTGGCTACG	TGCTCTGACAGTTGTTGG
VSP1 (AT5G24780)	CGTCCAGTCTTCGGCATCC	TCTAAGAGTTCGGCTTCGTTCC
PR2 (AT3G57260)	CTCACCACCAATGTTGATGATTCTTCTCAG	GATGGACTTGGCAAGGTATCGCCTAG

IV.3 RESULTADOS

IV.3.1 Optimización de la producción de plantas de *A. thaliana*

Fue de nuestro interés incorporar a *Arabidopsis thaliana* en este trabajo, ya que es por excelencia la planta modelo ideal para estudiar la fisiología, el desarrollo, la ecología, y la genética de plantas con mayor facilidad y rapidez respecto a especies vegetales de interés comercial.

Arabidopsis es una planta anual que completa su ciclo en un período corto, aunque existen variaciones entre cultivares. Una vez que la semilla de *Arabidopsis* germina aparecen dos hojitas redondeadas. Desde la germinación *Arabidopsis* inicia su primer período de crecimiento (vegetativo) en el cual se va formando una roseta de hojas que se van disponiendo en espiral, donde las hojas de mayor edad se disponen en la periferia de la roseta. La edad de las plantas utilizadas para los ensayos realizados en el presente trabajo de tesis fueron de 4 semanas debiendo las mismas estar en crecimiento vegetativo.

Por tal motivo y considerando que en nuestro laboratorio no estaba optimizado el cultivo y producción de plantas de *A. thaliana*, fue necesario ajustar las condiciones y la metodología para producir y multiplicar plantines adecuados para los ensayos. Se ensayaron 5 protocolos diferentes (A, B, C, D y E) definidos en la sección IV.2.1, y estos se evaluaron en base a la apariencia de las plantas, porcentaje de germinación (G) y supervivencia de plántulas (S) a la cuatro semanas desde la siembra. En la Tabla 5, se observan los resultados obtenidos con cada protocolo.

Tabla 5: Resultados obtenidos de la evaluación de cinco protocolos para la producción de plantas de *A. thaliana*

PROTOCOLO	G(%)	S(%)	OBSERVACIONES
A	99	80	Período de crecimiento vegetativo corto (inferior a 4 semanas) con inducción temprana de floración.
B	99	100	Plantas vigorosas con crecimiento adecuado.
C	90	90	Plantas muy pequeñas y cloróticas.
D	30	80	Contaminación del sustrato.
E	90	100	Plantas muy pequeñas.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se determinó que el protocolo B permitió obtener los valores más altos de G y S, además de que las plantas fueron de buena calidad para la realización de los ensayos posteriores. La Figura 10 resume las etapas del protocolo elegido.

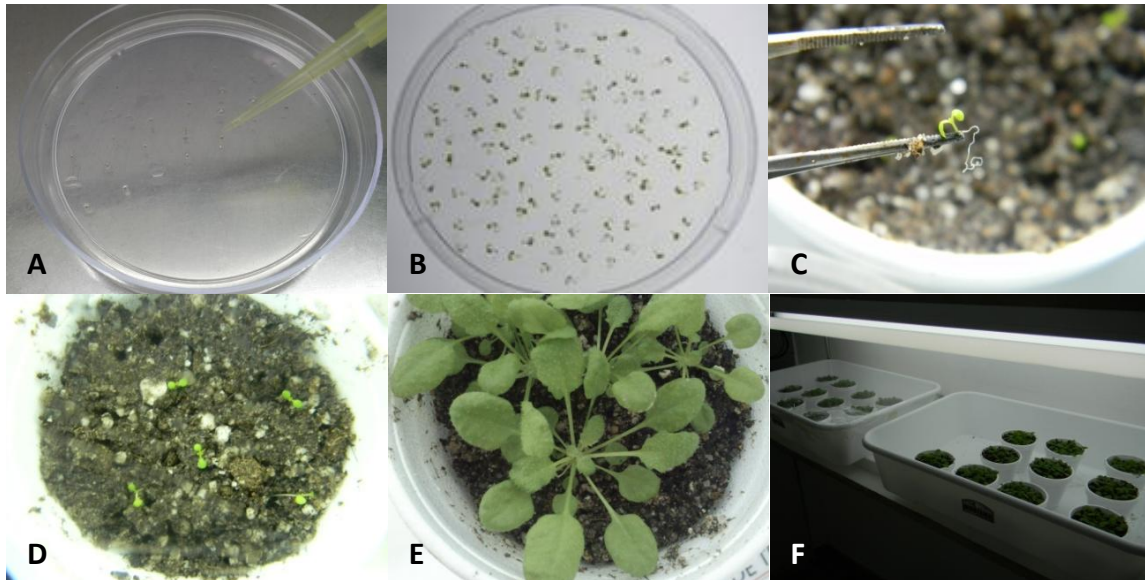


Figura 10: Esquema de producción de plantas de *Arabidopsis thaliana* en laboratorio. A- siembra *in vitro* de semillas en medio MS sólido. B- plántula geminadas en medio MS sólido. C- aspecto de la plántula al momento del trasplante a sustrato. D- adaptación de las plántulas a sustrato a los 7 días del trasplante. E- plantas de tres semanas de transplantadas, en condiciones para ser utilizadas en los ensayos; F- vista de la cámara de cría para *A. thaliana* en la EEAOC.

IV.3.2 Optimización de patosistemas en *A. thaliana*

Para evaluar la capacidad del extracto de frutilla (EAF) como inductor de la defensa en *A. thaliana* fue necesario optimizar protocolos de infección bajo condiciones controladas en laboratorio. Para ello, se evaluaron tres patógenos con diferentes estilos de vida: dos bacterias biotróficas, *Pseudomonas viridiflava* (Pvalb8) y *Xanthomonas campestris* (8004), y un hongo necrotrófico, *Botrytis cinerea* (B1). Estos patosistemas han sido ampliamente usados para descifrar la resistencia a enfermedades en *Arabidopsis* (Glazebrook, 2005; Sanchez y col., 2012).

En el caso de las infecciones con bacterias se ensayaron tres concentraciones de inóculo 10^6 , 10^8 y 10^{10} UFC/mL. La infección se realizó por asperjado de toda la planta y 3 días posteriores se realizó el recuento de bacterias viables en el tejido. En las plantas infectadas con *P. viridiflava*, los síntomas comenzaron a observarse a partir del 2° día

posterior a la inoculación (dpi), observándose manchas translúcidas acuosas que desarrollaron en lesiones cloróticas y finalmente necróticas a los 5 dpi (Figura 11), síntomas que coinciden a los descritos para la infecciones de *P. viridiflava* en plantas de *A. thaliana* (Jakob y col., 2002). También se observó que la severidad de los síntomas aumentó con la concentración del inóculo.

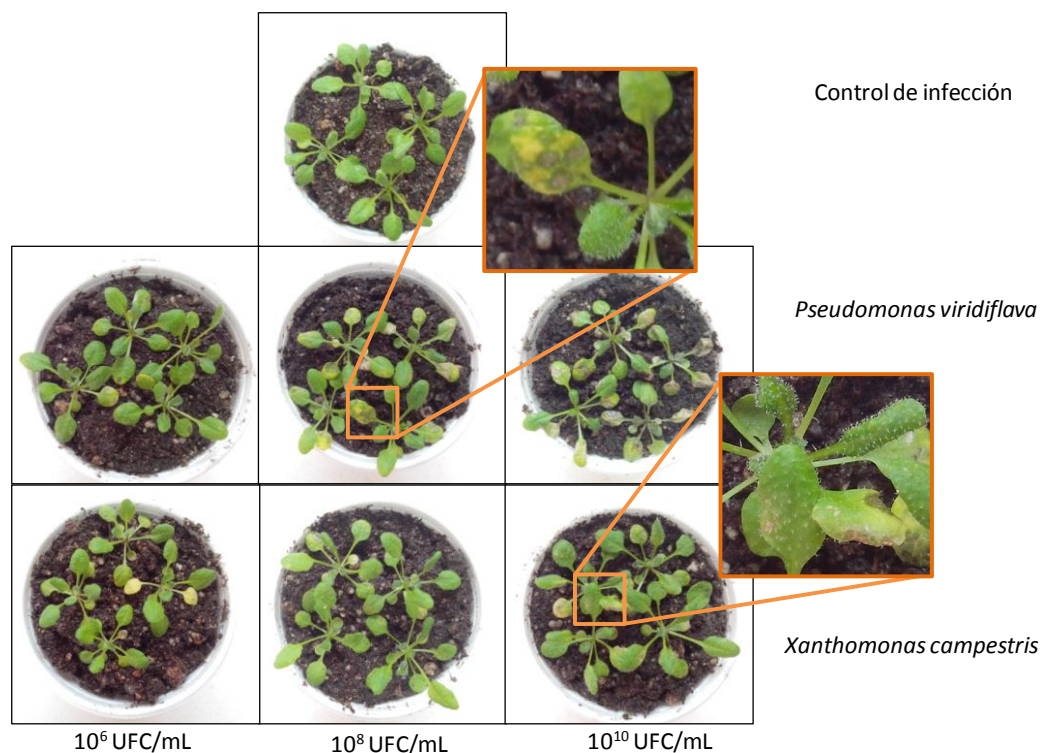


Figura 11: Síntomas producidos por las infecciones de *P. viridiflava* y *X. campestris* en plantas de *Arabidopsis thaliana*. En el “zoom” se observa un detalle de los síntomas de la enfermedad a los 5 dpi.

El recuento de las UFC realizado a partir de las plantas infectadas con *P. viridiflava* a los 3 dpi arrojó valores promedios de 9,4, 10,4 y 11,7 log UFC/g de tejido, correspondientes a un inóculo inicial de 10^6 , 10^8 y 10^{10} UFC/mL, respectivamente (Figura12).

Las inoculaciones con *X. campestris* no resultaron exitosas en ninguna de las condiciones ensayadas. Las infecciones no fueron reproducibles con las dos concentraciones más bajas de inóculo (10^6 y 10^8 UFC/mL), las plantas no desarrollaron síntomas ni se recuperaron colonias viables al realizar el conteo de las UFC. Sólo se observaron síntomas con la concentración de 10^{10} UFC/mL, y el conteo de las UFC recuperadas del tejido infectado arrojó un valor promedio de 5,3 log UFC/g de tejido, lo

cual resulta muy bajo si se compara a lo publicado en otros trabajos que utilizan incluso una concentración menor de la suspensión bacteriana para la inoculación (Rigano y col., 2007).

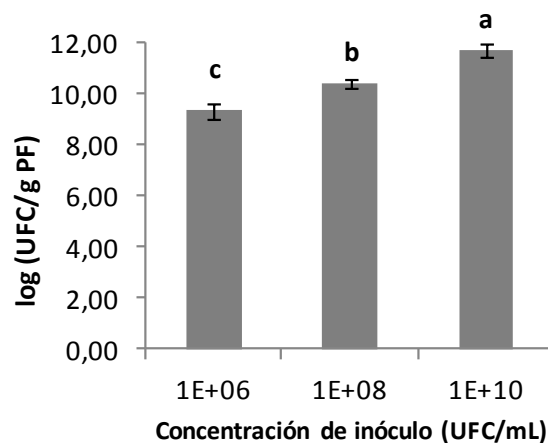


Figura 12: Recuento de la población de *P. viridiflava* en plantas de *A. thaliana* infectadas con distintas concentraciones de inóculo. Los resultados expresados como log (UFC/g PF) son el promedio \pm desvío estándar de tres experimentos independientes (n=5), a los 3 dpi. Letras diferentes indican diferencias significativas con $p \leq 0,05$

De acuerdo a los resultados obtenidos se decidió utilizar a *P. viridiflava* para realizar los ensayos posteriores en *A. thaliana* y se estableció la concentración de inóculo de 10^8 UFC/mL como la más adecuada considerando que fue con la que se obtuvieron síntomas claros, generalizados y de una severidad intermedia a la obtenida con las otras dos concentraciones.

En el caso de la infección con *B. cinerea*, se llevó a cabo el protocolo descrito por L' Haridon y col. (2011), con el que se obtuvieron los síntomas típicos de la enfermedad. A las 24 hs de la inoculación con una suspensión de 5×10^4 conidios/mL, aparecieron lesiones cloróticas en el lugar donde se depositó la gota de inóculo y a las 48 hs estas lesiones se convirtieron en necróticas (Figura 13), momento en el que se midió el diámetro de la lesión como parámetro de evaluación.

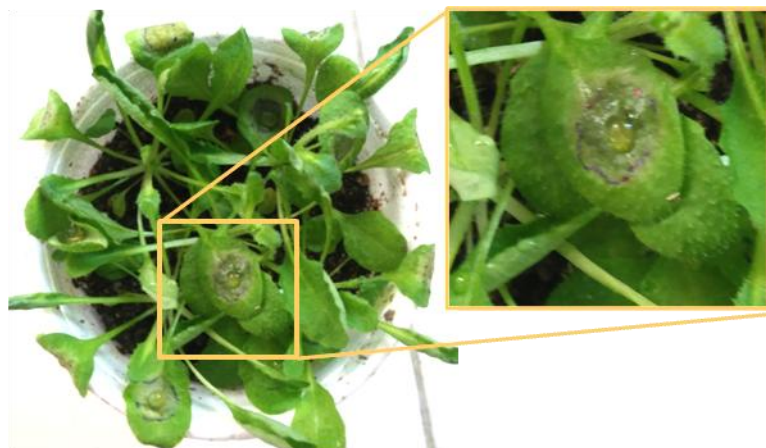


Figura 13: Síntomas producidos por *Botrytis cinerea* en plantas de *A. thaliana* a los 2 dpi.

IV.3.3 Actividad antimicrobiana del EAF contra *P. viridiflava* y *B. cinerea*

Debido a que el objetivo de este capítulo fue determinar si el EAF era capaz de inducir las defensas de *Arabidopsis*, fue necesario determinar previamente las concentraciones subinhibitorias de EAF para cada patógeno, para evitar un efecto antimicrobiano directo.

La actividad antimicrobiana se determinó mediante el ensayo de difusión en agar por el desarrollo de halos de inhibición. El extracto inhibió el crecimiento de *P. viridiflava* alcanzando una CIM igual a 0,025 g PF/mL, sin embargo, no presentó actividad contra *B. cinerea* en ninguna de las concentraciones ensayadas. En la Tabla 6, se detalla el diámetro del halo de inhibición para cada concentración de EAF contra la bacteria.

Tabla 6: Diámetro de los halos de inhibición de EAF sobre el crecimiento *in vitro* de *P. viridiflava*.

Concentración de EAF (g PF/mL)	Halo de inhibición (mm)
0,1	6± 1
0,05	4± 1
0,025	2± 1
0,012	-
0,006	-

IV.3.4 Evaluación de la fitotoxicidad de EAF

A. thaliana es una planta muy sensible a diferentes tipos de estrés. Por lo tanto, para evaluar la actividad del extracto, fue necesario previamente determinar que la dosis del mismo no tuviera efectos fitotóxicos. Se ensayaron distintas concentraciones de EAF rociando la parte aérea de las plantas. A las 24 hs de la aplicación del extracto, aparecieron lesiones necróticas irregulares en las hojas tratadas con las concentraciones iguales o superiores a 0,025 g PF/mL, siendo muy marcadas con la concentración más alta (0,1 g PF/mL) (Figura 14). En base a este resultado y a los de actividad antimicrobiana contra *P. viridiflava*, se eligió la concentración de 0,012 g PF/mL para realizar los ensayos de protección inducida con el EAF.



Figura 14: Síntomas de fitotoxicidad producidas por la aplicación del EAF en plantas de *A. thaliana*. La flecha amarilla indica la lesión necrótica provocada por el EAF a las 24 hs de la aplicación.

IV.3.5 Ensayos fitopatológicos para evaluar el efecto de protección de EAF:

-contra *Pseudomonas viridiflava*

Para evaluar si el EAF tenía la capacidad de inducir un efecto protector contra patógenos en plantas de *A. thaliana*, se realizó una única aplicación foliar con el extracto 1 o 4 días antes de la inoculación (dai) con la bacteria patógena, en ensayos independientes. A los 1 y 3 dpi, se realizó el recuento de la población bacteriana en las hojas inoculadas. Como testigo de inducción de defensa se usó el elagitanino aislado de frutilla, HeT (Mamaní y col., 2012) y el galotanino HgT (Filippone y col., 1999). Como control de infección y control del solvente del EAF, se inocularon plantas previamente rociadas con agua, o agua/limón, respectivamente.

En la Figura 15A, se observan los resultados obtenidos en la aplicación del EAF 1dai. Al realizar el primer recuento (1 dpi), los tratamientos con EAF, HeT y HgT

redujeron la población bacteriana en 1 unidad logarítmica en comparación a los controles de infección (plantas rociadas con agua o agua/limón). A los 3dpi, el recuento bacteriano se incrementó en todos los tratamientos, sin embargo las UFC de las plantas tratadas con EAF y HgT fueron significativamente menores con respecto a los controles.

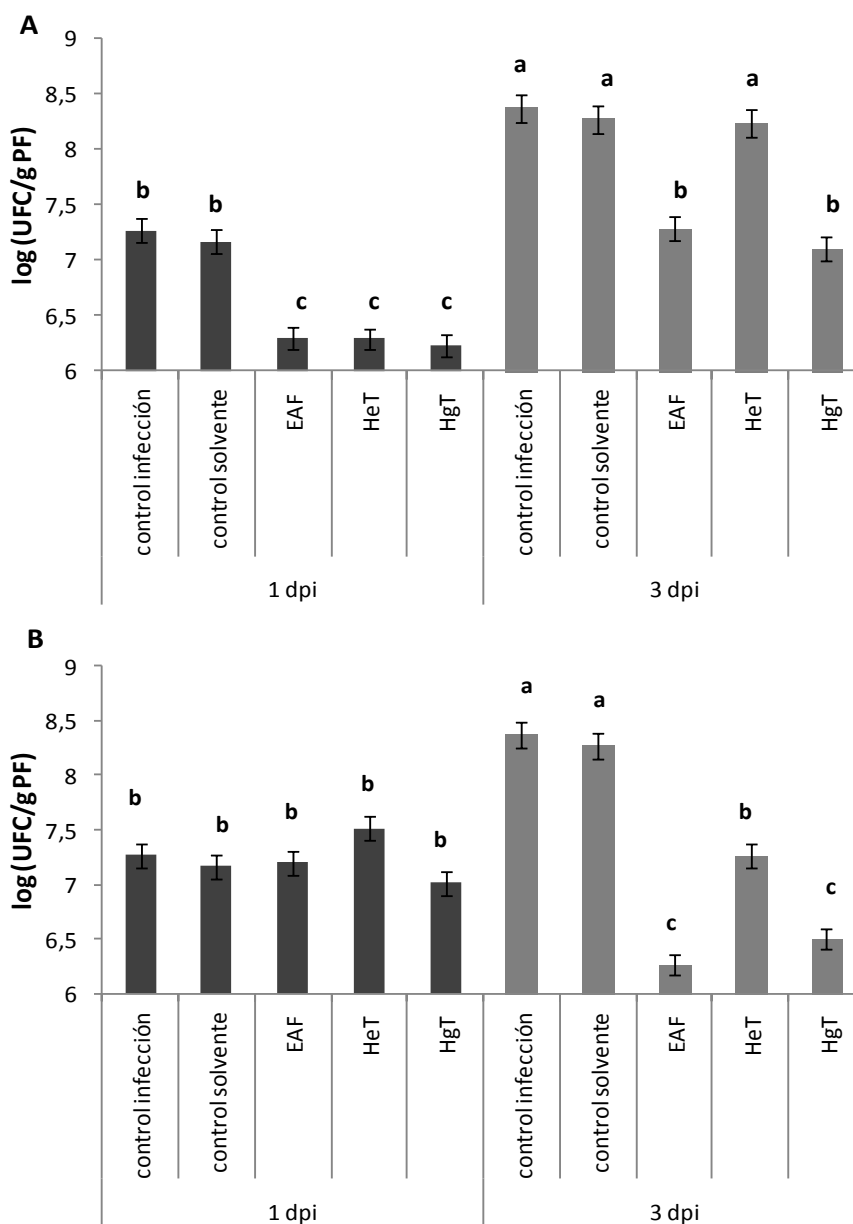


Figura 15: Recuento de bacterias viables en hojas de plantas tratadas con EAF. Las plantas fueron rociadas con EAF, HeT o HgT, 1dai (A) y 4dai (B) con una suspensión de 10^8 UFC/mL de *P. viridiflava*. El recuento de las células viables en el tejido infectado se realizó 1 y 3 dpi. Controles: plantas rociadas con agua (control de infección) o agua /limón (control del solvente), e inoculadas. Los datos obtenidos corresponden al promedio de tres experimentos independientes (n=5) y las barras de error indican el desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas con $p \leq 0,05$

En cambio, cuando el tratamiento con el EAF se aplicó 4 dai (Figura 15B), se observó un comportamiento diferente: en el primer recuento (1dpi) las UFC fueron similares a la de los controles, pero a los 3 dpi se observó una disminución significativa en la población bacteriana en todos los tratamientos con respecto a los controles. Los tratamientos con EAF y HgT fueron los más efectivos, alcanzando valores de UFC de 2 unidades logarítmicas por debajo que la del control de infección o control agua/limón.

En la Figura 16 se muestra la sintomatología de la enfermedad a los 5 dpi en donde se evidencia una clara disminución de las lesiones en las hojas tratadas con EAF a los 4 dai.



Figura 16: Síntomas causados por *P. viridiflava* en hojas de *Arabidopsis thaliana* previamente rociadas con agua/limón (Control) o con EAF a 1 o 4 dai.

-contra *Botrytis cinerea*

Posteriormente se evaluó el efecto protector de EAF en *A. thaliana* contra el hongo necrotrófico *B. cinerea*.

Se realizó el rociado con EAF 1 o 4 dai sobre las hojas de plantas de *A. thaliana* en ensayos independientes. Se evaluó la severidad de la enfermedad producida por *B. cinerea* midiendo el diámetro de la lesión en cada hoja inoculada. Como control de infección y control del solvente del EAF se inocularon plantas de *A. thaliana* rociadas previamente con agua o con agua/limón, respectivamente.

Como testigos de inducción de defensa se utilizaron HeT, HgT, y un inductor comercial que pertenece al grupo químico de los benzothiadiazoles, acibenzolar-S-

metilo Bion 500 (Syngenta), el cual está citado que protege contra enfermedades fúngicas y específicamente contra *Botrytis* sp. (Cole, 1999; Malolepsza, 2006).

En la Figura 17 se muestran los resultados obtenidos cuando los tratamientos se aplicaron 4 dai, en la cual se observa que las aplicaciones de EAF, HgT y Bion500 redujeron significativamente la severidad de los síntomas causados por *Botrytis cinerea* con respecto a los controles de infección y del solvente del EAF, mientras que la disminución de los síntomas no fue significativa en el tratamiento con HeT. En los tratamientos realizados 1 dai no se observaron diferencias con los controles de infección (dato no mostrado).

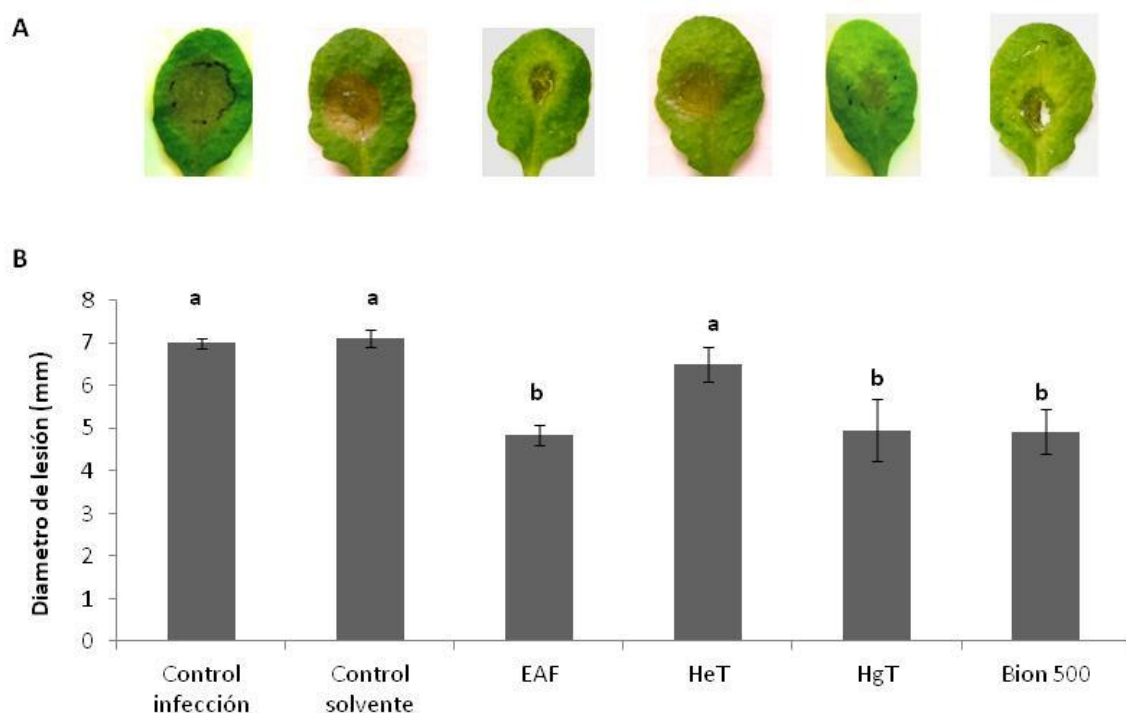


Figura 17: Efecto del tratamiento de EAF contra *B. cinerea*. Plantas de *A. thaliana* de 4 semanas de edad fueron rociadas con el EAF 4 dai y luego inoculadas con una suspensión de *Botrytis cinerea* y el efecto del tratamiento se determinó en base a la presencia y tamaño de las lesiones sobre la hojas. Apariencia (A) y diámetro de las lesiones (B) de *B. cinerea* a los 2 dpi. Los datos obtenidos corresponden al promedio de tres experimentos independientes (n=5) y las barras de error indican el desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas con $p \leq 0,05$.

Si bien la evaluación de la sintomatología según se describe en L'Haridon y col., (2011) resulta uno de los métodos más utilizados, en la Figura 17 se observa que, a pesar de que el diámetro de las lesiones en el tratamiento con HeT no muestra diferencias

significativas con respecto a los controles de infección o de solvente, el síntoma en estos últimos es más severo y evidente.

IV.3.6 Caracterización bioquímica de la respuesta de defensa inducida por EAF

Con el propósito de investigar si el fenómeno de protección contra patógenos observado en plantas tratadas con el EAF se debía a un efecto de inducción de las defensas naturales de la propia planta, se evaluaron los eventos bioquímicos que son reconocidos como marcadores “clásicos” de la respuesta de defensa, como por ejemplo la acumulación de EROs, acumulación de calosa y de compuestos fenólicos totales en hojas de *A. thaliana* tratadas con el extracto.

IV.3.6.1 Producción de especies reactivas del oxígeno

Se evaluó la generación de un estallido oxidativo determinando la acumulación del radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en hojas de *A. thaliana* a diferentes tiempos luego de rociarlas con el EAF, mediante la coloración histoquímica con NBT (nitro-blue-tetrazolium). Los resultados revelaron que en las plantas tratadas con EAF se produjo una acumulación temporal de $O_2^{\cdot-}$ alcanzando su máxima producción a las 4 hpt, la cual disminuyó a las 6 hpt (Figura 18).

En las plantas tratadas con los compuestos puros, HeT y HgT, se observó el mismo comportamiento que en las tratadas con EAF (datos no mostrados). Por el contrario, no se detectó acumulación de $O_2^{\cdot-}$ en las plantas controles rociadas con agua/limón.

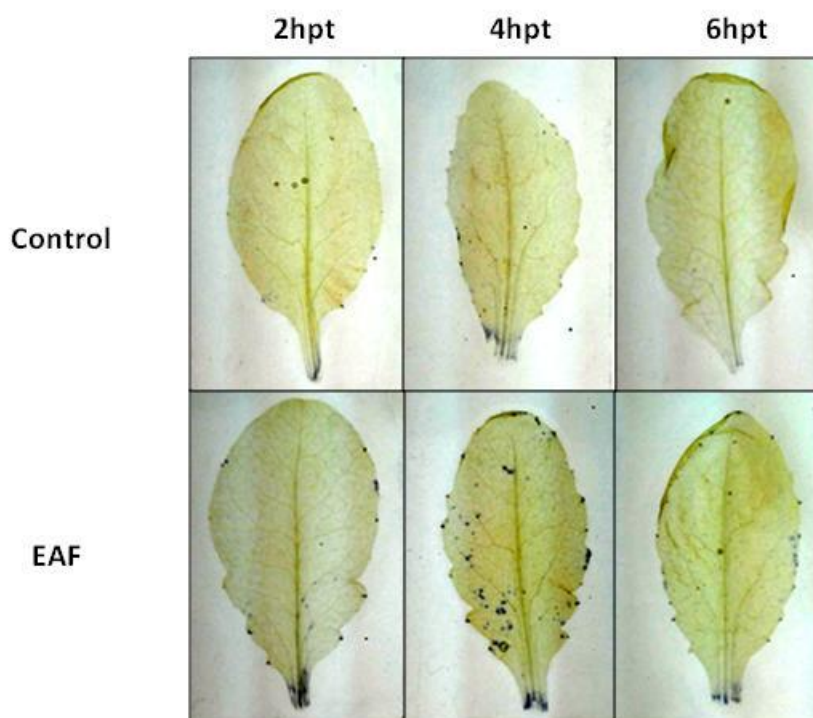


Figura 18: Tinción histoquímica de la acumulación de anión superóxido en *A. thaliana*. Plantas de *A. thaliana* fueron tratadas con EAF y agua/limón (Control) y teñidas con NBT al 0,1% a las 2, 4 y 6 hpt. La producción de superóxido se evidencia por la acumulación de depósitos azules. Se trabajó con tres hojas por planta y se utilizaron tres plantas por cada tratamiento (n=9). El ensayo fue realizado por triplicado de manera independiente con idénticos resultados. Se muestran fotografías representativas de cada tratamiento.

IV.3.6.2 Acumulación de depósitos de calosa

La acumulación de calosa es otro de los marcadores bioquímicos de defensa más estudiados, y ocurre con el propósito de reforzar la pared celular tanto en los sitios de ingreso del patógeno como en tejidos distantes al sitio de penetración (Benhamou y col., 1996, 1998). Se evaluó la acumulación de depósitos de calosa mediante tinción y visualización en un microscopio de fluorescencia como puntos brillantes, en plantas tratadas con el EAF y en plantas tratadas con los compuestos bioactivos puros. La Figura 19 muestra que, a diferencia del control (agua/limón) en donde no se observaron puntos brillantes, sí se observaron en las plantas tratadas con EAF y los compuestos puros siendo mucho más abundantes en las tratadas con el HgT.

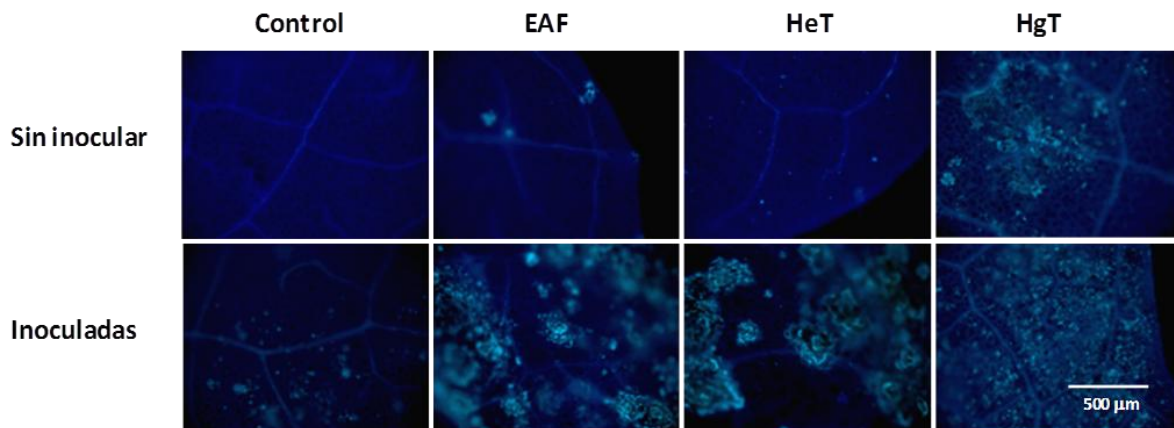


Figura 19: Detección de depósitos de calosa. Mediante la tinción con azul de anilina, la acumulación de calosa se visualiza por puntos brillantes utilizando microscopía de fluorescencia. Se tiñeron hojas de plantas de *A. thaliana* pretratadas con agua/limón, EAF, HeT o HgT sin inocular o inoculadas con *P. viridiflava*. Se colectaron tres hojas por planta, utilizando tres plantas por tratamiento (n=9). Las microfotografías representan los resultados obtenidos en tres experimentos independientes.

En Mamaní y col., (2012) se describe que el HeT produce acumulación de calosa en hojas frutilla, y que esta acumulación es mucho mayor en plantas tratadas y posteriormente inoculadas con un patógeno virulento. De acuerdo a este antecedente, las plantas de *Arabidopsis* tratadas con el EAF fueron posteriormente inoculadas con *P. viridiflava*. En la Figura 19 se observa que todos los tratamientos mostraron un marcado incremento de los puntos brillantes, en comparación a las plantas no inoculadas, o a las plantas controles tratadas con agua.

IV.3.6.3 Cuantificación de fenólicos totales

Otro de los eventos bioquímicos asociados a la defensa en las plantas es el aumento en la concentración de compuestos fenólicos, los cuales, desde el punto de vista de la inmunidad vegetal pueden tener actividad antimicrobiana directa sobre los patógenos, contribuir al fortalecimiento de la pared de las células vegetales, o pueden actuar como componentes de la señalización (Bartwal y col., 2013). Por ésta razón, se evaluó la cantidad de compuestos fenólicos totales presentes en hojas de plantas de *A. thaliana* tratadas con EAF o agua/limón, a 0, 1 y 4 días posteriores al tratamiento (dpt), siguiendo la técnica colorimétrica de Folin-Ciocalteu (Singleton y col., 1999). Los resultados de la Figura 20 muestran que la aplicación de EAF en plantas de *A. thaliana*, indujo la acumulación de compuestos fenólicos totales en hojas con respecto a las

plantas controles rociadas con agua/limón, en todos los tiempos evaluados. El incremento respecto al control fue de 67 % y 73 % a 1 y 4 dpt, respectivamente.

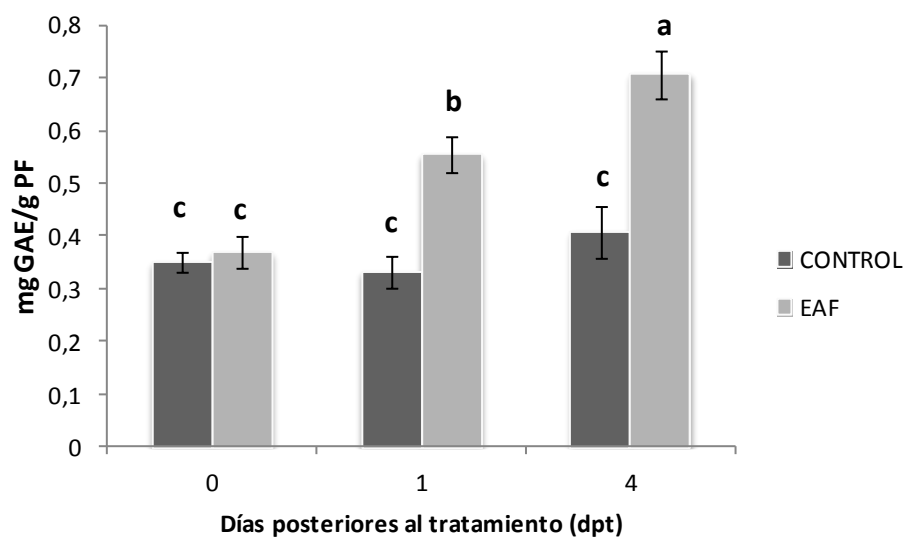


Figura 20: Contenido de compuestos fenólicos totales en hojas de *A. thaliana*. Se utilizaron hojas de plantas tratadas con el EAF recolectadas a los 0, 1 y 4 dpt. El contenido de compuestos fenólicos totales se determinó mediante el método Folin-Ciocalteu, expresando los resultados como mg GAE/g PF \pm desvío estándar. Control: plantas rociadas agua/limón. Letras diferentes indican diferencias significativas con $p \leq 0,05$. Se realizaron tres experimentos independientes, colectando cuatro hojas por planta, de un total de tres plantas por tratamiento (n=12).

IV.3.7 Caracterización molecular de la respuesta de defensa inducida por EAF en *A. thaliana*

Los resultados presentados hasta aquí serían evidencia de que el efecto de protección contra patógenos observado en plantas de *A. thaliana* tratadas con EAF, estaría asociado a la activación de los mecanismos de defensa naturales de la planta. Para aportar más evidencias a este supuesto, se evaluó la expresión de distintos genes marcadores de las principales vías de señalización de las respuestas de defensa en las que participan el ácido salicílico (AS), ácido jasmónico (AJ) y etileno (ET), tales como el gen *PR1* (AS), *PDF1.2* (AJ/ET), *VSP1* (AJ), *PR2* (ET) y *PR4* (ET). Para ello, plantas de *A. thaliana* fueron tratadas con EAF y se recolectaron muestras de hojas a diferentes tiempos (1, 3, 6 y 24 hpt). El control positivo consistió en plantas tratadas con el inductor comercial Bion 500, y como control negativo plantas rociadas con agua/limón. Mediante PCR cuantitativa en tiempo real, se cuantificaron los niveles de expresión

relativa de los genes indicados anteriormente, con respecto a la de los controles negativos para cada tiempo analizado.

En general se observa que EAF indujo todos los genes analizados, aunque con diferentes niveles de expresión en el tiempo. La Figura 21 muestra una expresión más temprana de los genes relacionados con las vías del AJ y ET. Así por ejemplo a tiempos muy tempranos (1 hpt) se inducen los genes *VSP1* y *PR4*, y a las 3 hpt los genes *PDF1.2* y *PR2*.

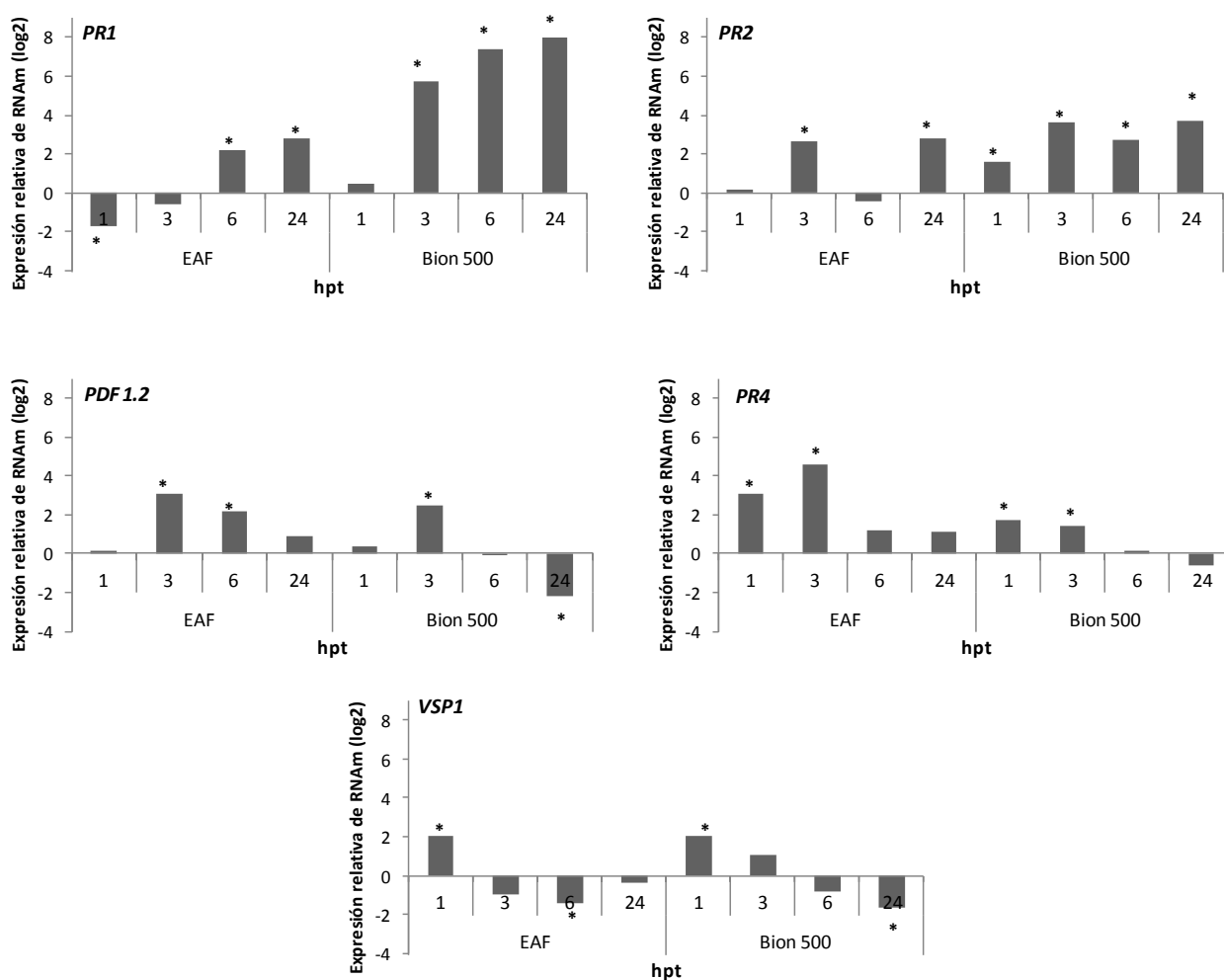


Figura 21: Expresión cuantitativa de genes marcadores de las vías del AS, AJ y ET en plantas de *A. thaliana* tratadas con EAF. Expresión relativa de cada gen evaluado en las plantas tratadas con EAF con respecto a plantas controles rociadas con agua/limón, la cual está normalizada con respecto al gen de referencia EF1 (factor de elongación). Las barras representan valores promedios a partir de dos ensayos independientes con tres replicas biológicas para cada tratamiento (n=3). Los asteriscos indican diferencias significativas entre el control y las plantas tratadas con EAF, calculado mediante el programa LinReg ($p < 0,05$). Hay sobreexpresión génica por arriba de 0 y subexpresión por debajo de 0.

En cambio, la expresión de *PR1* comienza a incrementarse recién a las 6 hpt, momento a partir del cual disminuye la expresión de los genes de las vías del JA y ET analizados. En particular, el gen *PR2* muestra dos picos de inducción, uno temprano a las 3 hpt y otro tardío a las 24 hpt.

El control positivo de inducción con Bion 500 mostró en general, un perfil de expresión similar al EAF, aunque particularmente el Bion 500 indujo mayores niveles de expresión del gen *PR1* (3 veces más), mientras que el EAF incrementó 2,5 veces la expresión del gen *PR4* con respecto al tratamiento con Bion 500.

IV.4 DISCUSIÓN

En el tercer capítulo de este trabajo se describe la optimización de un protocolo que permite la obtención de un extracto en el que se encuentran presentes al menos dos compuestos fenólicos previamente caracterizados en nuestro grupo de trabajo como inductores de la defensa vegetal: HeT y HgT. Este extracto enriquecido en ambos compuestos, denominado como EAF, con actividad antimicrobiana *in vitro*, fue evaluado en cuanto a sus propiedades inductoras de la defensa vegetal utilizando a la especie *A. thaliana*, ya que es un sistema modelo en biología vegetal.

En este capítulo se demostró que el EAF aplicado sobre plantas de *A. thaliana*, mejoró el comportamiento frente a las enfermedades producidas por *B. cinerea* y *P. viridiflava*, dos patógenos con estilos de vida diferentes, y que ésta protección no estaría asociada a un efecto directo del EAF sobre los patógenos, considerando que se utilizaron concentraciones subinhibitorias del extracto. Distintas evidencias se pudieron reunir para comprobar que el EAF activó las defensas naturales de la propia planta, como por ejemplo la ocurrencia de un estallido oxidativo a las 4 hs posteriores a la aplicación del EAF, lo cual es una de los eventos mayormente asociados con la activación de las respuestas de defensa que se disparan en forma temprana durante la interacción de las plantas con un patógeno o elicitador (Leborgne-Castel y col., 2008; Liu y col., 2010). La acumulación de compuestos de bajo peso molecular como los compuestos fenólicos y la síntesis y acumulación de calosa, eventos relacionados con un reforzamiento de las defensas químicas y físicas, respectivamente, también fueron inducidos por el efecto de la aplicación del EAF sobre las hojas de *Arabidopsis*. En particular la acumulación de calosa observada en las plantas tratadas con el EAF, se incrementó en forma muy marcada cuando las plantas pretratadas fueron posteriormente inoculadas con un patógeno virulento. Este comportamiento podría estar asociado a lo que se conoce como “memoria del estrés”, mecanismo por el cual las plantas tras sobreponerse a un primer episodio de estrés (primer estímulo) desarrollan resistencia o tolerancia más adecuada y a un menor costo a sucesivos episodios de estrés (un patógeno, plaga, calor, etc). Este fenómeno también conocido como “priming” puede ser inducido en las plantas mediante la aplicación de algunas moléculas químicas no tóxicas. En este tipo de resistencia no hay pérdida de energía, por lo que el rendimiento del cultivo no se afecta como consecuencia de los tratamientos (Aranega-Bou y col., 2014).

Las evidencias bioquímicas que relacionan al efecto protector del EAF contra la enfermedad, con la inducción de la defensa vegetal, fueron reforzadas al evaluar la expresión de algunos genes marcadores de las vías metabólicas en las que participan el ácido salicílico (AS), ácido jasmónico (AJ) y el etileno (ET), las tres principales fitohormonas responsables de varias respuestas de defensa contra patógenos. Se ha descrito que existe un mecanismo de “crosstalk” entre las diferentes vías para asegurar una máxima eficiencia en la detención de los patógenos minimizando el gasto energético (Koorneef y col., 2008; Pieterse y col., 2009).

Mediante PCR cuantitativa en tiempo real se pudo ver que el tratamiento con EAF en la planta de *Arabidopsis* induce genes involucrados en la vías de señalización de las tres fitohormonas: AS, AJ y ET, pero temporalmente diferentes. Así por ejemplo de manera temprana (1 hpt) se inducen genes involucrados en las vías del AJ y ET y los de la vía del ET se mantienen inducidos incluso hasta las 24 hpt. En cambio, los genes analizados que participan en la vía del AJ, se reprimen a partir de las 3 hpt. En lo que respecta al AS, se analizó el gen *PR1*, uno de los principales componentes que regulan la señalización de esta vía, el cual se induce un poco más tarde que los de las otras dos vías, a las 6 hpt y aumenta hacia las 24 hpt. Aunque está descrito el antagonismo entre las vías metabólicas del AS y el AJ/ET, existen muchos casos que muestran que tal antagonismo no es absoluto (Mur y col., 2006), como es el caso de los ramnolipidos (Sanchez y col., 2012) y el elicitor fúngico AsES (Hael-Conrad y col., 2015).

Existen inductores químicos, que son compuestos fenólicos análogos al AS, capaces de activar la resistencia sistémica adquirida (SAR), tales como el ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA) y el ácido benzotiadiazol (BTH) (Oostendorp y col., 2001; Conrath y col., 2002; Aranega-Bou y col., 2014). Además, algunos flavonoides, como la quercetina (Jia y col., 2010) y la rutina (Yang y col., 2016) inducen defensa contra patógenos biotróficos en *Arabidopsis*, por una vía dependiente del AS. Sin embargo no existen reportes de fenólicos que induzcan las vías del JA/ET.

Con respecto al grupo de los taninos, solo se ha reportado su participación en la defensa contra herbívoros mediante su capacidad de interactuar y precipitar diferentes moléculas, incluyendo las proteínas (Haslam, 2007) o porque tienen un efecto negativo vía oxidación en el intestino medio del insecto (Barbehenn y Constabel, 2011). Moctezuma y col., (2014) demostraron que este grupo de compuestos pueden estar preformados o inducidos por el daño producido por un insecto. En nuestro grupo, hemos comprobado la actividad inductora de la defensa vegetal de los taninos HeT y HgT.

Mamaní y col., (2012) demostraron que el AS está involucrado en la defensa inducida por HeT, por lo que al estar presente este compuesto en el EAF, era de esperar que esta vía se haya inducido por el tratamiento con el extracto. Si bien no existen reportes previos en cuanto a las vías metabólicas involucradas en la defensa inducida por el otro compuesto central del EAF, el HgT, los resultados aquí obtenidos, hacen pensar que este compuesto podría ser el responsable de la activación de las vías de ET y JA. Sin embargo, se necesitan realizar ensayos con este compuesto puro, para poder confirmar esta hipótesis.

En general, existen evidencias que relacionan al AS como intermediario en la activación del sistema de defensa de las plantas contra el ataque por patógenos biotróficos y hemibiotróficos (patógenos que mantienen vivas las células de sus hospederos mientras se establecen en el tejido, y solo después de esta fase, cambian a un estilo de vida necrotrofico). Por el contrario, el AJ y el ET se asocian con la defensa ante el ataque por patógenos necrotroficos (patógenos que no poseen estructuras de nutrición especializadas, y que obtienen los nutrientes de células muertas, por lo que producen la muerte de las mismas desde el principio de la infección) ó contra insectos herbívoros. Esto podría explicar de alguna manera el efecto de protección que mostró el tratamiento con el EAF contra *Botrytis cinerea* (necrotrofico) y contra *Pseudomonas viridiflava* (biotrofico). Se ha comprobado que ciertos patógenos de naturaleza fúngica tales como *B. cinérea* o *Alternaria*, son insensibles al establecimiento de la SAR, dichos patógenos son sensibles a un mecanismo de resistencia inducida diferente a SAR, que es independiente de la inducción de PR (Thomma y col., 2001, Ton y col., 2002) y por lo tanto de las defensas en las que participa el AS. Este tipo de resistencia se conoce como resistencia sistémica inducida (ISR) (Van Loon y Pieterse, 2002), la cual se activa frente a un amplio espectro de hongos y bacterias, pero a diferencia de la SAR, no es activa contra virus. El establecimiento de la SAR requiere la previa acumulación de ácido salicílico, mientras que la ISR está regulada por etileno y ácido jasmónico (Grant y Lamb, 2006). De acuerdo a esto podría decirse que el EAF induce mecanismos de defensa de amplio espectro, relacionadas a la activación de la SAR e ISR.

Los compuestos capaces de inducir las defensas de las plantas son muy variados y la red de mecanismos que estos activan es muy compleja. Aunque se pueden describir comportamientos generales, existe una multiplicidad de respuestas que son específicas a un inductor en particular. Desde un punto de vista de la utilización de los inductores en un plano agrícola, es importante que los mismos tengan ciertas características básicas

tales ser efectivos y estables, como para poder considerarlos como candidatos para un desarrollo tecnológico.

IV.5 CONCLUSIONES PARCIALES

- Se optimizó un protocolo para la producción de plantas de *Arabidopsis thaliana* adecuadas para la realización de ensayos en condiciones controladas.
- Se optimizaron los patosistemas de *A. thaliana-Pseudomonas viridiflava* y *A. thaliana-Botrytis cinerea*, en condiciones controladas.
- El tratamiento de plantas de *A. thaliana* con concentraciones subinhibitorias del EAF, aplicado 4 días previos a la inoculación con *B. cinerea* y *P. viridiflava*, redujo los síntomas de la enfermedad y el recuento de la población bacteriana, respectivamente.
- El tratamiento con EAF en plantas de *A. thaliana* indujo estallido oxidativo, acumulación de compuestos fenólicos, depósitos de calosa y sobreexpresión de genes de defensa relacionados con las vías de AS, AJ y ET.

CAPITULO V

EVALUACIÓN DEL EAF EN LA PROTECCIÓN CONTRA PATÓGENOS EN CULTIVOS DE IMPORTANCIA REGIONAL

V.1 INTRODUCCIÓN

La economía del Noroeste Argentino (NOA) se basa en actividades primarias y en el procesamiento de productos agropecuarios. La provincia de Tucumán tiene una marcada presencia en la actividad agrícola del país, destacándose en los cultivos tradicionales como caña de azúcar y limón tanto por la superficie afectada a estos cultivos como así también por los volúmenes de producción. También se incluye a la soja, cuya participación en superficie implantada ha mostrado un importante crecimiento en las últimas décadas (Dirección de Estadísticas de la Provincia, 2015).

A continuación se describen brevemente las características de estos tres importantes cultivos de la provincia y sus principales inconvenientes sanitarios.

V.1.1 Cultivo de la caña de azúcar

La caña de azúcar es el principal cultivo sacarífero del mundo ya que aporta aproximadamente el 70% de la producción total de azúcar (Sreenivasan y Heinz, 1987). El 87% de la producción mundial de caña de azúcar, se concentra en 15 de los 121 países productores: Brasil, India, China, Tailandia, Pakistán, México, Cuba, Colombia, Australia, EE.UU., Filipinas, Sudáfrica, Argentina, Myanmar y Bangladesh.

En Argentina, es una de las actividades agroindustriales más antiguas y se centraliza en el NOA, siendo la segunda actividad de mayor importancia económica y social en esta región. La caña de azúcar en el NOA es un cultivo de fuerte identidad cultural y una producción clave de la economía regional de Tucumán, Salta y Jujuy – con una participación del 98 % sobre el total de la producción nacional– y, en menor medida, en Santa Fe y Misiones. Tucumán produce alrededor de 1,4 millones de toneladas anuales (66%), en una superficie que representa alrededor del 45% del área agrícola total de la provincia (Fandos, 2014).

En los ingenios se obtiene azúcar para consumo humano como producto principal y una gran cantidad de subproductos tales como bagazo para papel o para quemar y cogenerar vapor y energía eléctrica, alcohol para consumo interno y exportación, alcohol anhidro para combustible, fertilizantes (cachaza y otros), componentes alimenticios para animales y otros productos como los “compost” agrícolas, vinazas, ceras, fibra absorbente, etc. La producción de biomasa y el balance energético de la caña de azúcar en la producción de bioetanol la posicionan por encima de la mayoría de las materias primas disponibles (Pérez y Rodríguez, 2011).

Durante los últimos años los rendimientos culturales mejoraron notablemente por la incorporación de nuevas tecnologías. Sin embargo, las enfermedades son una limitante de la productividad del cultivo, entre las que se destacan las siguientes: roya marrón (*Puccinia melanocephala*, H. y P. Sydow.), carbón (*Ustilago scitaminea*, H. Sydow.), Pokkah boeng (*Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*)(Sawada) Wollensw.) mancha parda (*Cercospora longipes*, E. Butler.), raquitismo de la caña soca (RSD) (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (= *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*), escaldadura de la hoja (*Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson), estría roja (*Acidovorax avenae* subsp. *avenae*, Stapp), mosaico (SCMV de “Sugarcane Mosaic Virus”), amarillamiento de la hoja (ScYLV de “Sugarcane Yellow Leaf Virus”) (Funes y col., 2009).

La estría roja es una enfermedad causada por la bacteria Gram-negativa *Acidovorax avenae* (Manns, 1909; Willems y col., 1992; Schaad y col., 2008) cuya incidencia ha tenido un importante incremento en las provincias del norte en los últimos años (Pérez Gómez y col., 2010). Los primeros síntomas se evidencian en las hojas que se manifiestan como estrías acuosas que gradualmente toman la coloración rojiza, y luego se extienden hacia el meristema apical causando podredumbre del brote. En cuanto al manejo de la enfermedad, el uso de variedades resistentes es el medio de control más efectivo (Almeida, 2008).

V.1.2 Cultivo de cítricos

Los cítricos constituyen el principal cultivo frutal del mundo con una producción que supera los 90 millones de toneladas por año (Federcitrus, 2016). La actividad cítrica argentina es una de las más importantes dentro de la fruticultura nacional. Argentina ocupa el octavo lugar como productor de cítricos en el mundo, (Federcitrus, 2016), y Tucumán concentra alrededor del 87% de la producción de limón y el 77% de la superficie total del país destinada al cultivo de este cítrico (Federcitrus, 2014), lo que define a la provincia como el centro productor más importante de limón (Paredes, 2013).

La exigencia de productos de calidad y sanidad garantizada en el mercado de exportación de fruta fresca es cada vez mayor e impacta directamente en la apertura o cierre de los mercados. La conservación y ampliación de los mismos está directamente relacionada con el control de las enfermedades cuarentenarias causadas por patógenos que no se encuentran presentes o se encuentran bajo control oficial en los países importadores de fruta y que no poseen la enfermedad. En el caso específico de los

cítricos, las enfermedades cuarentenarias que mayores problemas causan son: la cancrrosis asiática de los cítricos, causada por bacterias Gram-negativas del género *Xanthomonas*, la mancha negra causada por el hongo *Guignardia citricarpa*, y la sarna común originada por el hongo *Elsinoe* spp.

La cancrrosis de los cítricos es una enfermedad endémica en Argentina (Canteros y col., 2011), y es causada por dos grupos de *Xanthomonas* filogenéticamente diferentes, *X. citri* subsp. *citri* (*Xcc*) y *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (*Xfa*) (Schaad y col., 2005). *Xcc* y *Xfa* pueden contaminar la superficie de fruta como población epífita y su detección genera rechazo del envío en los mercados de destino (Cubero y col., 2001; Canteros y col., 2011). Aunque recientemente se ha demostrado que estas poblaciones epifíticas de bacterias no son infectivas (Gottwald y col., 2009), los países importadores continúan rechazando el producto que contenga contaminación. La cancrrosis Asiática, causada por *Xcc*, es la de mayor virulencia y distribución en el mundo (Graham y col., 2004). Se volvió endémica en 1990 en el Litoral y más tarde, en el año 2002, se declararon los primeros focos de infección en las provincias de Salta y Tucumán (Canteros, 2004). El manejo de la enfermedad consiste en la selección de variedades poco susceptibles, producción de plantas libres de la enfermedad en viveros, en combinación con pulverizaciones con productos cúpricos, cortinas rompevientos, control de plagas como el minador de los cítricos y saneamiento de herramientas y equipos. El uso continuado de cobre en el control químico permite obtener niveles satisfactorios de control de la enfermedad, sin embargo, reiteradas aplicaciones de cobre pueden generar poblaciones de *Xanthomonas* resistentes, producir fitotoxicidad, acumulación de cobre en el suelo e incrementos de los costos de producción (Miller y col., 2011; Behlau y col., 2010).

Por otro lado, las enfermedades de poscosecha también tienen alta incidencia en las pérdidas en la citricultura mundial. Entre los problemas más importantes, se encuentran la podredumbre ocasionada por hongos como *Geotrichum candidum*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, agente causal del moho verde y azul, respectivamente. De estas, *Penicillium digitatum* es la más ampliamente distribuida y la que genera las mayores pérdidas económicas (5-8%) a nivel global (Eckert y Eaks, 1989; Sommer y col., 2002). En Tucumán, es causante de hasta el 80% de las podredumbres de los frutos (Torres Leal, 2005). Es un patógeno estricto de heridas (Palacios, 2005) y las conidias, de alta tasa reproductiva, son abundantes en la atmósfera y en las superficies de frutas, pudiendo ser fácilmente diseminadas por corrientes de

aire. Esto constituye una fuente de inóculo constante que se moviliza durante toda la temporada de cosecha, desde las plantaciones hacia los empaques (Palacios, 2005). Actualmente, la podredumbre verde es controlada mediante la aplicación de los fungicidas sintéticos como Imazalil (IMZ) y Tiabendazol (TBZ) (Molina e Ivaldi, 2007), únicos productos de síntesis aceptados por la legislación internacional para combatir la enfermedad (Viñas y col., 2006). IMZ es un inhibidor de la biosíntesis del ergosterol, componente fundamental de la membrana celular fúngica (Siegel y Ragsdale, 1978); mientras que TBZ afecta la tubulina e interfiere en el proceso de mitosis celular del hongo (Allen y Gottlieb, 1970). Estos productos inducen la curación de heridas y la inhibición de la esporulación en las frutas ya contaminadas. El uso de fungicidas sintéticos presenta el inconveniente de que los países importadores tienen fijado un Límite Máximo de Residuos (LMR), determinado según criterios toxicológicos (para proteger la salud del consumidor) y agronómicos (según las Buenas Prácticas Agrícolas). Además periódicamente se reconsideran los niveles de LMR permitidos sobre la fruta, por lo que controlar la enfermedad resulta una tarea cada vez más difícil.

Es importante mencionar que actualmente la industria citrícola está siendo afectada por la enfermedad del Huanglongbing (HLB o ex-Greening), la cual lleva de forma irreversible a la muerte de la planta, afecta a todas las variedades de cítricos y no tiene cura (Bové, 2006). Aunque en el año de 2012 se confirmó la existencia de casos de HLB en el norte de Misiones, aun no se detectó en el NOA. Esta situación es extremadamente preocupante considerando que el insecto vector, el psílido *Diaphorina citri*, fue detectado en la mayoría de las provincias citrícolas argentinas (Vaccaro, 1994; Augier y col., 2006). Al menos tres especies de bacterias Gram-negativas limitadas a floema, denominadas *Candidatus Liberibacter* spp., han sido descritas como agentes responsables de HLB (Bové, 2006). El control del HLB sólo es preventivo y está basado en el control del insecto vector y la erradicación de las fuentes de inóculo.

V.1.3 Cultivo de la soja

La soja (*Glycine max* (L) Merr) es el cultivo oleaginoso de mayor producción y consumo a nivel mundial, ocupando un lugar muy importante en la economía del MERCOSUR y de nuestro país. Los tres mayores productores de soja en Sudamérica son Brasil, Argentina y Paraguay con el 52, 41 y 4% de la producción regional, respectivamente, lo que representa más del 46% del mercado internacional. Aunque de

la soja se pueden obtener numerosos derivados, en el comercio mundial adquieren gran importancia el grano, la harina y el aceite. Argentina es la tercera productora y exportadora mundial de grano, y la primera exportadora de aceite y harina (Bolsa de Comercio de Rosario, 2016). El complejo agroindustrial sojero argentino se expande desde los 40° hasta los 22° de latitud sur (LS), comprendiendo la región pampeana (Buenos Aires, Santa Fe, Entre Ríos, Córdoba y La Pampa), el Noreste (NEA, Chaco, Formosa, Entre Ríos, Corrientes, Misiones y este de Santiago del Estero) y el Noroeste (NOA, Salta, Tucumán Catamarca, Jujuy y oeste de Santiago del Estero). Con una gran expansión en el cultivo a partir de la década del '70, el área sembrada en Argentina actualmente ocupa cerca de 20 millones de hectáreas, según informa el Sistema Integrado de Información Agropecuaria (SIIA) del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación (<http://www.minagri.gob.ar/site/agricultura/index.php>).

Los problemas que afectan la producción de soja incluyen tanto los de origen biótico (diversas enfermedades y plagas) como abiótico (sequía, salinidad, temperaturas extremas, anegamiento, etc.). En la Argentina los daños causados por las enfermedades alcanzan del 8 al 10% del total de la producción (http://www.minagri.gob.ar/site/agricultura/roya_soja.php). Se han descrito más de 40 enfermedades que afectan el cultivo (Ploper y col., 2008), entre las cuales, las causadas por patógenos necrotróficos, son las más importantes. Dentro de este grupo de enfermedades se destacan por su prevalencia y severidad, las enfermedades de fin de ciclo (EFC) (Díaz y col., 2005), las que incluyen a aquellas que se presentan en los estadios reproductivos intermedios-avanzados ocasionando defoliación prematura y madurez anticipada del cultivo, lo cual ocasiona pérdidas de rendimiento por el desarrollo incompleto de los granos. Las EFC de mayor frecuencia en la Argentina son: tizón de la hoja y mancha púrpura de las semillas (*Cercospora kikuchi* Gardner), antracnosis (*Glomerella glycines*; *Colletotrichum trincatum*), mancha marrón (*Septoria glycines*), tizón de la vaina y tallo (*Phomopsis* spp.), mildiu (*Peronospora manshurica*), mancha anillada (*Corynespora cassiicola*), mancha foliar por *Alternaria* (*Alternaria* spp.), pústula bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv *glycines*) y tizón bacteriano (*Pseudomonas syringae* pv *glycines*), (Carmona y col., 2004; Ploper y col., 2008; Formento y col., 2009).

La mancha anillada de la soja es considerada una enfermedad endémica en la Argentina, aunque se presenta con mayor prevalencia en las provincias del norte. La severidad se ha venido incrementando gradualmente en las últimas campañas y en algunas zonas se ha convertido en una de las principales enfermedades de fin de ciclo

(Ploper y col., 2011). Es causada por *Corynespora cassiicola* (Berk. & M.A. Curtis) C.T. Wei, un hongo polífago que sobrevive en los restos de plantas infectadas, en las semillas y en el suelo. Las lesiones iniciales son puntuales, pero bajo condiciones ambientales favorables se expanden generando manchas de formato circular o irregular, de tamaño variable y culminan como áreas necróticas de hasta 1,5 a 2 cm de diámetro, rodeadas siempre de un halo concéntrico amarillo debido a la acumulación de una toxina llamada “casicolina” (Barthe y col., 2007). En variedades susceptibles puede causar defoliación.

Dado que la mayoría de los cultivares comerciales disponibles son susceptibles, se dedica el mayor esfuerzo a la evaluación de cultivares recientemente liberados y de líneas avanzadas mejoradas genéticamente en la resistencia a la enfermedad. Sin embargo, hasta el momento, la aplicación de fungicidas foliares es la herramienta de manejo más eficiente (Ploper y col., 2013).

En este capítulo se evalúa el efecto del EAF en la sanidad de los 3 cultivos arriba mencionados. Para ello se seleccionaron fitopatógenos específicos para cada caso y se realizaron evaluaciones tanto de las propiedades inductoras de la defensa como de la acción antimicrobiana directa sobre el patógeno.

V.2 MATERIALES Y MÉTODOS

V.2.1 SOJA

V.2.1.1 Obtención del material vegetal

El material vegetal se obtuvo por siembra de semillas de la variedad A8000 RG en macetas plásticas de 5 kg en una mezcla de suelo-mantillo-arena (2:1:1) bajo condiciones semicontroladas en invernadero: temperatura media de 30°C y fotoperíodo de 12 hs de luz a $450 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, hasta que alcanzaron el estadio apropiado para los tratamientos (V3 o 3er nudo). Durante ese período los plantines fueron regados con agua desionizada tres veces por semana y no recibieron tratamientos con productos químicos. Al momento de la siembra se colocaron 5 semillas por maceta, y luego de la emergencia de las plántulas, se eliminaron dos dejando tres por maceta, cuidando que las plantas elegidas tuvieran tamaño uniforme, de igual estado fisiológico (lote homogéneo) y sin heridas.

V.2.1.2 Microorganismos

Para los ensayos de desafío con el patógeno *Corynespora cassiicola* se utilizaron distintos aislados del hongo obtenidos en la Sección Fitopatología de la EEAOC.

V.2.1.3 Preparación del inóculo

El hongo *C. cassiicola* se cultivó en placas de Petri en medio agar papa glucosado (APG) (g L^{-1} : agar, 15; dextrosa, 20; infusión de papa, 4; pH 6,5-7,0) a 25°C, luz blanca fluorescente ($100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y fotoperíodo de 12 hs de luz, durante 15 días para inducir la formación de esporas. Las esporas se recolectaron añadiendo 3 mL de agua destilada estéril con tween 0,1% sobre la superficie del micelio y raspando cuidadosamente la misma con ansa de siembra. La suspensión de esporas y micelio se agitó durante 30 min a temperatura ambiente y se filtró a través de gaza estéril para eliminar el micelio. Los conidios se cuantificaron en cámara de Neubauer y se ajustó la suspensión a la concentración deseada con agua destilada estéril.

V.2.1.4 Inoculación con *C. cassiicola*

La infección se llevó a cabo rociando las partes aéreas de las plantas hasta punto de goteo. Se ensayaron tres concentraciones diferentes de inóculo (3×10^3 , 3×10^4 y 3×10^5 conidios/mL) para seleccionar la más adecuada. Inmediatamente después de la inoculación, las plantas fueron colocadas en una cámara de infección con 90% de

humedad relativa, durante un lapso de 72 hs, y luego fueron mantenidas en cámaras de infección bajo condiciones controladas de humedad relativa (70%) y temperatura (25°C) con un fotoperíodo de 16 hs de luz (luz blanca fluorescente, $100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), y riego a capacidad de campo hasta finalizar la evaluación. Estas condiciones permiten el desarrollo del hongo patógeno y el crecimiento de las plantas. Las plantas permanecieron en estas condiciones durante 10 días con el fin de evaluar la sintomatología de mancha anillada en las mismas. Cada ensayo fue aleatorizado con 9 plantas por tratamiento.

V.2.1.5 Evaluación de los síntomas

Se determinó incidencia y severidad de los síntomas de la enfermedad en las hojas. En el primer caso se determinó el porcentaje de hojas con síntomas, y la severidad de la enfermedad o DSR (del inglés Disease Severity Rating) se determinó por comparación de los síntomas con una escala tomada y adaptada por Soares y col., (2009). Dicha escala define 3 niveles de sintomatología de la enfermedad o DSR referida al porcentaje de la superficie de la lámina de la hoja afectada con síntomas (Figura 22) de acuerdo a lo siguiente:

Grado 1: folíolos sanos o con puntos necróticos en bajo número, con un área foliar afectada de hasta el 10%.

Grado 2: puntos necróticos rodeados de zonas amarillas, que abarcan hasta un 50% del área foliar;

Grado 3: lesiones muy severas, que abarcan más del 50% del folíolo, pudiendo presentarse la planta muerta.

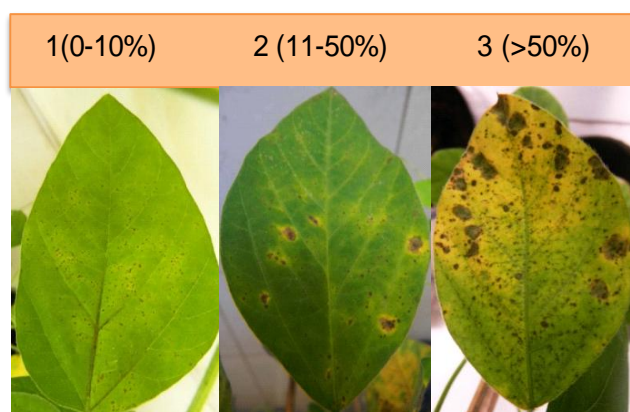


Figura 22: Escala esquemática en base a los síntomas de la enfermedad para evaluar la severidad de la mancha anillada de soja.

V.2.1.6 Actividad antimicrobiana de EAF contra *C. cassiicola*

Se llevó a cabo mediante el ensayo de difusión en agar (Parente y Hill, 1992): en pocillos de 0,5 cm de diámetro realizados sobre el medio sólido APG se colocaron 50 μL de diluciones sucesivas de EAF a partir de una concentración de extracto equivalente a 1 g PF/mL, se dejó secar en flujo laminar y posteriormente se cubrió con una suspensión de 10^4 esporas/mL en medio blando (0,7% (v/v) de agar). Las placas se incubaron durante 48 hs y la actividad antibiótica se estimó con la observación de zonas sin crecimiento alrededor del pocillo de siembra (halos de inhibición del crecimiento). Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM), que es la menor concentración en la que se observa inhibición del microorganismo.

V.2.1.7 Tratamientos con EAF

Para evaluar si el EAF era capaz de proteger a las plantas de infecciones posteriores, se realizaron aplicaciones con concentraciones subinhibitorias del EAF para *C. cassiicola* y luego se desafiaron las plantas tratadas (ensayos preventivos), de acuerdo a como se describe a continuación:

- Pre-tratamiento. Todas las partes aéreas de las plantas en estadio V3 fueron rociadas hasta punto de goteo, con 0,1 gPF/mL del EAF. Para investigar si el EAF tiene un efecto sistémico, solo se rociaron las hojas de los nudos V1 y V2. Las plantas en ambos casos fueron mantenidas en condiciones controladas óptimas para su crecimiento.
- Inoculación con el patógeno. Al cabo de 3 o 7 días posteriores al tratamiento con el EAF, se realizó la inoculación con *C. cassiicola*, como se describió anteriormente. La evaluación de los síntomas se realizó en los nudos V3 y V4, tanto para evaluar el efecto local como así también en el sistémico.
- Controles del ensayo utilizados:
 - Control de infección: plantas que fueron pre-tratadas con agua/limón e inoculadas con el hongo.
 - Control de inducción de defensa: plantas pre-tratadas con el inductor comercial, Bion 500 0,5 mg/mL(Syngenta), y posteriormente inoculadas.
 - Control negativo: plantas rociadas con agua, sin inocular.

V.2.1.8 Detección de especies reactivas del oxígeno

La detección de radical superóxido se realizó como se describe en la sección IV.2.9.

V.2.1.9 Extracción de compuestos fenólicos

La extracción y cuantificación de los compuestos fenólicos solubles se realizó como se describe en la sección IV.2.10.

V.2.1.10 Visualización de la deposición de calosa

Para visualizar la deposición de calosa, se procedió de acuerdo a lo que se describe en la sección IV.2.11.

V.2.1.11 Análisis estadístico

El análisis estadístico para cuantificación de fenólicos totales fue llevado a cabo usando el programa InfoStat, version 2013 (Di Rienzo y col., 2013). Las diferencias entre los promedios fueron evaluadas mediante el test LSD (valor $p \leq 0,05$).

V.2.1.12 Análisis de la expresión génica

V.2.1.12.1 Extracción de ARN

Para los experimentos de expresión de genes las hojas de soja tratadas fueron recolectadas e inmediatamente molidas en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su utilización. El ARN total fue extraído de acuerdo a Iandolo y col. (2004), como se describe a continuación: a 150 mg de tejido vegetal se adicionó 1 mL de buffer de lisis (100 mM Tris-HCl (pH 8), 25 mM EDTA (pH 8.0), 2% CTAB (w/v) (Sigma), 2,5 M NaCl, 2% soluble PVP (w/v) (Sigma, MW40,000), y 0,5 g/L espermidina (Sigma) y 2% β -mercaptoetanol) se homogeneizó, y se incubó a 65°C durante 30 min mezclando con vortex cada 10 min. El homogenado se centrifugó a 5000 g a 4°C durante 10 min, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrifuga, y se adicionó igual volumen de cloroformo-isoamilico (24:1) mezclando manualmente por inversión. Se centrifugó a máxima velocidad (13.000 g) a 8°C durante 10 min y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo. Nuevamente se adicionó igual volumen de cloroformo-isoamilico (24:1) mezclando manualmente por inversión, se centrifugó a 13.000 g y a 8°C durante 10 min. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo con 1/4 de volumen de 10 M LiCl, se mezcló suavemente, y se incubó ON a 4°C . Al día

siguiente, se centrifugó a 13.000 g a 4°C durante 1 hora. Se descartó el sobrenadante sin romper el “pellet” y este se lavó con etanol 70% y luego con etanol 100%, centrifugando después de cada lavado a 13.000 g a 4°C durante 10 min. Finalmente se eliminó el etanol y se dejó secar el “pellet” y se resuspendió en 20 µL de agua libre de RNAsas.

Para purificar el ARN total se trataron las muestras con DNAsa I (Fermentas), para eliminar el ADN genómico que podría quedar luego de la extracción. Para ello a 17 µL del ARN “stock” se agregaron 1 µL de DNAsa I (1U/µL) y 2 µL del buffer 10x (100 mM Tris-HCl, pH 7,5 25 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂) se mezcló y se incubó a 37°C durante 30 min, luego se detuvo la reacción por la adición de 2 µL de EDTA 50 mM y se inactivó la DNAsa I por incubación a 65°C durante 10 min.

La calidad del ARN extraído fue determinada espectrofotométricamente mediante un Nanodrop (Biophotometer Plus, Eppendorf), evaluando las absorbancias a 230, 260 y 280 nm. Solo aquellas muestras con una relación A260/A280 (ARN/proteínas) entre 1,8 – 2,0 fueron procesadas (grado de pureza aceptable). La integridad del ARN quedó confirmada porelectroforesis en gel de agarosa al 1% (sin ARN y formaldehído) y se visualizada por tinción con bromuro de etidio. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su utilización.

V.2.1.12.2 Retrotranscripción

La síntesis de la hebra de ADN complementario al ARNm se realizó con la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Thermo Scientific), según el protocolo descrito en la sección IV.2.13.2.

V.2.1.12.3 PCR cuantitativa en tiempo real

Todos los experimentos de PCR cuantitativa en tiempo real se realizaron en el equipo Mini Opticon Real Time PCR System (BioRad), de acuerdo al siguiente procedimiento:

Mezcla de reacción de qRT-PCR

- 12,5 µL de Mix (iQ SYBR Green Supermix, BioRad)
- 5,5 µL de agua estéril
- 2 µL de mezcla de cebadores (solución mezcla: 5 µM de cebador directo y 5 µM cebador reverso)

- 5 μ L de cDNA dilución 1:10
- Volumen final de reacción: 25 μ L

Programa

1 ciclo de 10' a 95°C

15'' 95°C	}	40 ciclos
30'' 64°C		
40'' 72°C		

El gen de la β -tubulina (β -tub) fue utilizado como gen de referencia interna, ya que se encuentra presente en todas las plantas y es de expresión constitutiva.

Los cebadores usados en estos ensayos se detallan en la Tabla 7. Los datos crudos de fluorescencia se obtuvieron del ciclador StepOne Plus y la eficiencia de amplificación para cada gen fue calculada usando el “software LinReg PCR” (Ramakers y col., 2003). El gen β -tub fue utilizado para estandarizar la expresión de los genes blanco; luego se calculó una relación entre tratamientos usando el algoritmo desarrollado por Pfaffl (2001). La determinación del grado de inducción de un gen y el análisis estadístico se realizaron mediante el “Software FgStatistics” (Di Rienzo, 2011) (valor $p < 0,05$, están indicadas con asteriscos).

Tabla 7: Cebadores utilizados para el análisis mediante PCR en tiempo real en plantas de soja.

Gen	Cebador directo(5'3')	Cebador reverso(5'3')
<i>β-tub</i>	AATGCGTGAGAGCCTTCACA	TGGCGCCGATCTGGTT
<i>PR1</i>	CACAACGCTGCAAGATCACA	GCGACTGCGTTATCCCAAAC
<i>PR10</i>	CCGACAACGTCATCCCAAAG	TTCCCCTCAAGGTTTTCAACA
<i>SCaM-4</i>	AGTCAGTCTTCTGGTGCAAGCA	CACACACCACCCACCCAAA
<i>SCaM-5</i>	GGTTATCCGGTCATTGGTTCA	ATCTACCTCGTTTATCATGTCTTGGA

V.2.2 CAÑA DE AZUCAR

V.2.2.1 Material vegetal

Se utilizaron plantas de dos variedades comerciales de caña de azúcar de comportamiento contrastante frente a estría roja: LCP 85-384 (resistente) y TUCCP 77-

42 (susceptible). Estas se hicieron crecer en invernadero bajo condiciones semicontroladas de temperatura (30°C) y luz (fotoperíodo de 12 hs de luz a 450 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), originadas a partir de la siembra de estacas uninodales hasta que alcanzaron el estadio apropiado para los ensayos, aproximadamente a los cuatro meses desde la plantación. Las plantas fueron regadas con agua desionizada tres veces por semana y fertilizadas una semana antes de la inoculación.

V.2.2.2 Microorganismos

Se utilizó una cepa de *Acidovorax avenae*, agente causal de la estria roja, aislado a partir de tejido sintomático por personal de la Sección Fitopatología de la EEAOC.

V.2.2.3 Preparación del inóculo

La bacteria se cultivó en medio agar nutritivo (g L^{-1} : extracto de carne, 3; pluripectona de carne, 5; NaCl, 8; Agar, 15; pH 7,3.), a 37°C durante 48 hs. Se tomó una colonia aislada y se inoculó en 10 mL de medio líquido y se incubó en agitación a 37°C ON. A partir de este cultivo, se tomó una alícuota para inocular medio fresco y se incubó durante 3 hs hasta alcanzar la fase exponencial. La densidad de la suspensión se determinó espectrofotométricamente a 600 nm.

V.2.2.4 Actividad antimicrobiana contra *A. avenae*

Se determinó la actividad antimicrobiana de EAF frente a la bacteria de acuerdo al método descrito en la sección III.2.6.

V.2.2.5 Inoculación con *A. avenae*

Se realizó la inoculación de las plantas mediante el asperjado de las hojas con una suspensión de *Acidovorax avenae* de 10^8 UFC/mL, de acuerdo a lo descrito por Bertani y col. (2015). Las plantas se mantuvieron cubiertas con una bolsa transparente a 30°C, 100 % de humedad durante 48 hs, y luego se destaparon. La evaluación de los síntomas se realizó a los 5 días de acuerdo a la escala detallada en la Tabla 8.

Tabla 8: Escala de severidad de estría roja en caña de azúcar de acuerdo a porcentaje de area foliar afectada (% de AFA)

Escala	Severidad (% de AFA)
0	0
1	<0,5
2	0,5
3	1
4	5
5	10
6	25
7	35
8	50
9	>50 y/o tallo afectado

V.2.2.6 Ensayo de protección frente estría roja

El diseño experimental para evaluar el efecto del EAF en el patosistema caña de azúcar-*A. avenae* fue el siguiente:

1-Pre-tratamiento: todas las partes aéreas de las plantas fueron rociadas con una concentración subinhibitoria de EAF hasta punto de goteo, 5 días antes de la inoculación. Las plantas fueron mantenidas en invernadero en condiciones óptimas para su crecimiento.

2-Inoculación con el patógeno: 5 días posteriores al tratamiento con el EAF, se realizó la inoculación con *A. avenae*, como se describió anteriormente.

Como control de infección las plantas fueron pre-tratadas con agua o agua/limón y posteriormente inoculadas.

V.2.3 LIMONERO

V.2.3.1 Material vegetal

Para los ensayos con plantas, se utilizaron plantas sanas de *Citrus sinensis* cv. Pineapple de aproximadamente 3 meses de edad desde la siembra de la semilla, mantenidas en invernadero en condiciones controladas de temperatura y humedad.

Para los ensayos con frutos para evaluar efecto curativo en frutos con síntomas de cancrisis, se recolectaron frutos naturalmente infectados de una plantación perteneciente a la EEAOC (n=10). Y para los tratamientos contra la podredumbre verde,

se utilizaron frutos sanos (sin síntomas) cedidos por una citrícola de Las Talitas (Estación Fruticola Mani SRL), cosechados 24 hs previas a la realización del ensayo.

V.2.3.2 Microorganismos

Se utilizó una cepa de *Penicillium digitatum* sensible a Imazalil aislada de un empaque de limón, y una cepa de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*) aislada en la Sección Biotecnología de la EEAOC.

V.2.3.3 Preparación del inóculo

La bacteria *Xcc* se cultivó en medio Cadmus (g L⁻¹: extracto de malta, 3; extracto de levadura, 3; peptona, 5; glucosa, 1,5; pH 7,2 – 7,4.), a 28°C con agitación hasta saturación del cultivo. La densidad de la suspensión se midió espectrofotométricamente a 600 nm, y posteriormente se diluyó hasta 10⁶ UFC/mL, concentración utilizada para los ensayos de inhibición.

El hongo *P. digitatum* se cultivó en placas de Petri en medio APG a 25°C y luz blanca fluorescente continua por 8 días para inducir la formación de esporas. La suspensión de esporas se realizó añadiendo 3 mL de agua destilada estéril sobre la superficie del micelio y raspando cuidadosamente la superficie del cultivo con ansa de siembra. Las esporas se separaron del micelio por filtración a través de gaza estéril y luego se cuantificaron en cámara de Neubauer. Posteriormente la suspensión se diluyó hasta la concentración apropiada (10⁵ esporas/mL) en el medio correspondiente.

V.2.3.4 Actividad antimicrobiana contra *Xcc*

In vitro

A partir de un cultivo ON de la bacteria, se hizo una dilución de 10⁶ UFC/mL a la que se le agregaron distintas concentraciones del EAF (0,1, 0,05 y 0,02 g PF/mL) durante 2 min a 25°C. Como control positivo se utilizó NaClO (50, 100 y 200 ppm). Después de la incubación, las muestras se centrifugaron a 3.500 g por 1 min, se descartó el sobrenadante y el “pellet” se lavó 2 veces con agua destilada estéril y se resuspendió en el volumen original. Alícuotas de 5 µL se colocaron en forma de gota sobre una placa de Petri con medio Cadmus, la cual se incubó por 48 hs a 28°C, al cabo del cual se observó el crecimiento de colonias.

In vivo

Frutos de limonero con síntomas de cancrrosis se trataron con el EAF sumergiendo los frutos en una solución de 0,05 g PF/mL durante 2 min. Como control positivo, se utilizó NaClO 200 ppm, y como controles negativos, agua destilada y agua acidificada con jugo de limón. Se utilizaron 10 frutos por tratamiento con 3 repeticiones. Los frutos se dejaron secar en flujo laminar, se sumergieron en un recipiente con 1L de 10 mM de MgCl₂ estéril y se mantuvieron en agitación durante 30 min, con el objetivo de que las bacterias de la superficie pasen al medio líquido. Del volumen total de MgCl₂ se tomó una alícuota de 50 mL y se centrifugó 10 min a 7.500 g. Se descartó el sobrenadante y el “pellet” se resuspendió en 1 mL de MgCl₂ estéril, el cual se infiltró en hojas de limonero por presión mecánica con una jeringa sin aguja en la cara abaxial de la hoja. Las plantas se mantuvieron en condiciones ambientales controladas a 28°C, humedad 90 % y un fotoperíodo de 16 hs de luz. A los 15 días se realizó el conteo del número de cancros desarrollados sobre la superficie de hoja.

V.2.3.5 Actividad antimicrobiana contra *P. digitatum**In vitro*

a)- en medio sólido

Se llevó a cabo mediante el ensayo de difusión en agar (Parente y Hill, 1992): se colocaron 50 µL de diluciones sucesivas del EAF a partir de una concentración equivalente a 2 g PF/mL con agua destilada estéril, en pocillos de 0,5 cm realizados sobre el medio sólido APG. Se dejó secar al aire en flujo laminar y posteriormente se cubrió con una suspensión de 10⁵ esporas/mL en medio blando (0,7% (v/v) de agar). Las placas se incubaron durante 48 hs y la actividad antibiótica se estimó con la observación de zonas sin crecimiento alrededor de los puntos de siembra (halos de inhibición del crecimiento). Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM).

b)- en medio líquido

Las esporas se sometieron a un tratamiento en medio líquido con EAF. Para ello, alícuotas de 500 µL de una suspensión de 10⁶ conidios/mL, fueron incubadas a 25°C durante 2 a 5 días con diferentes concentraciones de EAF (0,25, 0,1 y 0,05 g PF/mL). Después de la incubación, las muestras se centrifugaron a 3.500 g por 1 min y se descartó el sobrenadante. El “pellet” se lavó 2 veces con agua destilada estéril y se resuspendió en el volumen original. Alícuotas de 5 µL se colocaron en forma de gota

sobre una placa con medio APG, la cual se incubó por 7 días a 28°C y se observó el desarrollo de crecimiento.

In vivo

En este caso se evaluó la actividad antimicrobiana del EAF, aplicándolo en los limones 6 hs previas (tratamiento preventivo) o 24 hs posteriores (tratamiento curativo) a la inoculación con el patógeno:

La inoculación de los limones se realizó practicando una herida superficial (1 mm de diámetro y 2 mm de profundidad) mediante una punción con un punzón de acero y sobre ella se colocó una alícuota de 20 µL de una suspensión de 10⁶ esporas/mL.

En ambos tratamientos se evaluaron dos concentraciones de EAF: 0,1 y 0,2 g PF/mL. Como control positivo se utilizó Imazalil 500 ppm y como control negativo agua destilada. Las frutas se almacenaron en cajas a 25°C y 90% de humedad relativa. Diariamente y por un período de 7 días, se realizó la inspección de la fruta para evaluar la incidencia (número de frutos con síntomas) y la severidad de las lesiones (superficie del fruto afectado por el desarrollo del micelio) para lo cual se utilizó una escala numérica de calificación visual con valores que van desde 0 (sin desarrollo de micelio) hasta 4 (fruto completamente cubierto con micelio), y los valores intermedios corresponden a 1 (desarrollo de micelio cubriendo hasta un 10% del fruto), 2 (desarrollo de micelio cubriendo hasta un 25% del fruto) y 3 (desarrollo de micelio cubriendo hasta un 50% del fruto) (Figura 23).

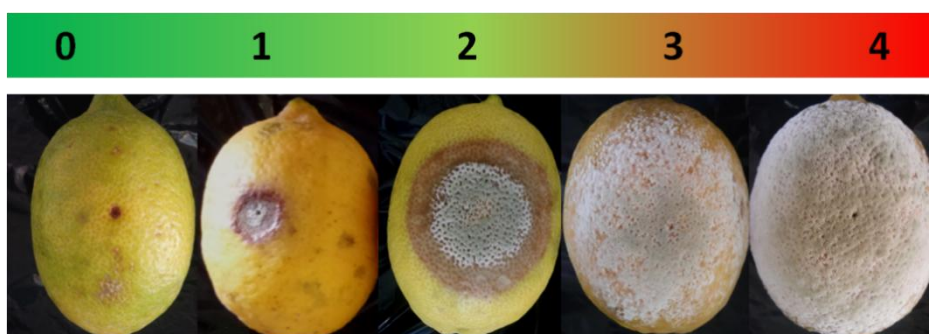


Figura 23: Escala visual numérica de severidad en limones inoculados con *P. digitatum*.

A partir de los valores de severidad de cada fruto, se calculó el índice de severidad (S) aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de severidad (S)} = \frac{F_0 + F_1 + F_2 + F_3 + F_4}{\text{N}^\circ \text{ total de frutos}}$$

Donde:

$F_0 = 0 \times \text{N}^\circ$ de frutos con severidad 0

$F_1 = 1 \times \text{N}^\circ$ de frutos con severidad 1

$F_2 = 2 \times \text{N}^\circ$ de frutos con severidad 2

$F_3 = 3 \times \text{N}^\circ$ de frutos con severidad 3

$F_4 = 4 \times \text{N}^\circ$ de frutos con severidad 4

El índice de incidencia se define como la relación entre el número de limones infectados (estadios 1 al 4) respecto al número total de frutos por tratamiento.

$$\text{Índice de incidencia (I)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de frutos infectados}}{\text{N}^\circ \text{ total de frutos}}$$

V.3 RESULTADOS

V.3.1 SOJA

V.3.1.1 Optimización del patosistema Soja- *Corinespora cassiicola*

En el capítulo anterior, se demostró que EAF fue capaz de inducir la defensa en *Arabidopsis* contra un patógeno biótrofo y un necrótrofo. Como consecuencia, el interrogante posterior era averiguar si el EAF obtenido en este trabajo, mantiene esta capacidad en otros patosistemas. En primer lugar, decidimos evaluar la efectividad de EAF en la inducción de la defensa en soja, para lo cual fue necesario optimizar un patosistema en condiciones controladas. Para ello se seleccionó un patógeno de gran importancia en el cultivo de la soja: *Corynespora cassiicola*. Como primera medida fue necesario seleccionar una cepa que produjera esporas *in vitro* en cantidad suficiente y que fuese virulenta en la variedad de soja elegida, A8000. De tres aislados evaluados del patógeno, solo el denominado C4 produjo suficiente cantidad de conidios. Para evaluar la susceptibilidad de A8000 a C4 y optimizar la concentración adecuada del inóculo a utilizar en los ensayos con el EAF, se realizaron inoculaciones con 3×10^3 , 3×10^4 y 3×10^5 conidios/mL sobre plantas de A8000 en estadio V3 y los síntomas se evaluaron durante 10 días. A los 3 días posteriores a la inoculación (dpi), comenzaron a observarse lesiones puntuales, de color pardo. A los 7 dpi las lesiones aumentaron de tamaño y comenzaron a rodearse de una halo clorótico, lo cual coincidió con los síntomas descritos por Barthe y col., (2007). En este momento se evaluó la incidencia y la severidad de la enfermedad de acuerdo a la escala descrita en la sección V.2.1.5.

En la evaluación realizada a los 7 dpi (Figura 24A), se observa que medida que aumenta la concentración del inóculo, aumenta la severidad de la enfermedad alcanzando un máximo de 67% de folíolos con severidad 3 cuando se inoculó con 3×10^5 conidios/mL. Con las concentraciones de 3×10^3 y 3×10^4 conidios/mL ninguna planta alcanzó el máximo índice de severidad (nivel 3). A los 10 dpi (Figura 24B), en general se observa un aumento de la severidad de los síntomas con las tres concentraciones ensayadas. Sin embargo, con la concentración de 3×10^3 conidios/mL, los síntomas fueron mas suaves sin alcanzar el nivel 3 de severidad, y con la mayor concentración la gran mayoría de las plantas estaban muertas. Con la concentración de inóculo intermedia se obtuvo una mejor distribución de los niveles de severidad, razón por la cual se estableció a la concentración de 3×10^4 conidios/mL, como la más adecuada para realizar los ensayos con EAF. También se observó que en las plantas que llegaban con severidad 3 a los 10 dpi, había gran pérdida de hojas por defoliación, reduciendo el

valor de n. Por este motivo, para los ensayos de protección se define el resultado en base a la evaluación de los 7 dpi.

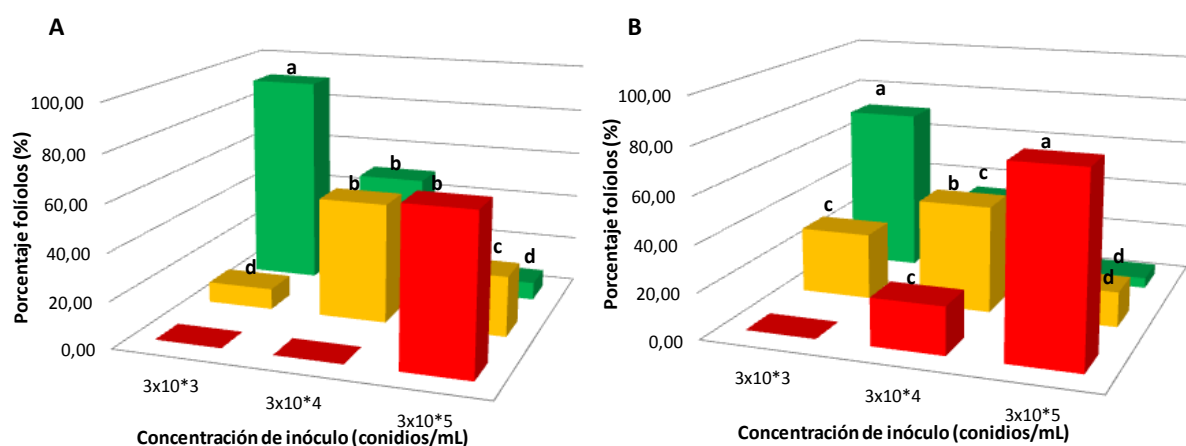


Figura 24: Incidencia y severidad de plantas de soja inoculadas con *C. cassiicola* en diferentes concentraciones a los 7 dpi (A) y 10 dpi (B). Los datos obtenidos corresponden al promedio de tres experimentos independientes (n=9). Letras diferentes indican diferencias significativas con $p \leq 0,05$. Los diferentes colores indican niveles de severidad (superficie foliar afectada): ■ 1 (0-10%), ■ 2 (11-50%) y ■ 3 (>50%).

V.3.1.2 Efecto del tratamiento con EAF en la protección contra *Corynespora cassiicola*

Para evaluar el efecto del EAF en la inducción de los mecanismos de defensa naturales en plantas de soja, en este caso evaluando el comportamiento frente al desafío contra *C. cassiicola*, fue necesario determinar previamente si EAF tenía actividad antimicrobiana contra este microorganismo. La idea fue usar concentraciones subinhibitorias de EAF de tal forma de asegurar que el efecto de protección observado en las plantas tratadas, fuera consecuencia de la inducción de las defensas naturales de la propia planta y descartar un efecto por inhibición directa del EAF sobre el patógeno.

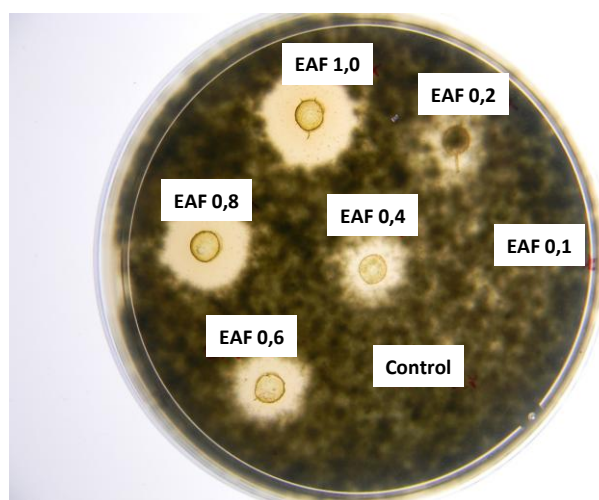


Figura 25: Inhibición *in vitro* del crecimiento de *C. cassiicola* en medio sólido con diferentes concentraciones de EAF (0,1 a 1 g PF/mL), a los 5 días de incubación. Control: agua/limón.

Mediante ensayo de inhibición en agar se determinó que el EAF fue capaz de inhibir el crecimiento de *C. cassiicola* y que la menor concentración a la que se observa halo de inhibición es de 0,2 g PF/mL (CIM) (Figura 25). De acuerdo a este resultado, para evaluar el efecto protector del EAF en soja, se utilizó la concentración de 0,1 g PF/mL, ya que no es inhibitoria para el patógeno.

Con la concentración de EAF definida se trataron las plantas de soja aplicando en la planta completa, y a los 3 o 7 días posteriores fueron desafiadas con el patógeno en condiciones controladas. Como controles de infección y de inducción se utilizó agua/limón y Bion 500, respectivamente. A los 7 y 10 dpi se realizó la evaluación en función de la severidad de la enfermedad o DSR. En la Figura 26, se muestran los resultados de la evaluación a los 7 dpi, en donde se observa que ninguno de los tratamientos alcanzó la máxima severidad (Nivel 3). Los tratamientos con EAF y Bion 500 aplicados 3 días antes de la inoculación (EAF -3 y Bion -3), presentaron el mayor porcentaje de folíolos con la menor severidad (DSR 1), correspondiendo un 80% para EAF, 85% para Bion 500, mientras que en el control agua/limón el porcentaje de folíolos con DSR 1 solo fue de 40%.

En cambio cuando los tratamientos con EAF y Bion 500 fueron aplicados 7 días antes de la inoculación (EAF -7 y Bion -7), no se observaron diferencias en la sintomatología con el control de infección.

En la evaluación realizada a los 10 dpi, se mantuvieron las diferencias observadas a los 7 dpi, aunque en todos los tratamientos se incrementaron los niveles de severidad.

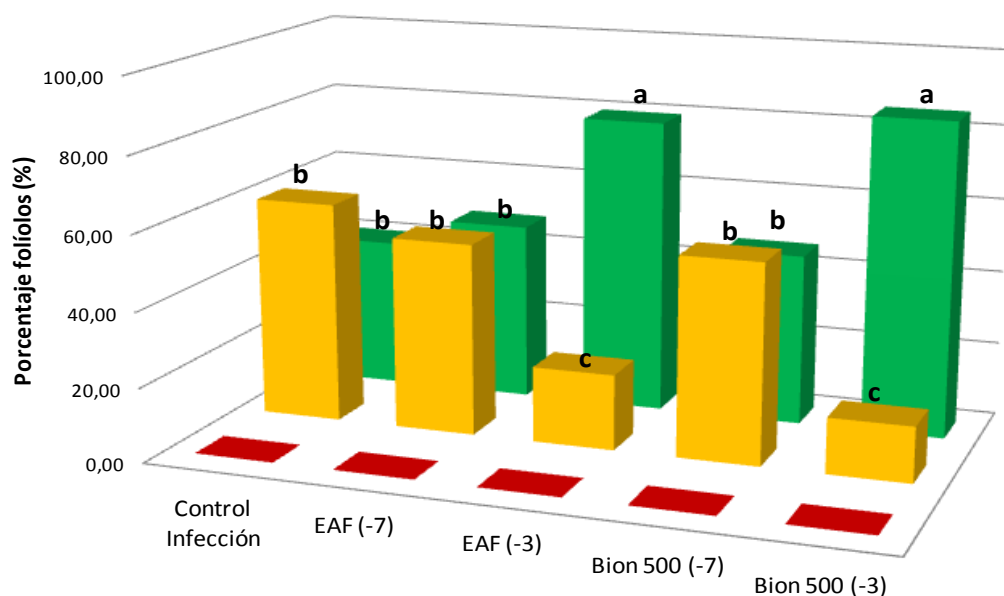


Figura 26: Incidencia y severidad de la mancha anillada en plantas de soja tratadas con EAF, previamente a la inoculación con *C. cassiicola*. Los folíolos de plantas de soja se rociaron con agua/limón (control de infección), con Bion 500 (control de inducción) o con el EAF 3 y 7 días antes (-3 y -7) de la inoculación. Los síntomas evaluados corresponden a los 7 dpi. Los datos obtenidos corresponden al promedio de tres experimentos independientes (n=9). Letras diferentes indican diferencias significativas con $p \leq 0,05$. Los diferentes colores indican niveles de severidad (superficie foliar afectada): ■ 1 (0-10%), ■ 2 (11-50%) y ■ 3 (>50%).

Además se evaluó si el efecto de protección del EAF tenía carácter sistémico, para lo cual se realizaron aplicaciones dirigidas en las hojas V1 y V2 a los 3 y 7 días previos a la inoculación, y la evaluación de los síntomas se realizó en las hojas V3 y V4 (tejido distal) a los 7 dpi. En la Figura 27 se observa que el tratamiento sistémico con EAF, aplicado a los 3 o 7 días previos a la inoculación, presentó un promedio de 40 y 68 % de folíolos con DSR 1, respectivamente, siendo este último tratamiento similar al EAF aplicado localmente 3 días previos a la inoculación (EAF local). En cambio, el testigo infectado solo alcanzó a un 22 % de folíolos con dicha severidad.

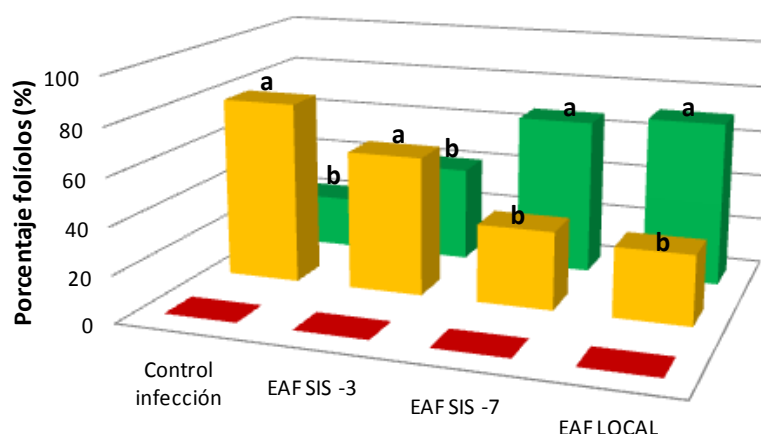


Figura 27: Incidencia y severidad de la mancha anillada en tratamiento sistémico de EAF en plantas de soja. El tratamiento con EAF fue aplicado en las hojas V1 y V2, 3 y 7 días previos a la inoculación con *C. cassiicola* y la evaluación de los síntomas de la enfermedad se realizó en las hojas V3 y V4. El tratamiento EAF local corresponde a las plantas rociadas completamente con EAF 3 días previos a la inoculación. Los valores graficados corresponden a los síntomas evaluados a los 7 dpi. Los datos obtenidos corresponden al promedio de tres experimentos independientes (n=9). Los diferentes colores indican niveles de severidad (superficie foliar afectada): ■ 1 (0-10%), ■ 2 (11-50%) y ■ 3 (>50%).

V.3.1.3 Caracterización bioquímica de la respuesta de defensa inducida por EAF

Con el propósito de investigar si el efecto de protección observado en plantas pretratadas con el EAF estaba asociado a un efecto real de inducción de las defensas de la planta, se analizó la acumulación de EROs (O_2^-), calosa y compuestos fenólicos totales en hojas de plantas de soja tratadas con el EAF.

V.3.1.3.1 Detección de EROs

Al igual que en *Arabidopsis* se evaluó la acumulación de anión superóxido por medio de la tinción con NBT, a las 2, 4 y 6 hpt. Como puede observarse en la Figura 28, en las plantas tratadas con EAF se observa una coloración azul indicativo de la acumulación de anión superóxido, produciéndose la máxima coloración a las 4 hpt, la cual es más intensa en las zonas de las nervaduras y de la lámina cercana al pecíolo.

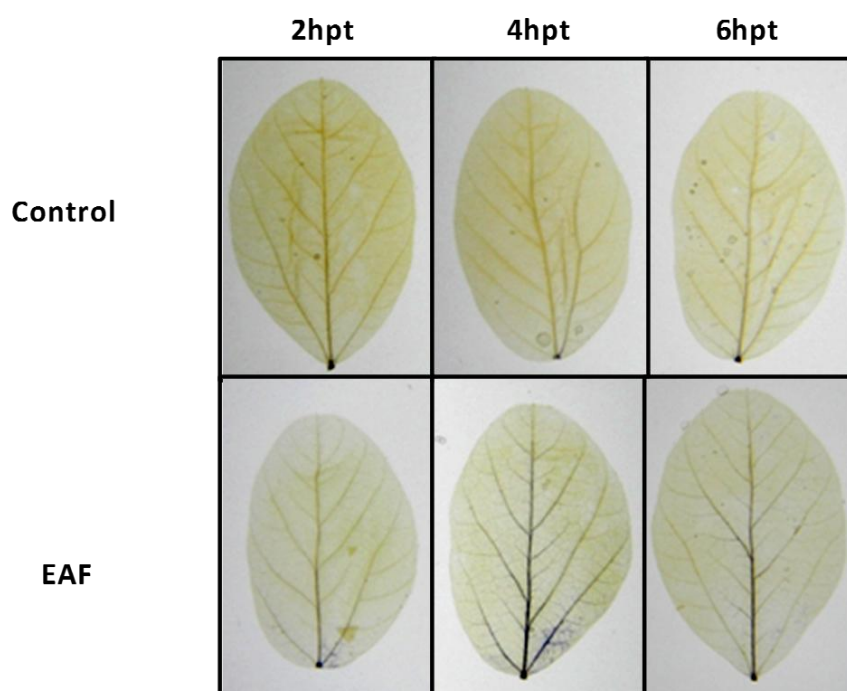


Figura 28: Tinción histoquímica de la acumulación de anión superóxido (O_2^-) en hojas de plantas de soja tratadas con EAF a las 2, 4 y 6 hpt. Los folíolos fueron teñidos con NBT, y la formación de una coloración azul indica acumulación de O_2^- . Se muestrearon tres folíolos de una hoja V3 y se utilizaron tres plantas por cada tratamiento (n=9). El ensayo fue realizado por duplicado de manera independiente con idénticos resultados. Se muestran fotografías representativas de un ensayo. Control: plantas rociadas con agua/limón.

V.3.1.3.2 Acumulación de compuestos fenólicos

En la Figura 29 se muestra que a los 3 días posteriores al tratamiento, la concentración de compuestos fenólicos solubles en las hojas rociadas con EAF fue aproximadamente un 30% superior con respecto al tiempo 0 y al control de agua con limón. A los 5 y 7 días del tratamiento, los niveles de compuestos fenólicos totales en las plantas controles y tratadas con el EAF, no mostraron diferencias significativas.

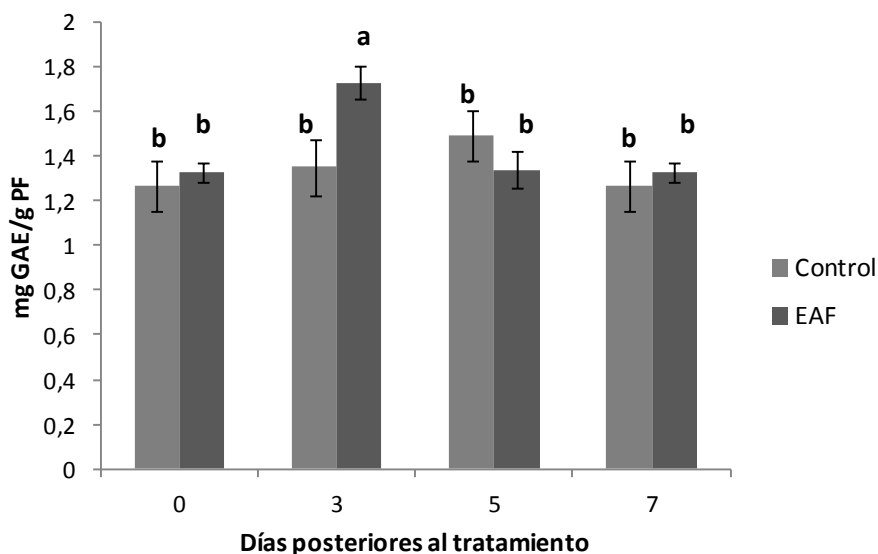


Figura 29: Contenido de compuestos fenólicos totales en hojas de soja tratadas con EAF. Las hojas de plantas tratadas con EAF se recolectaron a los 0, 3, 5 y 7 días posteriores para determinar el contenido de fenólicos mediante el método Folin-Ciocalteu. Los datos se expresan como los valores medios de mg GAE/g PF \pm desvío estándar. Control: plantas rociadas agua/limón. Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo al test LSD ($p < 0,05$).

V.3.1.3.3 Acumulación de depósitos de calosa

Tal como se observó en *Arabidopsis*, en las hojas de plantas de soja tratadas con EAF también se produjo un incremento en los depósitos de calosa los cuales se distinguen como zonas brillantes (Figura 30B), y estos fueron más abundantes en las hojas de plantas tratadas con EAF y posteriormente inoculadas con el patógeno (Figura 30D). En cambio no se observaron puntos brillantes en las hojas de plantas que solo se rociaron con agua/limón (Figura 30A) o que solo fueron desafiadas con *C. cassiicola* (Figura 30C).

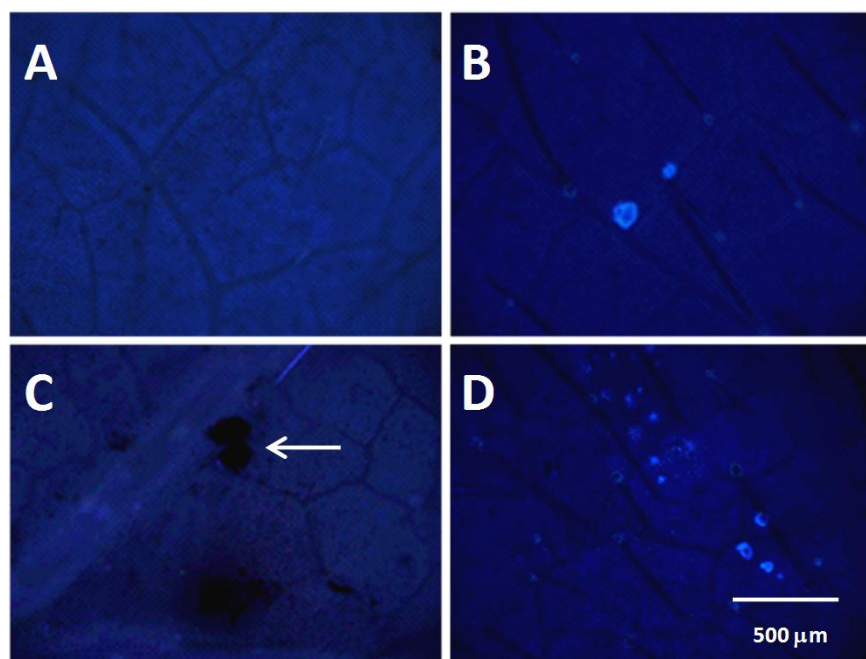


Figura 30: Acumulación de calosa en hojas de soja tratadas con EAF. Los depósitos de calosa se detectaron por tinción con azul de anilina bajo luz UV a los 5 dpt. Tratamientos: A y C, plantas rociadas con agua/limón (control); B y D, con EAF. Las plantas en C y D fueron además inoculadas con *C. cassiicola* a los 3 días del tratamiento. La flecha indica el síntoma inicial de la enfermedad.

V.3.1.4 Caracterización molecular de la respuesta de defensa inducida por EAF en soja

Considerando que el tratamiento con EAF en soja tuvo un efecto similar a lo observado en *Arabidopsis*, fue de nuestro interés conocer la expresión de algunos genes relacionados con las rutas de señalización de la defensa. En este caso, a diferencia de *Arabidopsis*, se evaluó la inducción local (en hojas tratadas con EAF) y sistémica (en hojas no tratadas directamente con EAF). En este caso se evaluaron el gen *PR1* como marcador de la vía del AS, el gen *PR10* de la vías del AJ/ET, y los genes de la calmodulinas *SCaM4* y *SCaM5*, las cuales son proteínas que regulan la transducción de la señal de calcio, el cual interviene en diferentes procesos de defensa contra patógenos.

En la Figura 31, se representa la expresión relativa de los genes *PR1*, *PR10*, *SCaM4* y *SCaM5* en tejido local y distal o sistémico. Se observa en general que los cuatro genes evaluados se inducen tanto en el tejido local como distal y que los niveles de expresión de los genes *PR1*, *PR10* y *SCaM4* en el tejido distal son mayores que en el local. Específicamente el gen *PR1* tiene un nivel de expresión superior al control en ambos tejidos (local y distal) en todos los tiempos de muestreo. El nivel de expresión

del gen *PR10* se incrementa en el tejido local en forma temprana (6hpt), mientras que en el tejido sistémico lo hace en tiempos tardíos (24 y 48 hpt). El nivel de expresión del gen *PR1* fue notablemente superior al del *PR10* (entre 2 a 10 veces) en todos los tiempos evaluados y en ambos tejidos.

Con respecto a la expresión de calmodulinas, se observa que *SCaM5* se sobreexpresa más fuertemente en el tejido local que en el tejido distal donde se mantiene hasta las 48 hpt, mientras que la expresión del gen *SCaM4* presenta un comportamiento inverso a *SCaM5*.

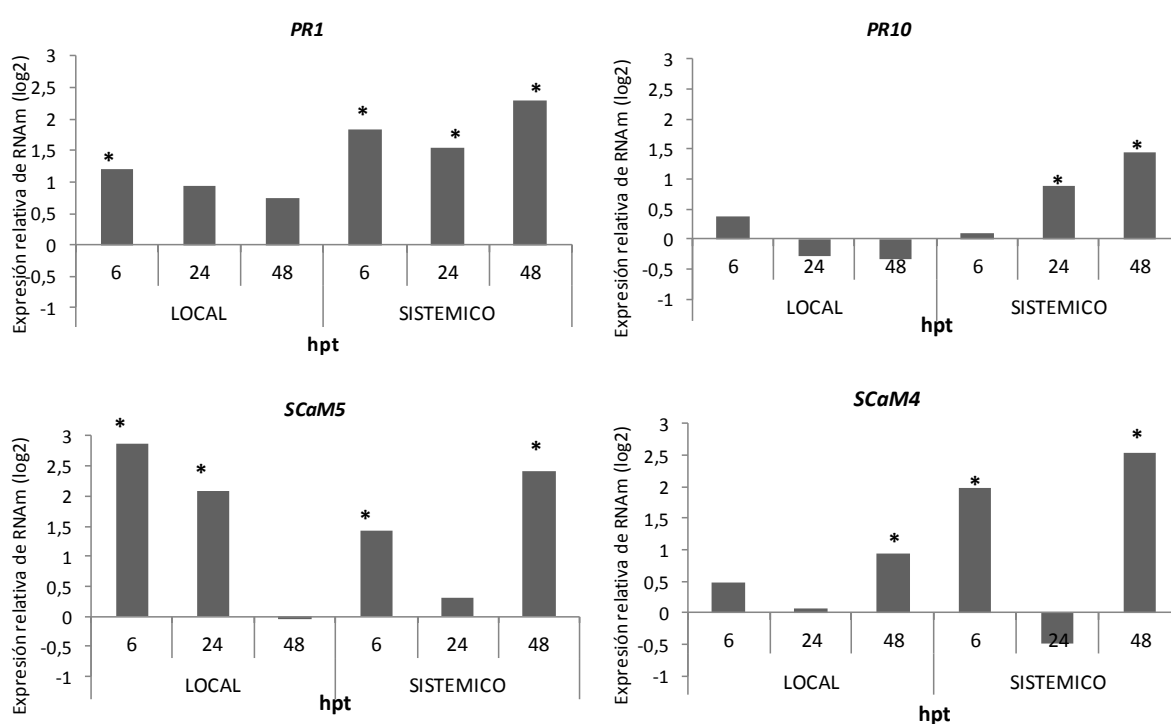


Figura 31: Expresión cuantitativa de genes de defensa en plantas de soja tratadas con EAF. Expresión relativa de cada gen evaluado en las plantas tratadas con EAF con respecto a plantas controles rociadas con agua/limón, la cual fue normalizada con respecto al gen de referencia de β -tubulina. Las barras representan valores promedios a partir de dos ensayos independientes con tres replicas biológicas para cada tratamiento (n=3). Los asteriscos indican diferencias significativas entre el control y las plantas tratadas con EAF, calculado mediante el programa LinReg ($p < 0,05$). Hay sobreexpresión génica por arriba de 0 y subexpresión por debajo de 0.

V.3.2 LIMONERO

V.3.2.1 Efecto *in vitro* de EAF sobre *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

En los empaques de limón, los frutos son sometidos a una primera desinfección con agua clorada (cloro 200 ppm) durante 2 min, con el objetivo de eliminar los patógenos que pueden contaminar la superficie. Para evaluar si el EAF era capaz de eliminar las bacterias de la superficie de la fruta al menos con la misma eficiencia que el hipoclorito de sodio, se realizó un ensayo de inhibición de *Xcc* en medio líquido, permitiendo que las bacterias estuvieran en contacto con el EAF solo por 2 min, tiempo en que las frutas son tratadas con el hipoclorito en las plantas de empaque. En la Tabla 8, se observa que las concentraciones de 0,1 y 0,05 g PF/mL de EAF y todas concentraciones de Cloro inhibieron el crecimiento de la bacteria. El agua con 5% de jugo de limón, (solvente de extracción del EAF) no tuvo efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Xcc*.

Tabla 8: Inhibición de *Xcc* en medio líquido con distintas concentraciones de EAF y Cloro.

	Concentración	Inhibición
Cloro (ppm)	200	+
	100	+
	50	+
EAF (g PF/mL)	0,1	+
	0,05	+
	0,025	-
Jugo de limón	5%	-

V.3.2.2 Efecto *in vivo* de EAF sobre *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Para evaluar la actividad antimicrobiana del EAF *in vivo*, se realizaron tratamientos en frutos naturalmente infectados con *Xcc* sumergiéndolos durante 2 min en una solución de 0,05 g PF/mL de EAF, la menor concentración que fue capaz de inhibir el crecimiento de *Xcc* en medio líquido (Tabla 8). Como control positivo se utilizó una solución de 200 ppm de Cloro (preparada a partir de hipoclorito de sodio) (Figura 32B), y como controles negativos de inhibición se utilizó agua destilada y el vehículo del EAF (5% de jugo de limón en agua) (Figura 32A y C). El tratamiento con

EAF disminuyó el número de bacterias capaces de producir canchros (Figura 32D) con respecto a los controles negativos, e incluso fue igual de activo que el control con cloro.

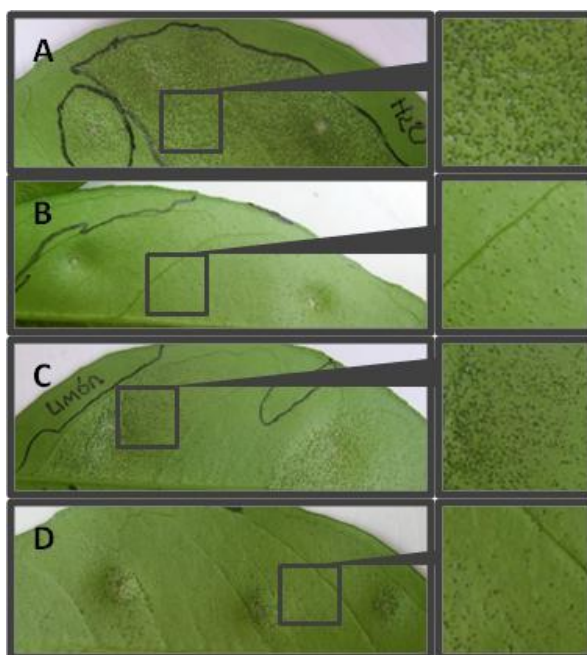


Figura 32: Síntomas de canchrosis en hojas de limonero. Las hojas fueron infiltradas con una suspensión de bacterias de la superficie de frutos sintomáticos, luego de que estos fueron sometidos a los siguientes tratamientos: A) agua destilada B) cloro 200 ppm C) jugo de limón al 5% en agua y D) EAF 0,05 g PF/mL. En el panel derecho se muestra una ampliación de la zona de la hoja seleccionada en cada caso.

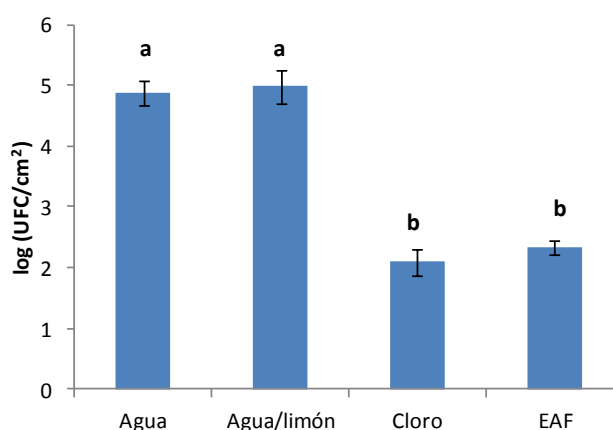


Figura 33: Cuantificación de la carga bacteriana en las hojas de limonero. Recuento de *Xcc* por superficie de las hojas de limonero (UFC/cm²), infiltradas con la suspensión de las bacterias recuperadas de la superficie de frutos tratados con: agua, agua/limón, cloro 200 ppm, y EAF 0,05 g PF/mL. Los resultados son el promedio \pm desvío estándar de tres experimentos independientes (n=5), a los 7 dpi. Letras diferentes indican diferencias significativas con $p \leq 0,05$

Al realizar el recuento de bacterias viables en las hojas infectadas (Figura 33), se observó que los tratamientos con cloro y EAF disminuyeron tres órdenes de magnitud la cantidad de UFC/cm² respecto al control tratado con agua destilada o agua/limón.

V.3.2.3 Efecto *in vitro* de EAF sobre *Penicillium digitatum*

Considerando la imperiosa necesidad de buscar métodos de control de hongos de poscosecha de cítricos, alternativos al uso de fungicidas de síntesis, se decidió evaluar la efectividad del extracto para inhibir el crecimiento de *Penicillium digitatum*, mediante ensayos de inhibición *in vitro* en medio sólido y líquido. En la Figura 34, se observa que el EAF inhibió el crecimiento del hongo en medio sólido APG, produciendo halos con bordes nítidos hasta la concentración de 0,2 g PF/mL (CIM).

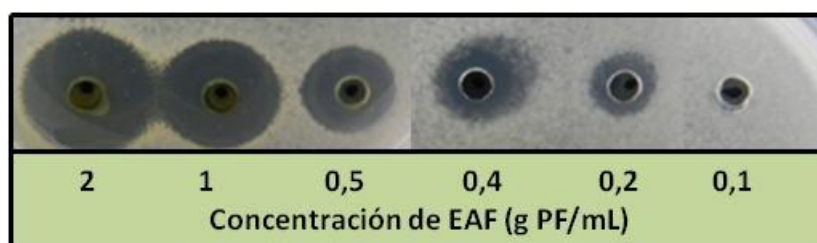


Figura 34: Inhibición de *P. digitatum* en medio sólido con diferentes concentraciones de EAF.

Como en el caso de *Xanthomonas*, también se evaluó el efecto de EAF sobre el crecimiento del hongo en medio líquido manteniendo las esporas en contacto con el EAF (0,2gPF/mL) por 2 min, aunque en este caso, este tiempo resultó insuficiente para inhibir la germinación de las esporas. De acuerdo a este resultado se ensayaron mayores tiempos de contacto. En la Figura 35 se observa que para que una concentración equivalente a la CIM del EAF inhibiera la germinación de las esporas de *P. digitatum*, fueron necesarios 3 días en contacto con el EAF. A partir de concentraciones menores a la CIM, el tiempo de exposición necesario aumentó, así para la concentración de 0,1 g PF/mL fueron necesarios 4 días de contacto, y 5 días para 0,05 g PF/mL. Como controles negativos de inhibición se utilizaron diferentes medios: agua, agua/limón y medio PG.

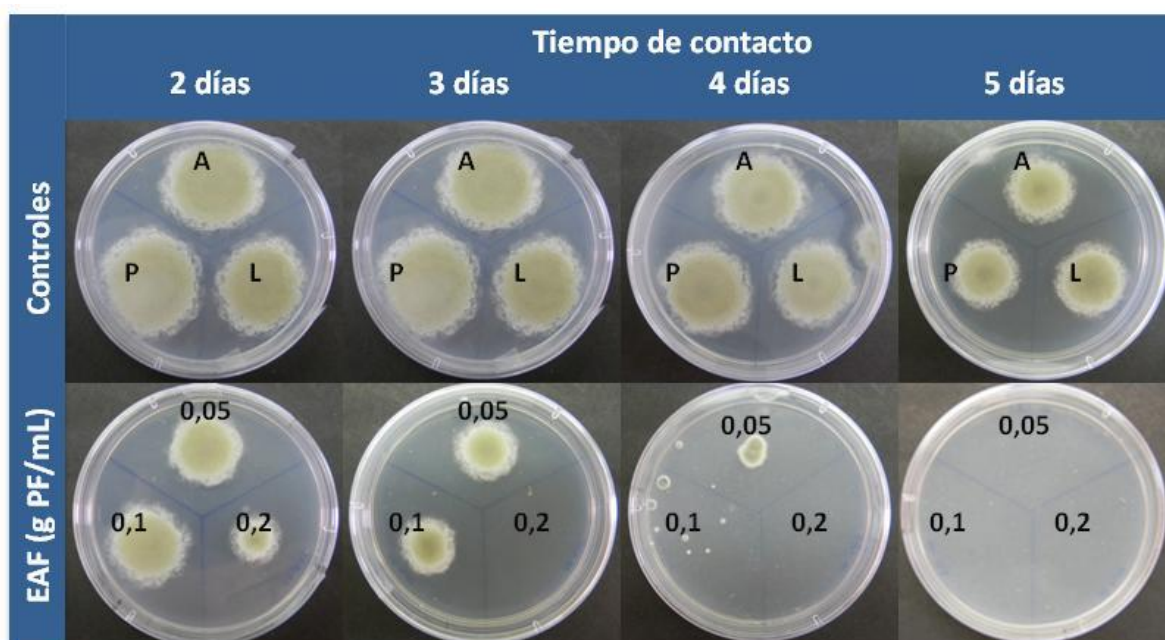


Figura 35: Desarrollo de colonias de *P. digitatum* a partir de las esporas tratadas con diferentes concentraciones de EAF (0,2, 0,1 y 0,05 g PF/mL) y los controles agua (A) medio papa-glucosado (P), jugo de limón al 5 % en agua (L), durante diferentes tiempos de contacto 2, 3, 4 y 5 días. El ensayo se realizó por triplicado y se muestra una imagen representativa de cada tratamiento. La fotografía fue tomada a los 5 días de incubación.

V.3.2.4 Efecto de aplicaciones de EAF sobre el desarrollo de *Penicillium digitatum* en frutos de limonero

Con los resultados obtenidos en el punto anterior, se eligieron 2 concentraciones de EAF (0,1 y 0,2 g PF/mL) para realizar los ensayos en frutos inoculados artificialmente con el hongo. El EAF fue aplicado 6 hs antes o 24 hs después de la inoculación para evaluar su efecto como preventivo o curativo, respectivamente. En la Figura 36, se muestra que en el tratamiento curativo, las dos concentraciones del EAF ensayadas produjeron una disminución tanto en la severidad como en la incidencia de los síntomas de la enfermedad con respecto a los controles (agua o agua/limón), y que la disminución observada estuvo correlacionada con la concentración utilizada. La menor concentración de 0,1 g PF/mL tuvo un efecto similar al control positivo, el fungicida IMZ, normalmente utilizado para tratamiento en poscosecha, mientras que la mayor concentración de EAF tuvo un mejor comportamiento que el IMZ.

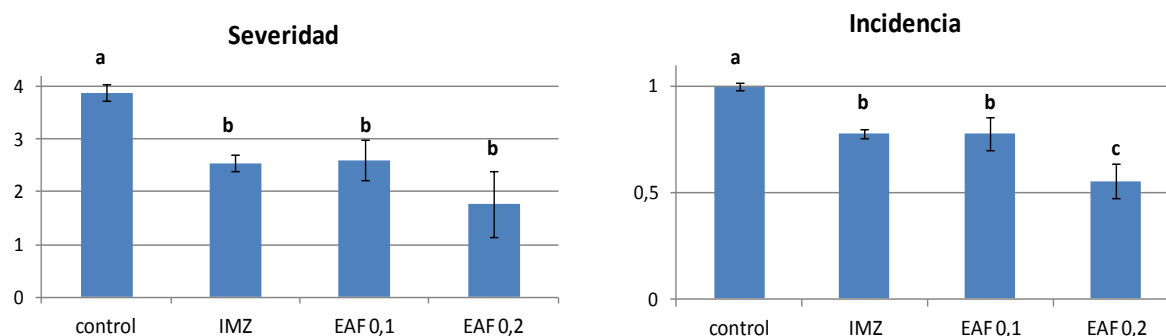


Figura 36: Efecto del tratamiento curativo con EAF en la severidad e incidencia de *moho verde* en frutos de limón. Los frutos fueron inoculados con una suspensión de esporas de *P. digitatum* y a las 24 hs fueron tratados con: agua (Control), Imazalil 500 ppm (IMZ) y EAF 0,1 y 0,2 g PF/mL. Las barras representan valores promedios a partir de tres ensayos independientes con 2 repeticiones de 10 limones cada una (n=10). Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$.

En cuanto al tratamiento preventivo con EAF (Figura 37), en donde la aplicación del EAF se realizó previamente a la inoculación con el patógeno, también se observó un efecto en la disminución del desarrollo de los síntomas de la enfermedad, tanto en la severidad con la incidencia, y al igual que en el tratamiento curativo, este efecto estuvo correlacionado con la concentración del EAF. Con la concentración de 0,2 g PF/mL se alcanzó una reducción de la severidad e incidencia de la enfermedad de casi el 50% con respecto al control con agua, reducción aun mayor que la obtenida con el tratamiento control con IMZ.

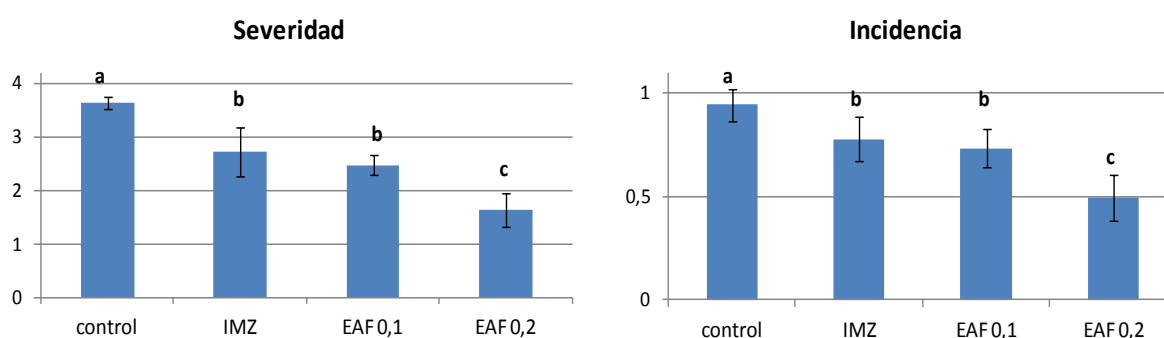


Figura 37: Efecto del tratamiento preventivo con EAF en la severidad e incidencia de *moho verde* en frutos de limón. Los frutos fueron rociados con EAF (0,1 o 0,2 g PF/mL), agua (Control) o Imazalil (IMZ, 500 ppm), 6 hs previas a la inoculación con una suspensión de esporas de *P. digitatum*. Las barras representan valores promedios a partir de tres ensayos independientes con 2 repeticiones (n=10). Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$.

En la Figura 38, se muestra un detalle de la apariencia de los frutos en un ensayo curativo en donde se observa el desarrollo de los síntomas del moho verde a los 6 días posteriores a la inoculación.

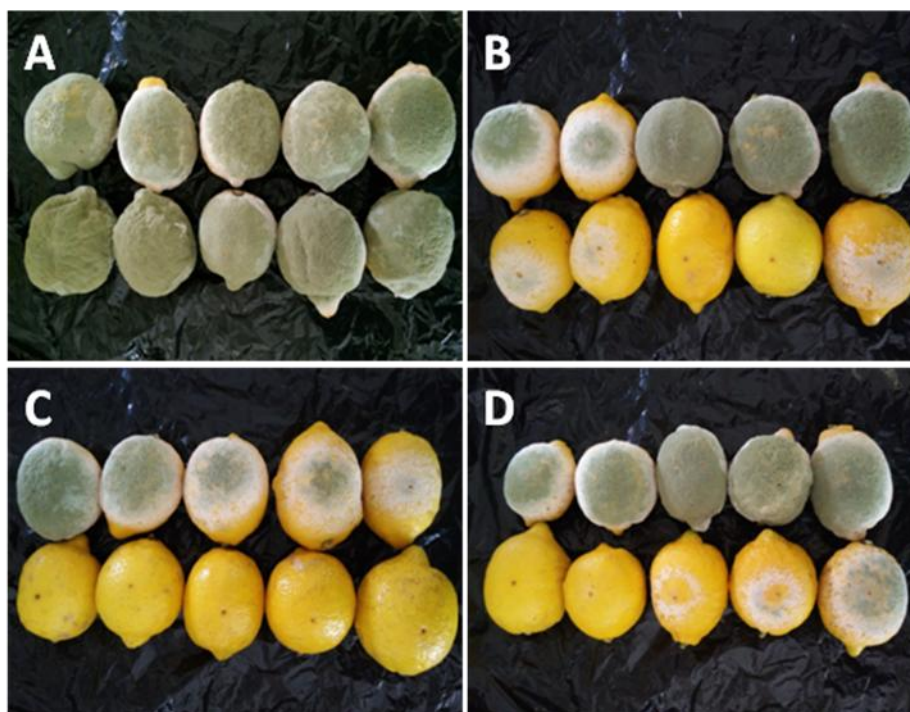


Figura 38: Desarrollo de *Penicillium digitatum* en un ensayo curativo con EAF. Los frutos fueron inoculados con *P. digitatum* y a las 24 hs posteriores tratados con agua (A), Imazalil 500 ppm (B), EAF 0,2 g PF/mL (C) y EAF 0,1 g PF/mL (D).

V.3.3 CAÑA DE AZUCAR

V.3.3.1 Ensayos de protección contra *Acidovorax avenae*

El interés de evaluar el efecto del EAF en caña de azúcar fue que, más allá de ser un cultivo de gran importancia regional, los compuestos activos nunca habían sido evaluados en una especie vegetal monocotiledónea. Al igual que en *Arabidopsis* y soja, el objetivo fue evaluar si el EAF era capaz de inducir las defensas naturales en este cultivo contra un patógeno de importancia como la bacteria *Acidovorax avenae*. En este sentido fue necesario determinar previamente si EAF tenía actividad antimicrobiana contra este microorganismo para definir las concentraciones a utilizar en el ensayo de inducción.

Mediante ensayo de inhibición en agar se determinó que el EAF fue capaz de inhibir el crecimiento de *Acidovorax avenae* y que la menor concentración a la que se

observó halo de inhibición fue de 0,025 g PF/mL. De este modo, se decidió utilizar una concentración de 0,012 g PF/mL (la inmediatamente inferior a la CIM) para los ensayos de inducción de defensa.

En este ensayo se evaluó el efecto del EAF en la variedad TUC 77-42 la cual se comporta como susceptible a *A. acidovorax*, y en la variedad LCP 85-384, la cual es considerada como moderadamente resistente a la enfermedad.

Las plantas de ambas variedades fueron rociadas con el EAF, con agua o agua/limón (estos dos últimos como controles de infección), 5 días previos a la inoculación con una suspensión de la bacteria. La evaluación se realizó hasta los 18 dpi determinándose incidencia y severidad de la enfermedad. Los primeros síntomas comenzaron a aparecer ya a los 2dpi, y la primera evaluación se realizó a los 5 dpi en donde se observó por ejemplo en los controles con agua o agua/limón, que las diferencias entre ambas variedades en cuanto al comportamiento frente a la enfermedad, se evidenciaron más en la severidad que en la incidencia (Figura 39). En las plantas tratadas con el EAF no se observaron diferencias en la severidad en ninguna de las dos variedades con respecto al control de infección. Mientras que, al evaluar la incidencia, se observó que aunque en las dos variedades el tratamiento con el EAF produjo una disminución significativa con respecto al control de infección, la reducción fue mayor en la variedad resistente (29%) que en la susceptible (14%) (Figura 39).

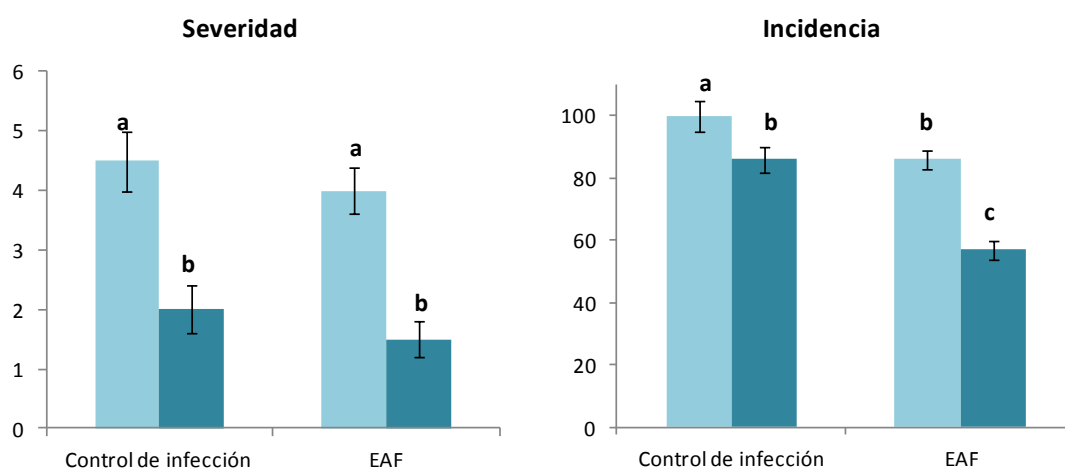


Figura 39: Severidad e incidencia de la estría roja en plantas de caña de azúcar tratadas con EAF. Las plantas fueron rociadas con EAF o agua (control de infección), 5 días previos a la inoculación con una suspensión bacteriana. Variedades de caña de azúcar: TUC 77-42 (■) y LCP 85-384 (■).

Como en los ensayos con soja y Arabidopsis, el agua/limón empleado en la extracción del EAF fue utilizado con control de infección al igual que el rociado con agua. En ambos casos los resultados obtenidos fueron idénticos.

V.3.4 Cálculo de la capacidad potencial de producción del EAF en la provincia de Tucumán

Durante la década de los '90 se han desarrollado nuevos nichos de mercado para productos agroalimentarios orgánicos. El escenario internacional es de creciente demanda, fundamentalmente motivada por cambios en las preferencias de los consumidores. Argentina se halla muy bien posicionada para responder a la misma, y ocupa el segundo lugar en el mundo, con 3,1 millones de hectáreas cultivadas, según "The World of Organic Agriculture", detrás de Australia con 17,1 millones de hectáreas, (González, y Valera, 2015).

Según explican desde el Movimiento Argentino para la Producción Orgánica (MAPO), una ONG donde están nucleados los grandes productores de orgánicos que exportan, se considera como producto orgánico al que ha sido elaborado sin la utilización de agroquímicos, aditivos químicos ni organismos genéticamente modificados. Se trata de un rubro que está en constante crecimiento, y que en el 2014 alcanzó aproximadamente las 170.000 toneladas exportadas. El consumo en el país, en tanto, demanda unas 3.400 toneladas, según datos aportados por la Comisión Directiva de MAPO.

Los productos orgánicos argentinos tienen un sistema de control riguroso que les vale la aceptación y el prestigio mundial. Con su certificado de orgánicos pueden ingresar en la Comunidad Europea, porque tiene equivalencia con la Ley Orgánica europea. Es el único país en América latina que tiene esa cualidad; algo que debería aprovecharse para aumentar las ventas externas, (<http://www.lanacion.com.ar/1825257-la-argentina-tiene-revancha-de-la-mano-de-los-organicos>).

El objetivo general de este trabajo fue diseñar un extracto en el que se encontraran presentes los dos compuestos bioactivos previamente caracterizados por las Dras. Mamani y Filippone (Tesis doctorales). La idea era optimizar un protocolo compatible con un desarrollo comercial. Es así que, además de evaluar sus propiedades biológicas, nos planteamos analizar qué capacidad potencial habría en la provincia de Tucumán como principal proveedor de la materia prima necesaria para la elaboración

del EAF, las hojas de frutilla. Para ello se hicieron los siguientes cálculos teóricos de la producción anual de EAF que se podría obtener en la provincia de Tucumán. Considerando que según datos de INTA, la superficie promedio destinada al cultivo de la frutilla en la provincia de Tucumán en los últimos 5 años oscila alrededor de 350 ha, (<http://inta.gob.ar/noticias/frutilla-condiciones-del-cultivo-en-el-inicio-de-la-cosecha-en-tucuman>) y de acuerdo a datos experimentales realizados durante este trabajo, que indican que la cantidad promedio de hojas que se puede cosechar por planta es un mínimo de 0,5 Kg, la cantidad total teórica de hojas que se podrían disponer para la elaboración del EAF es de 27.500 kg/ha/año.

La potencial demanda del producto dependerá de los beneficios que se obtengan en cada cultivo que sea evaluado. Hasta el momento de la realización de este trabajo, solo se tenían datos fehacientes del efecto beneficioso en el control de patógenos en frutilla y preliminarmente en cítricos. Por ese motivo, este trabajo de tesis representa un avance en el conocimiento de la potencial aplicación en otros cultivos. Lo importante era conocer cómo se comportaba el producto en los principales cultivos de la provincia, como la soja, caña o limonero. Haciendo un ejercicio de qué demanda potencial se podría cubrir con una producción local de EAF, tomamos como ejemplo la concentración de EAF 0,1 gPF/mL la cual resultó efectiva como inductora de la defensa en la soja. Así por ejemplo, en el caso de soja, la superficie neta de este cultivo en Tucumán, para la campaña 2016/2017, fue estimada en 203.430 ha (Fandos y col., 2017). La dosis de EAF a aplicar es de 100 L/ha, por lo que para la totalidad de la superficie de soja de la provincia, se necesitaría producir una cantidad de extracto proveniente de aproximadamente 74 ha de frutilla (Tabla 9). En el caso de caña de azúcar y limonero, se necesitarían aproximadamente 150 o 700 ha de frutilla, respectivamente, para producir la cantidad de EAF necesaria para tratar la superficie total de estos cultivos de la provincia.

Tabla 9: Cálculo teórico de la producción de EAF para aplicar en diferentes cultivos.

Cultivo	Sup. del cultivo en Tucuman (ha)	Volumen de aplicación /ha	Volumen de EAF para cubrir sup. total	Sup. de frutilla para producción de EAF (ha)
Soja	203.000	100L	20.300.000	74
Caña	270.000	150L	40.500.000	147
Limonero	38.000	5000L	190.000.000	690

Según se muestra en la Tabla 9, la superficie del cultivo de frutilla en Tucumán permitiría disponer de hojas para obtener un volumen de EAF suficiente para tratar el equivalente aproximado de 5 veces la superficie implantada con soja, 2 veces la de caña de azúcar o el 50% de la superficie con limonero de la provincia. De igual forma en Argentina existen otras provincias productoras de frutilla que podrían ser potenciales proveedoras de material vegetal para el EAF.

Aunque el análisis económico es algo que deberá realizarse para definir la conveniencia de la producción del EAF, a estas alturas parece muy prematuro ya que se deben considerar otros factores intervinientes. Sin embargo, se puede predecir que los costos de los insumos son de baja incidencia, por lo que la producción del EAF parecería tener un futuro prometedor.

Nuestro propósito es disminuir o reemplazar el uso de agroquímicos de síntesis, por un producto biodegradable como el EAF, y que además permita a los productores ingresar dentro de la agricultura orgánica.

En conclusión, estos datos nos permiten demostrar que la producción del EAF a gran escala sería factible y viable para la aplicación en un cultivo extensivo de gran interés económico de la provincia de Tucumán. Por otro lado, la tecnología EAF podría ser introducida en los cultivos hortícolas de nuestra región, de la cual una de los más importantes es la producción de frutilla. Así proponemos que la introducción de EAF en la producción orgánica de frutilla en nuestra provincia cerraría un ciclo, ya que el mismo material vegetal que normalmente se descarta en la etapa final del cultivo, serviría para la producción de EAF para el manejo del cultivo orgánico.

V.4 DISCUSIÓN

Los primeros agroquímicos que se usaron en la agricultura, antes del surgimiento de los compuestos orgánicos sintéticos en la primera mitad del siglo XX, fueron polvos o extractos de plantas como tabaco, crisantemo y la rotenona (Montes-Belmont, 2009). A lo largo de la historia, los “biopreparados” se han desarrollado a partir de la observación empírica de los procesos y efectos de control que realizaban dichos productos. En los últimos años, estos procesos de observación que han realizado principalmente los agricultores, han comenzado a interesar a investigadores, empresas e instituciones gubernamentales que han planteado su uso extensivo y comercial para la agricultura de pequeña y gran escala.

Los resultados obtenidos en este trabajo, demostraron que EAF aplicado en plantas de soja, produjo una disminución de la enfermedad de la mancha anillada producida por el hongo *C. cassicola*. Se demostró que la reducción en la sintomatología de la enfermedad (incidencia y severidad) fue similar a la obtenida en plantas tratadas con el inductor comercial Bion 500 (Syngenta). También se determinó que ésta reducción en los síntomas fue acompañada con marcadores bioquímicos y moleculares de la defensa, por lo que el efecto del EAF estaría asociado a la inducción de las defensas propias de la planta.

Los extractos vegetales de cada planta pueden tener hasta más de sesenta componentes y de ellos puede haber varios con propiedades benéficas para los cultivos. Generalmente están presentes como mezclas y los patógenos pueden ser afectados diferencialmente por los compuestos individuales o por las mezclas (Montes-Belmont, 2009). La actividad de un compuesto puede variar según se encuentre en estado puro o en un extracto en donde la concentración y la relación con otros compuestos pueden disminuir o potenciar su actividad. Según lo observado en este trabajo, en el EAF se encuentran presentes los dos compuestos previamente caracterizados en nuestro grupo (Filippone y col., 1999; Mamaní y col., 2012), y los cuales se pretendían conservar modificando un protocolo de extracción, compatible con un desarrollo tecnológico. Dependiendo de la concentración, estos compuestos tienen una actividad dual, como antimicrobianos o como inductores de la defensa, actividad que se mantuvieron en el EAF.

El interés en las moléculas inductoras de los mecanismos naturales de defensa de las plantas, surgió por su contribución al control de patógenos y plagas, ya que

presentan el potencial de disminuir y/o evitar el riesgo de emergencia de poblaciones de resistentes a productos químicos, contrarrestar parcialmente los daños ocasionados a la planta por los pesticidas y originar aumento del rendimiento de las cosechas. En soja se han reportado inductores de la defensa, así por ejemplo Park y col. (2001), demostraron que el tratamiento de cotiledones de soja con el elicitor β -1,3/1,6 glucano derivado de la pared celular de *Phytophthora sojae* (WGE) fue efectivo en inducir la resistencia a la posterior infección con *P. sojae*, al igual que el ácido jasmónico (AJ) y el precursor de etileno (ET), el ácido carboxílico 1-amino-ciclopropano. Abdel-monaim y col. (2012), observaron que semillas de soja embebidas con una combinación de BTH y ácido húmico protege a las plantas contra la enfermedad causada por *Fusarium oxysporum* en condiciones de invernadero y a campo. Los compuestos mencionados no tienen actividad antimicrobiana (Nafie y Mazen, 2008), lo que sugiere que podrían estimular los mecanismos de defensa permitiendo a la planta responder más rápidamente a la invasión y colonización del hongo. Además el tratamiento con dichos compuestos incrementó el contenido de compuestos fenólicos en las plantas.

La inducción de marcadores moleculares particularmente asociados a la activación de las defensas vegetales nos permitiría confirmar que este sería el mecanismo por el cual el EAF disminuyó la incidencia de la mancha anillada en soja, al igual que lo observado en *Arabidopsis* en el Capítulo IV de este trabajo. Así por ejemplo la síntesis y acumulación de proteínas relacionadas a la patogénesis (PR) en respuesta a patógenos invasores o estrés abiótico es uno de los componentes cruciales en el repertorio de mecanismos de defensa vegetal. La familia de genes *PR1* es una de las más estudiadas y fue reportada como un buen marcador de la vía de defensa dependiente del ácido salicílico (AS). La clase 10 de las proteínas PR (*PR10*) es otra de las familias génicas más importantes en respuesta a la invasión por hongos, son intracelulares y su inducción ha sido demostrada en diferentes especies vegetales luego de la infección con patógenos (Matton y Brisson, 1989; McGee y col., 2001; Robert y col., 2001; Xie y col., 2010), frente a salinidad (Hashimoto y col., 2004), sequía (Dubods y Plomion, 2001), herbicidas (Castro y col., 2005) y luego del tratamiento con hormonas vegetales, tales como AJ (Rakwal y col., 1999; McGee y col., 2001), AS (McGee y col., 2001), y ET (Poupard y col., 2003). También se ha reportado la actividad antimicrobiana y RNasa de las proteínas *PR10* (Kim y col., 2008, Xu y col., 2014). La sobreexpresión del gen *PR10* de soja en plantas de tabaco y soja incrementó la resistencia contra *P. nicotianae* y *P. sojae*, respectivamente. Lo cual sugiere que la

proteína *PR10* juega un rol importante en la defensa vegetal (Xu y col., 2014). Nuestros resultados demostraron que EAF induce la expresión de *PR1* y *PR10*, tanto en tejido local como sistémico, a partir de las 6 hpt, y esta inducción se mantiene hasta las 48 hs en el tejido sistémico. La sobreexpresión de *PR1* en soja sugiere la participación de la vía del AS lo cual estaría en concordancia con los resultados obtenidos en Arabidopsis en este trabajo de tesis y con lo reportado por Mamani y col (2012), en donde se demostró que el tratamiento con el HeT produjo un incremento del AS en frutilla. Igualmente, la sobreexpresión de *PR10*, sugiere la activación de la vía del AJ/ET, por lo que estos resultados confirmarían que la inmunidad activada por el EAF involucra la participación de las tres vías.

Otros de los genes inducidos por el EAF en plantas de soja fueron los de las calmodulinas *SCaM-4* y *SCaM-5* a las 6 y 48 hpt. El influjo del ión Ca^{2+} es uno de los eventos más tempranos en células desafiadas y es esencial para la activación de genes relacionados a la defensa y la muerte celular hipersensible. Heo y col., (1999) observaron que existe una diferencia funcional entre las distintas isoformas de los genes CaM en plantas, los cuales regulan la transducción de la señal de calcio en la célula. Solo *SCaM-4* y *SCaM-5* son inducidas por patógenos e incrementan las respuestas de defensa vegetal y actuarían como señales receptoras y transmisoras de la señal de Ca^{2+} . Mientras que las isoformas de CaM altamente conservadas tales como *SCaM-1* y *SCaM-2* no tienen estas propiedades. Harding y col, (1997) propusieron que la activación de CaM por Ca^{2+} estimula la NAD quinasa lo que resulta en un incremento de los niveles celulares de NADPH que luego activan la NADPH oxidasa, la cual produce EROs. Se piensa que esta vía Ca^{2+} /CaM en la producción de EROs es mediada por las isoformas de CaM altamente conservadas, ya que las formas divergentes son incapaces de activar la NAD quinasa (Lee y col., 1995, 1997).

Heo y col., (1999) y posteriormente Park y col., (2004b), determinaron que los genes *SCaM-4* y *SCaM-5* en soja fueron inducidos en suspensiones celulares tratadas con elicitores fúngicos, pero no por peróxido de hidrógeno o AS. También se ha reportado que la expresión transgénica constitutiva de *SCaM-4* y *SCaM-5* en plantas de tabaco activó la inducción de lesiones e indujo genes del tipo PR, asociados a la resistencia sistémica adquirida (SAR). Incluso la sobreexpresión de los genes *SCaM-4/-5* induce expresión de PR e incrementa la resistencia en plantas de Arabidopsis (Park y col., 2004a).

La inducción de los genes *SCaM-4* y *SCaM-5* en plantas de soja tratadas con el EAF sería otra evidencia de que el incremento de la resistencia a la mancha anillada, sería consecuencia de la capacidad del EAF para inducir los mecanismos de inmunidad de la propia planta y en los que tendría participación el Ca^{2+} .

Otro de los objetivos propuestos en este trabajo fue evaluar la efectividad de EAF en limonero considerando que es uno de los principales cultivos de la región NOA, y que además existe el antecedente que el tratamiento con el HeT y un extracto enriquecido en el mismo, produjo una disminución de los síntomas de cancrrosis (Mamaní y col., 2012). La *Xcc* puede contaminar la superficie de fruta y generar rechazo en los mercados de destino (Cubero, 2001; Canteros y col, 2011), por lo que es de gran interés para la industria la búsqueda de productos antimicrobianos alternativos a los tratamientos actuales como el cobre o el cloro en poscosecha, los cuales generan residuos tóxicos. La bibliografía cita numerosas antecedentes de la sensibilidad de esta bacteria a extractos y/o compuestos vegetales. Así por ejemplo el extracto metanólico de hojas de *Psidium guajava* L. que contiene metabolitos secundarios tales como flavonoides, fenólicos, triterpenoides, saponinas y taninos (Sarah y col, 2012), y extractos acuosos de hojas de *Allium sativum* L., *Ocimum sanctum* L., *Datura stramonium* L., *Eucalyptus globus*, *Calotropis procera* (Ait.) (Jadhav y Deobhankar, 2013). La actividad de los extractos puede ser atribuida a los compuestos fenólicos que han demostrado tener altos niveles de actividad antimicrobiana (Lattanzio y col., 1994, 1996; Bendini y col., 2006). El ácido gálico (ácido 3, 4, 5-trihidroxibenzoico), un intermediario de la biosíntesis de los taninos hidrolizables en plantas, junto con sus derivados semibiosintéticos, los alquilgalatos, demostraron una potente actividad anti-*X. citri* subsp. *citri*, la cual puede ser correlacionada con el tamaño de la cadena carbonada (Silva y col., 2013).

En este trabajo de Tesis se demostró que el EAF posee actividad antimicrobiana contra la bacteria responsable de la cancrrosis. Al realizar el tratamiento de frutos con síntomas de la enfermedad, se demostró que EAF fue capaz de disminuir en forma significativa la población bacteriana que se encuentra en la superficie, o disminuir su patogenicidad, de una manera similar al cloro, utilizado en forma generalizada en los empaques cítricos.

Otra limitación importante en la industria de los cítricos es el manejo de enfermedades fúngicas de poscosecha. Los fungicidas utilizados para controlar estas enfermedades también dejan residuos persistentes que originan preocupaciones

alimenticias y también en la exportación. La búsqueda de alternativas a los productos sintéticos que se vienen utilizando en las empacadoras es activa, desde alternativas físicas como altas o bajas temperaturas, atmósfera controladas, irradiación, etc; químicas como recubrimiento de películas; o biológicas como el uso de microorganismos o productos bioactivos naturales (Sayago y col, 2012).

EAF demostró tener actividad antifúngica *in vitro* contra *P. digitatum* con una CIM de 0,2 g PF/mL en medio sólido y de 0,05 g PF/mL (4 veces menor) en medio líquido luego de 5 días de contacto. Además el tratamiento curativo y preventivo con EAF, disminuyó la incidencia y la severidad de la enfermedad de los frutos inoculados con *P. digitatum*, con mayor eficiencia que el control químico con el fungicida Imazalil. Existen antecedentes de extractos vegetales capaces de inhibir el crecimiento de *P. digitatum in vitro*, y en frutos infectados, así por ejemplo extractos acuosos de *Solanum nigrum* (Musto y col., 2014) y de plantas extremófilas obtenidos a partir de *Chuquiraga atacamensis*, *Parastrephia phylliciformis* y *Parastrephia lepidophylla*, (Sayago y col, 2012), como así también extractos metanólicos de hierbas comestibles como *Borago officinalis*, *Orobancha crenata*, *Plantago coronopus*, *P. lanceolata*, *Sanguisorba minor*, *Silene vulgaris*, *Sonchus asper* y *Taraxacum officinale* (Gatto y col., 2011).

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo se podría decir que el EAF posee una actividad ubicua en cuanto a la protección contra patógenos, ya que fue efectivo en diferentes especies vegetales, algo que también había sido previamente comprobado para los compuestos HgT y HeT puros. Sin embargo, en todos los casos los ensayos se realizaron con especies de plantas dicotiledóneas por lo que uno de los objetivos de este trabajo fue conocer el comportamiento de EAF en especies monocotiledóneas. Es así que el EAF fue ensayado en el patosistema caña de azúcar-*Acidovorax avenae*, y en este caso no se observó una disminución significativa en la severidad de la enfermedad, aunque si se evidenció un menor incidencia, la cual fue más marcada en una variedad con mayor resistencia a la enfermedad. Si bien este resultado, indicaría que el EAF no tendría la misma actividad de protección que en las plantas “dicotiledóneas evaluadas”, estos resultados son preliminares y para poder definir el comportamiento del EAF, deben realizarse mas ensayos modificando modo y tiempos de aplicación. Los antecedentes de uso de bioproductos y específicamente de extractos vegetales para el manejo fitosanitario de enfermedades en caña de azúcar no son muy abundantes. Peteira y col., (2008) reportaron el efecto inductor de la defensa de Fitomas sobre el control del ácaro *Steneotarsonemus spinki* en arroz. El Fitomas es un

bionutriente derivado de la industria azucarera producido por el Instituto Cubano de Investigaciones de Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), el cual se presenta como un formulado acuoso y se le atribuyen propiedades estimuladoras de distintos procesos fisiológicos en las plantas y acción antiestrés.

Aunque el uso de los extractos vegetales es más antiguo que los compuestos de síntesis, la diversidad química que ofrecen las plantas para aprovechar y generar alternativas de manejo fitosanitario compatibles con la vida, es inmensa por no decir infinita. Se estima que aproximadamente solo el 2% de las plantas superiores han sido evaluadas en sus propiedades pesticidas. La utilización práctica de este tipo de productos requiere una predisposición favorable de los agricultores. La percepción de la eficacia no es fácil, en muchos casos la actividad no puede valorarse con el mismo criterio que un fitosanitario biocida, es necesario el “entrenamiento” de los productores. El futuro implica el menor uso de fitosanitarios de síntesis, una nutrición basada en la utilización racional de fertilizantes, y en la interrelación entre nutrición y sanidad. En definitiva, el futuro requiere utilizar herramientas acordes con el concepto de “Salubridad Global de los Cultivos”. Por ello es importante continuar desarrollando investigaciones que descubran la enorme diversidad y potencialidad que nos ofrece la naturaleza.

V.5 CONCLUSIONES PARCIALES

- Se optimizó el patosistema de soja - *Corynespora cassiicola*, agente causal de la mancha anillada, en condiciones controladas.
- El EAF produjo una disminución de los síntomas de la enfermedad de la mancha anillada, mediante aplicaciones previas a la inoculación tanto en tejido local como sistémico.
- El efecto protector del EAF en soja estuvo acompañado de eventos bioquímicos y moleculares asociados con los mecanismos de inducción de las defensas vegetales tales como la producción de EROs, deposición de calosa y acumulación de compuestos fenólicos totales en hojas, y de la expresión de genes de defensa asociados a las vías de señalización del ácido salicílico, el ácido jasmónico y el etileno.
- El EAF inhibió el crecimiento *in vitro* de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, agente causal de la enfermedad cuarentenaria “cancrosis de los cítricos” (CIM 0,05 g PF/mL), y de *Penicillium digitatum*, agente causal de la “podredumbre verde” de alta incidencia en poscosecha de frutos (CIM 0,2 g PF/mL).
- La concentración de EAF correspondiente a la CIM para *Xcc* aplicada sobre limones con síntomas de cancrrosis, redujo la población bacteriana a los mismos niveles que el tratamiento convencional con cloro.
- La concentración de EAF correspondiente a la CIM para *Penicillium digitatum* aplicada sobre limones, tanto previa como posteriormente a la inoculación con el hongo, produjo una mayor disminución de la incidencia y severidad de la podredumbre verde con respecto al tratamiento convencional con el fungicida sintético Imazalil.
- El tratamiento de plantas de caña de azúcar con una concentración de EAF subinhibitoria para *Acidovorax avenae*, produjo una disminución de la incidencia de la estria roja del 20% y 15%, en una variedad moderadamente resistente y susceptible, respectivamente, pero no redujo la severidad de la enfermedad.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES GENERALES Y PROYECCIONES

CONCLUSIONES GENERALES

- En este trabajo de tesis, se optimizó el protocolo de obtención de un extracto acuoso a partir de hojas de frutilla (EAF) enriquecido en los compuestos fenólicos HeT y HgT, en el cual se disminuyó la complejidad, el costo y toxicidad con respecto a los extractos EM y EA-TFA.
- El EAF posee mayor actividad antimicrobiana, cantidad de compuestos fenólicos y de los compuestos bioactivos HeT y HgT que los extractos EM y EA-TFA.
- El EAF fue capaz de inducir los mecanismos de inmunidad innata en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, contra patógenos de dos estilos de vida diferentes.
- El EAF fue capaz de reducir el desarrollo de enfermedades en cultivos de importancia regional: soja, limonero y caña de azúcar.
- El EAF redujo la incidencia y severidad de los síntomas de *Corynespora cassiicola* en soja, por un efecto de inducción de los mecanismos de defensa de la propia planta, tanto en tejido local como sistémico.
- El EAF no fue capaz de reducir la severidad de la estria roja en caña de azúcar, aunque si produjo una disminución en la incidencia de la enfermedad.
- Concentraciones antimicrobianas de EAF fueron capaces de disminuir la carga patógena de *Xanthomonas citri* subsp *citri* y el desarrollo de síntomas causados por *Penicillium digitatum* sobre frutos de limonero, de una manera más eficiente que los tratamientos convencionales con cloro o Imazalil.
- La actividad del EAF sería de carácter dual: como antimicrobiano y como inductor de la defensa vegetal y esta última sería ubicua, considerando que el EAF fue efectivo en patosistemas diferentes.
- La provincia de Tucumán tendría el potencial para la producción de EAF necesario para complementar el manejo fitosanitario de los principales cultivos de importancia regional.

PROYECCIONES

- Si bien los objetivos propuestos en este trabajo de Tesis Doctoral se cumplieron en su totalidad, los resultados obtenidos son muy alentadores para seguir avanzando en la caracterización de las propiedades de este extracto en vistas a las posibilidades de realizar una formulación comercial que pueda ser utilizada en el manejo fitopatológico sustentable de las enfermedades de los cultivos. Para ello es necesario llevar a cabo ensayos a campo y de mayor escala, para lo cual se tiene proyectado la puesta en marcha de la planta piloto diseñada en este trabajo, para obtener mayores volúmenes del EAF.
- Además hay que profundizar en la evaluación del EAF en la protección contra enfermedades en especies de plantas monocotiledóneas como caña de azúcar, ya que la evaluación preliminar realizada en este trabajo, dió indicios de que podría funcionar en este grupo de plantas.

CAPITULO VII

BIBLIOGRAFÍA

<

- Abdel-monaim M F, Ismail ME, Morsy KM (2012)** Induction of systemic resistance in soybean plants against Fusarium wilts disease by seed treatment with benzothiadiazole and humic acid. *African Journal of Biotechnology* 11(10), 2454-2465
- Achicanoy López H (2001)** Estrategias integradas para el control de enfermedades de las plantas. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 54(1-2), 1251-1273.
- Adie BAT, Perez-Perez J, Perez-Perez MM, Godoy M, Sanchez-Serrano JJ, Schmelz EA, Solanoa R (2007)** ABA Is an Essential Signal for Plant Resistance to Pathogens Affecting JA Biosynthesis and the Activation of Defenses in Arabidopsis W. *The Plant Cell* 19, 1665–1681.
- Alarcón-Rodríguez NM, Lozoya-Saldaña H, Valadez-Moctezuma E, García-Mateos M, Colinas-León MT (2013)** Diversidad genética del tizón tardío de la papa [*Phytophthora infestans* (Mont) de Bary] en Chapingo, México. *Agrociencia* 47 (6), 593-607.
- Allen PM, Gottlieb D (1970)** Mechanism of action of the fungicide Thiabendazole, 2-(4'-thiazolyl) benzimidazole. *Applied Microbiology* 20, 919-926.
- Almeida IMG (2008)** Doenças causadas por Bactérias. En: *Cana-de-açúcar*. Eds. Miranda E., Vasconcelos A., Landell M. Campinas, São Paulo, Brasil, 437-450.
- Amil-Ruiz F, Blanco-Portales R, Muñoz-Blanco J, Caballero JL (2011)** The strawberry plant defense mechanism: a molecular review. *Plant and Cell Physiology* 52 (11), 1873-1903.
- Araújo L, Stadnik MJ, Borsato LC, Valdebenito-Sanhueza R (2008)** Fosfito de potássio e ulvana no controle da mancha foliar da gala em macieira. *Tropical Plant Pathology* 33, 148-152.
- Aranega-Bou P, de la O Leyva M, Finiti I, García-Agustín P, González-Bosch C (2014)** Priming of plant resistance by natural compounds. Hexanoic acid as a model. *Frontiers in plant science* 5, 488.
- Arroyo FT, Moreno J, Daza P, Boianova L, Romero F (2007)** Antifungal activity of strawberry fruit volatile compounds against *Colletotrichum acutatum*. *Journal of agricultural and food chemistry* 55 (14), 5701-5707.
- Augier L, Gastaminza G, Lizondo M, Argañaraz M, Willink E (2006)** Presencia de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) en el Noroeste Argentino (NOA). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 65, 67-68.
- Badgley C, Moghtader J, Quintero E, Zakem E, Chappell MJ, Aviles-Vazquez K, Samulon A, Perfecto I (2007)** Organic agriculture and the global food supply. *Renewable Agriculture and Food System* 22 (2), 86-108.
- Bai Y, Zhou X, Smith D (2003)** Crop ecology, management & quality. Enhanced Soybean. Plant Growth Resulting from Coinoculation of Bacillus Strains with Bradyrhizobium japonicum. *Crop Science* 43, 1774-1781.
- Barbieri MA (2009)** Evaluación de extractos de hojas de frutillas para el manejo de enfermedades vegetales. Tesis de grado.

- Barg Venturini R, Queirós F, Ugón A (2007)** Agricultura agroecológica – orgánica en el Uruguay. Principales conceptos, situación actual y desafíos. ISBN 978-9974-96-199-9.
- Barthe P, Pujade-Renaud V, Breton F, Gargani D, Thai R, Roumestand C, De Lamotte F (2007)** Structural analysis of cassiicolin, a host-selective protein toxin from *Corynespora cassiicola*. Journal of molecular biology 367(1), 89-101.
- Bartwal A, Mall R, Lohani P, Guru SK, Arora S (2013)** Role of Secondary Metabolites and Brassinosteroids in Plant Defense Against Environmental Stresses. Journal of Plant Growth Regulation 32, 216. doi:10.1007/s00344-012-9272-x
- Beck JJ, Coats JR, Duke SO, Koivunen ME (Eds.) (2013)** Pest Management with Natural Products. American Chemical Society.
- Behlau F, Belasque J, Graham JH, Leite RP (2010)** Effect of frequency of copper applications on control of citrus canker and the yield of young bearing sweet orange trees. Crop Protection 29, 300-305
- Benhamou N, Kloepper JW, Quadt-Hallmann A, Tuzun S (1996)** Induction of defense related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. Plant Physiology 112, 919-929.
- Benhamou N, Kloepper JW, Tuzun S (1998)** Induction of resistance against Fusarium wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultra structure and cytochemistry of the host response. Planta 204, 153-168.
- Bendini A, Cerretani L, Pizzolante L, Gallina Toschi T, Guzzo F, Ceoldo S, Marconi AM, Andretta F, Levi M (2006)** Phenol content related to antioxidant and antimicrobial activities of Passiflora spp. extracts. European Food Research and Technology 223, 102–109.
- Bennett RN, Wallsgrove RM (1994)** Secondary metabolites in plant defence mechanisms. New Phytologist 127 (4), 617–633.
- Barbehenn RV, Constabel PC (2011)** Tannins in plant-herbivore interactions. Phytochemistry 72, 1551–1565
- Bertani RP, Henriquez DD, Funes C, Joya CM, González V, Cuenya MI, Ploper LD (2015)** Evaluación de técnicas de inoculación artificial en el patosistema caña de azúcar-*Acidovorax avenae*. XV Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Poster
- Bhattacharya A, Sood P, Citovsky V (2010)** The roles of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection. Molecular Plant Pathology 11(5), 705-19. doi: 10.1111/j.1364-3703.2010.00625.x.
- Bhardwaj D, Ansari MW, Sahoo RK, Tuteja N (2014)** Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. Microbial cell factories 13(1), 66.
- Bittel P, Robatzek S (2007)** Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. Current Opinion in Plant Biology 10, 335-341.

- Boller T, Felix G (2009)** A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology* 60, 379-406.
- Bolsa de comercio Rosario (2016)** <http://www.bcr.com.ar/>
- Bové JM (2006)** Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* 88, 7-37.
- Canteros BI (2004)** Management of Citrus Canker in Argentina-A Review. *Proceedings of the International Society for Citriculture*, 515-523.
- Canteros BI, Solíz JA, Benítez R, Hermosís F, Fernández G, Vallejos A (2011)**. Intensidad de cancrisis, sarna y black spot en limón eureka en quintas sin control químico. In *Congreso Argentino de Fitopatología*. Mar del Plata, Buenos Aires. AR.
- Carmona M, Gally M, Grijalba P, Sugia V, Jaeggi E (2004)** Frequency and chemical control of causal pathogens of soybean late season diseases in the Pampeana Region. *Proceeding of 7th World Soybean Research Conference, 4th International Soybean Processing and Utilization Conference, Congresso Mundial de Soja*. EMBRAPA, Foz delguazú, Brasil, 159.
- Castro AJ, Carapito C, Zorn N, Magné C, Leize E, Van Dorsselaer A, Clément C (2005)** Proteomic analysis of grapevine (*Vitis vinifera* L.) tissues subjected to herbicide stress. *Journal of Experimental Botany* 56, 2783–2795
- Cerviño (2014)** Evaluación de factores que afectan la bioactividad de extractos metanólicos de hojas de *Fragaria x ananassa* Duch. Tesis de grado
- Chalfoun NR, Grellet-Bournonville CF, Martínez-Zamora MG, Díaz-Perales A, Castagnaro AP, Díaz-Ricci JC (2013)** Purification and Characterization of AsES Protein a subtilisin secreted by *acremonium strictum* is a novel plant defense elicitor. *Journal of Biological Chemistry* 288(20), 14098-14113.
- Cheyrier V, Comte G, Davies KM, Lattanzio V, Martens S (2013)** Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry* 72, 1–20
- Chirinos R, Rogez H, Camposa D, Pedreschi R, Larondelle Y (2007)** Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) tubers. *Separation and Purification Technology* 55, 217–225
- Cohen Y (2001)** The BABA story of induced resistance. *Phytoparasitica* 29, 375-378.
- Cole DL (1999)** The efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance, against bacterial and fungal diseases of tobacco. *Crop protection* 18(4), 267-273.
- Conrath U, Pieterse CMJ, Mauch-Mani B (2002)** Priming in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science* 7, 210–216. doi: 10.1016/S1360-1385(02)02244-6
- Cruickshank IAM, Perrin DR (1968)** The isolation and partial characterization of monilicolin A, a polypeptide with phaseollin-inducing activity from *Monilinia fructicola*. *Life Sciences* 7(10), 449-458.

- Cubero J (2001)** La Cancrosis de los cítricos: un grave problema bacteriano en Florida. Levante Agrícola: Revista internacional de cítricos 357, 289-297.
- Currier H, Strugger S (1956)** Aniline blue and fluorescence microscopy of callose in bulb scales of *Allium cepa* L. Protoplasma 45, 552-559.
- Dedyukhi E, Kamzolova SV, Vainshtein MB (2014)** Arachidonic acid as an elicitor of the plant defense response to phytopathogens. Chemical and Biological Technologies in Agriculture 1, 18.
- Díaz CG, Ploper LD, Galvez MR, González V, Zamorano MA, Jaldo HE, Lopez C, Ramallo JC (2005)** Efecto de las enfermedades de fin de ciclo en el crecimiento de distintos genotipos de soja relacionado a la fecha de siembra. Agriscientia 22(1).
- Díaz de Villegas, Villa P, Frías A (2002)** Evaluation of the siderophores production by *Pseudomonas aeruginosa* PSS. Revista Latinoamericana de Microbiología 44 (3-4), 112-117.
- Di Rienzo JA (2011)** fgStatistics. Statistical software for the analysis of experiments of functional genomics. <http://sites.google.com/site/fgStatistics/>
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW (2013)** InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>.
- Dixon, RA (2001)** Natural products and plant disease resistance. Nature 411, 843-847.
- Doke N (1983)** Generation of superoxide anion by potato tuber protoplasts during the hypersensitive response to hyphal wall components of *Phytophthora infestans* and specific inhibition of the reaction by suppressors of hypersensitivity. Physiological Plant Pathology 23, 359-367.
- Dubods C, Plomion C (2001)** Drought differentially affect expression of a PR10 protein, in needles of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) seedlings. The Journal of Experimental Botany 52(358), 1143-1144.
- Eckert JW, Eaks IL (1989)**. Postharvest disorders and diseases of citrus fruit. En: Reuter, W., Calavan, E.C., Carman, G.E. (Eds.). The Citrus Industry. University of California Press, Berkeley, CA, USA, pp. 17-260.
- Escobar MA, Dandekar AM (2003)** Agrobacterium tumefaciens as an agent of disease. Trends in Plant Science 8(8), 380-386
- Fandos C, Scandaliaris J, Scandaliaris P, Soria F, Carreras Baldrés J (2014)** Area cosechable y producción de caña de azúcar y azúcar para la zafra 2014 en Tucumán. Reporte Agroindustrial N° 94. Relevamiento satelital de cultivos en la provincia de Tucumán.
- Federcitrus (2014)** Actividad cítrica argentina. Fuente: <http://www.federcitrus.org/noticias/upload/informes/Act%20Citricola%2014.pdf>
- Federcitrus (2016)** Actividad cítrica argentina. Fuente: <http://www.federcitrus.org/noticias/upload/informes/Act%20Citricola%2016.pdf>

- Fernández-Northcote EN, Navia O, Gandarillas A (2016)** Bases de las estrategias de control químico del tizón tardío de la papa desarrolladas por PROINPA en Bolivia. *Revista Latinoamericana de la papa* 11(1), 1-25.
- Filippone MP, Díaz Ricci JC, Mamaní de Marchese AI, Farías RN, Castagnaro AP (1999).** Isolation and purification of a 316 Da preformed compound from strawberry (*Fragaria ananassa*) leaves active against plant pathogens. *FEBS Letters* 459, 115-118
- Filippone MP, Díaz-Ricci JC, Castagnaro AP, Farías R (2001)** Efecto de Fragarin en la membrana citoplasmática del fitopatógeno *Clavibacter michiganensis*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 7 (14), 925-928.
- Filippone MP (2005)** Compuestos antimicrobianos de frutilla. Tesis Doctoral.
- Formento AN, Schutt de Varini LS, Velázquez JC (2009)** Enfermedades de Fin de Ciclo (EFC), Roya Asiática (RAS) y Emergentes en el Cultivo de Soja en Entre Ríos. *Boletín Fitopatológico* N°A, 52.
- Francl LJ (2001)** The disease triangle: a plant pathological paradigm revisited. *Plant Health Instructor*. doi: 10.1094/PHI-T-2001-0517-01
- Friedman M, Jürgens HS (2000)** Effect of pH on the Stability of Plant Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 2101-2110.
- Funes C, Acosta EM, Ramallo CJ (2009)** Principales Enfermedades en Caña de azúcar *Manual del cañero* 12, 151-157.
- Gatto MA, Ippolito A, Linsalata V, Cascarano NA, Nigro F, Vanadia S, Di Venere D (2011)** Activity of extracts from wild edible herbs against postharvest fungal diseases of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology* 61, 72–82.
- Gerwick BC, Sparks TC (2014)** Natural products for pest control: an analysis of their role, value and future. *Pest management science* 70(8), 1169-1185.
- Glazebrook J (2005)** Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43, 205–227
- Gohre V, Jones AM, Sklenar J, Robatzek S, Weber AP (2012)** Molecular crosstalk between PAMP-triggered immunity and photosynthesis. *Molecular Plant Microbe Interactions* 25, 1083-1092.
- González G, Valera ML (2015)** Situación actual del mercado nacional e internacional de productos orgánicos. https://www.agro.uba.ar/apuntes/no_13/Situacion_actual_del_mercado_nacional_e_internacional_Gonzalez-Varela.pdf
- Gottwald T, Graham J, Bock C, Bonn G, Civerolo E, Irej M, Leite R, McCollum G, Parker P, Ramallo J, Riley T, Schubert T, Stein B, Taylor E (2009)** The epidemiological significance of post-packinghouse survival of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* for dissemination of Asiatic citrus canker via infected fruit. *Crop Protection* 28(6), 508-524.

- Graham JH, Gottwald TR, Cubero J and Achor DS (2004)** *Xanthomonas axonopodispv. citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. *Molecular Plant Pathology* 5, 1-15.
- Grant M, Lamb C (2006)** Systemic immunity. *Current opinion in plant biology* 9(4), 414-420.
- Hael-Conrad V, Abou-Mansour E, Díaz-Ricci JC, Métraux JP, Serrano M (2015)** The novel elicitor AsES triggers a defense response against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* 241, 120-127.
- Häkkinen S, Kärenlampi SP, Heinonen M, Mykänen H, Törrönen R (1999)** Content of the flavonols quercetin, myricetin and kaempferol in 25 edible berries. *Journal Agriculture Food Chemistry* 47, 2274-2279.
- Halbwirth H, Puhl I, Haas U, Jezik K, Treutter D, Stich K (2006)** Two-phase flavonoid formation in developing strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 1479-1485.
- Hanhineva K, Rogachev I, Kokko H, Mintz-Oron S, Venger I, Kärenlampi S, Aharoni A (2008)**. Non-targeted analysis of spatial metabolite composition in strawberry (*Fragaria × ananassa*) flowers. *Phytochemistry* 69, 2463-2481.
- Hanhineva K, Kokko H, Siljanen H, Rogachev I, Aharoni A, Kärenlampi S (2009)** Stilbene synthase gene transfer caused alterations in the phenylpropanoid metabolism of transgenic strawberry (*Fragaria × ananassa*). *Journal of Experimental Botany* 60, 2093-2106.
- Harding SA, Oh SH, Roberts DM (1997)** Transgenic tobacco expressing a foreign calmodulin gene shows an enhanced productions of active oxygen species. *The EMBO Journal* 16, 1137-1144.
- Hashimoto M, Kisseleva L, Sawa S, Furukawa T, Komatsu S, Koshihara T (2004)** A novel rice PR10 protein, RSOsPR10, specifically induced in roots by biotic and abiotic stresses, possibly via the jasmonic acid signaling pathway. *Plant and Cell Physiology* 45, 550-559.
- Haslam E (2007)** Vegetable tannins – Lessons of a phytochemical lifetime. *Phytochemistry* 68, 2713-2721
- Hébert C, Charles MT, Gauthier L, Willemot C, Khanizadeh S, Cousineau J (2002)**. Strawberry proanthocyanidins: biochemical markers for *Botrytis cinerea* resistance and shelf-life predictability. *Acta Horticulturae* 2(567), 659-661.
- Heo W, Lee S, Kim M, Kim J, Chung W, Chun H, Lee K, Park C, Park H, Choi J, Cho M (1999)** Involvement of specific calmodulin isoforms in salicylic acid-independent activation of plant disease resistance responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 766-771.
- Hernández González MM, Jiménez Garcés C, Jiménez Albarrán FR, Arceo Guzmán ME (2007)** Caracterización de las intoxicaciones agudas por plaguicidas: perfil ocupacional y conductas de uso de agroquímicos en una zona agrícola del Estado de México, México. *Revista internacional de contaminación ambiental* 23(4), 159-167.
- Hernanz D, Recamales AF, Meléndez-Martínez AJ, González-Miret ML, Heredia FJ, (2007)** Assessment of the differences in the phenolic composition of five strawberry

cultivars (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) grown in two different soilless systems. *Journal of agricultural and food chemistry* 55(5), 1846-1852.

Himanen S, Vuorinen T, Tuovinen T, Holopainen JK (2005) Effects of cyclamen mite (*Phytonemus pallidus*) and leaf beetle (*Galerucella tenella*) damage on volatile emission from strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) plants and orientation of predatory mites (*Neoseiulus cucumeris*, *N. californicus*, and *Euseius finlandicus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 8624-8630.

Hirai N, Sugiem M, Wada M, Lahlou H, Kamo T, Yoshida R, Tsuda M, Ohigashi H, (2000) Triterpene Phytoalexins from Strawberry Fruit. *Contents and Abstracts of Journal Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 64 (8),1707.

Hoagland D, Arnon D (1950)The water-culture method for growing plants without soil. *Circular. California Agricultural Experiment Station* 347, 1–32

Hou S, Yang Y, Zhou J (2009) The multilevel and dynamic interplay between plant and pathogen. *Plant-pathogen interactions* 4 (4), 283-293.

<http://agricultureros.com/bioinsumos-de-uso-agricola-potencialidades-y-desafios/>

<http://observatoriosoja.org/nota-breve/uso-de-agroquimicos-en-soja>

<http://www.abcbio.org.br>

<https://www.apsnet.org/edcenter/advanced/topics/Epidemiologia/Pages/Estrategias.aspx>

<http://www.britannica.com/science/plant-disease>

http://www.croppro.com.au/crop_disease_manual/ch01s01.php

<http://www.colmed7.org.ar/files/Trabajos/AGROQUIMICOS.pdf>

<http://www.lanacion.com.ar/1825257-la-argentina-tiene-revancha-de-la-mano-de-los-organicos>

<http://www.minagri.gob.ar/site/agricultura/index.php>

http://www.minagri.gob.ar/site/agricultura/roya_soja.php

Ho KY, Tsai CC, Huang JS, Chen CP, Lin TC, Lin CC (2001) Antimicrobial activity of tannin components from *Vaccinium vitis-idaea* L. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 53(2), 187-191.

Hukkanen AT, Kokko HI, Buchala AJ, McDougal GJ, Stewart D, Kärenlampi SO, Karjalainen RO (2007) Benzothiadiazole induces the accumulation of phenolics and improves resistance to powdery mildew in strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 862-1870.

Iandolino AB, Goes da Silva F, Lim H, Choi H, Williams LE, Cook DR (2004) High-quality RNA, cDNA, and derived EST libraries from grapevine (*Vitis vinifera* L.) *Plant Molecular Biology Reporter* 22, 269.

- Jadhav MD, Deobhankar KP (2013)** Antibacterial activity of medicinal plant's against *Xanthomonas citri*. International Journal of Advanced Biotechnology and Research 4, 315-318
- Jakob K, Goss EM, Araki H, Van T, Kreitman M, Bergelson J (2002)** *Pseudomonas viridiflava* and *P. syringae*—Natural Pathogens of *Arabidopsis thaliana*. Molecular Plant-Microbe Interactions 15 (12), 1195–1203
- Jia Z, Zou B, Wang X, Qiu J, Ma H, Gou Z, Song S, Dong H (2010)** Quercetin-induced H₂O₂ mediates the pathogen resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* DC3000 in *Arabidopsis thaliana*. Biochemical and Biophysical Research Communications 396, 522–527.
- Jones JD, Dangl JL (2006)** The plant immune system. Nature 444, 323-329.
- Josuttis M, Carlen C, Crespo P, Nestby R, Toldam-Andersen TB, Dietrich H, Krüger E (2012)** A comparison of bioactive compounds of strawberry fruit from Europe affected by genotype and latitude. Journal of Berry Research 2(2), 73-95.
- Josuttis M, Verrall S, Stewart D, Krüger E, McDougall GJ (2013)** Genetic and environmental effects on tannin composition in strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) cultivars grown in different European locations. Journal of agricultural and food chemistry 61(4), 790-800.
- Kadota Y, Shirasu K, Zipfel C (2015)** Regulation of the NADPH Oxidase RBOHD During Plant Immunity. Plant and Cell Physiology 56, 1472-1480.
- Kessmann H, Staub T, Hofmann C, Maetzke T, Herzog J, Ward E, Ryals J (1994a)** Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. Annual review of phytopathology 32(1), 439-459.
- Kessmann H, Staub T, Ligon J, Oostendorp M, Ryals J (1994b)** Activation of systemic acquired disease resistance in plants. European Journal of Plant Pathology 100(6), 359-369.
- Kim S, Yu S, Kang YH, Kim SG, Kim JY, Kim SH, Kang KY (2008)** The rice pathogen-related protein 10 (JIOsPR10) is induced by abiotic and biotic stresses and exhibits ribonuclease activity. Plant Cell Reports 27, 593–603.
- Koh GY, Chou G, Liu Z (2009)** Purification of a Water Extract of Chinese Sweet Tea Plant (*Rubus suavissimus* S. Lee) by Alcohol Precipitation. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57, 5000–5006.
- Koornneef A, Pieterse CMJ (2008)** Cross Talk in Defense Signaling. Plant Physiology 146, 839-844.
- Koornneef M, Meinke D (2010)** Arabidopsis: a rich harvest 10 years after completion of the genome sequence. The development of Arabidopsis as a model plant. The Plant Journal 61, 909–921

- Kossel, A (1891)** Über die Chemische Zusammensetzung der Zelle, *Archiv für Physiologie* 181–186.
- Krol E, Mentzel T, Chinchilla D, Boller T, Felix G, Kemmerling B, Postel S, Arents M, Jeworutzki E, Al-Rasheid KA, Becker D, Hedrich R (2010)** Perception of the Arabidopsis danger signal peptide 1 involves the pattern recognition receptor AtPEPR1 and its close homologue AtPEPR2. *The Journal of Biological Chemistry* 285, 13471-13479.
- Lattanzio V, DeCicco V, Di Venere D, Lima G, Salerno M (1994)** Antifungal activity of phenolics against fungi commonly encountered during storage. *Italian Journal of Food Science* 6, 23–30
- Lattanzio V, Di Venere D, Linsalata V, Lima G, Ippolito A, Salerno M (1996)** Antifungal activity of 2,5-dimethoxybenzoic acid on postharvest pathogens of strawberry fruits. *Postharvest Biology and Technology* 3, 325–334.
- Leborgne-Castel N, Lherminier J, Der C, Fromentin J, Houot V, Simon-Plas F (2008)** The Plant Defense Elicitor Cryptogein Stimulates Clathrin-Mediated Endocytosis Correlated with Reactive Oxygen Species Production in Bright Yellow-2 Tobacco Cells. *Plant Physiology* 146(3), 1255–1266. <http://doi.org/10.1104/pp.107.111716>
- Lee SH, Kim JC, Lee MS, Heo WD, Seo HY, Yoon HW, Hong JC, Lee SY, Bahk J D, Hwang I, Cho JM (1995)** Identification of a Novel Divergent Calmodulin Isoform from Soybean Which Has Differential Ability to Activate Calmodulin-dependent Enzymes. *The Journal of Biological Chemistry* 270(37), 21806-21812.
- Lee SH, Seo HY, Kim JC, Heo WD, Chung WS, Lee KJ, Kim MC, Cheong YH, Choi JY, Lim CO, Cho JM (1997)** Differential Activation of NAD Kinase by Plant Calmodulin Isoforms. *The Journal of Biological Chemistry* 272(14), 9252-9259.
- Liu X, Williams CE, Nemacheck JA, Wang H, Subramanyam S, Zheng C, Chen MS (2010)** Reactive Oxygen Species Are Involved in Plant Defense against a Gall Midge. *Plant Physiology* 152(2), 985–999. <http://doi.org/10.1104/pp.109.150656>
- Luna E, Pastor V, Robert J, Flors V, Mauch-Mani B, Ton J (2011)** Callose deposition: a multifaceted plant defense response. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24, 183-193.
- Luthria DL, Mukhopadhyay S, Krizek DT (2006)** Content of total phenolics and phenolic acids in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits as influenced by cultivar and solar UV radiation. *Journal of Food Composition and Analysis* 19, 771–777
- L'Haridon F, Besson-Bard A, Binda M, Serrano M, Abou-Mansour E, Balet F, Schoonbeek H-J, Hess S, Mir R, Léon J, Lamotte O, Métraux J-P (2011)** A Permeable Cuticle Is Associated with the Release of Reactive Oxygen Species and Induction of Innate Immunity. *PLoS Pathogens* 7(7), e1002148. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002148>
- Määttä-Riihinen KR, Kamal-Eldin A, Törrönen AR (2004)** Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (family Rosaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:6178-6187.

- Macho AP, Boutrot F, Rathjen JP, Zipfel C (2012)** Aspartate oxidase plays an important role in Arabidopsis stomatal immunity. *Plant Physiology* 159, 1845-1856.
- Macho AP, Zipfel C (2015)** Targeting of plant pattern recognition receptor-triggered immunity by bacterial type-III secretion system effectors. *Current Opinion in Microbiology* 23, 14-22.
- Maffei ME, Arimura G, Mithöfer A (2012)** Natural elicitors, effectors and modulators of plant responses. *Natural Product Reports* 29, 1288-1303.
- Mailoa MN, Mahendradatta M, Laga A, Djide N (2014)** Antimicrobial Activities Of Tannins Extract From Guava Leaves (*Psidium Guajava* L) On Pathogens Microbial. *International Journal of Scientific & Technology Research* 3, 236-241.
- Malolepsza U (2006)** Induction of disease resistance by acibenzolar-S-methyl and o-hydroxyethylorutin against Botrytis cinerea in tomato plants. *Crop Protection* 25, 956–962.
- Mamani AI (2009)** Bioquímica de la defensa de la frutilla (*Fragaria x anannassa*). Tesis Doctoral.
- Mamaní de Marchese AI, Filippone MP, Grellet Bournonville CF, Welin B, Castagnaro AP, Díaz Ricci JC (2012)** Pathogen-Induced Accumulation of an Ellagitannin Elicits the Plant Defense Response. *Molecular Plant Microbe Interactions* 25, 1430-1439.
- Manns TF (1909)** The blade blight of oats-a bacterial disease. *Bulletin, Ohio Agricultural Experiment Station* 210, 91-167.
- Matton DP, Brisson N (1989)** Cloning, expression and sequence conservation of pathogenesis-related gene transcripts of potato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2, 325–331.
- McCook S (2009)** La Roya del café en Costa Rica: Epidemias, innovación y medio ambiente, 1950-1995. *Revista de Historia*, 59-60.
- McGee JD, Hamer JE, Hodges TK (2001)** Characterization of a PR-10 pathogenesis-related gene family induced in rice during infection with Magnaporthe grisea. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14, 877–886.
- Meena PD, Gour RB, Gupta JC, Singh HK, Awasthi RP, Netam RS, Godika S, Sandhu PS, Prasad R, Rathi AS, Rai D, Thomas L, Patel GA, Chattopadhyay C (2013)** Non-chemical agents provide tenable, eco-friendly alternatives for the management of the major diseases devastating Indian mustard (*Brassica juncea*) in India. *Crop Protection* 53, 169-174.
- Miller AM, Barreto TP, Silva MLR, Leite RP (2011)** Control of citrus canker mediated by neonicotinoids in combination with acibenzolar S-methyl. En: *Proc. of the Workshop on Xanthomonas citri/ Citrus Canker, Ribeirão Preto, Brasil*, 50-52.
- Moctezuma C, Hammerbacher A, Heil M, Gershenson J, Méndez-Alonzo R, Oyama K (2014)** Specific Polyphenols and Tannins are Associated with Defense Against Insect Herbivores in the Tropical Oak *Quercus oleoides*. *Journal of Chemical Ecology* 40(5), 458.
- Montes-Belmont, R (2009)** Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Micología* 29, 73-82.

- Molina N, Ivaldi J (2007)** Economía del sector cítrico. Costos de empaque en Tucumán. Campaña 2006-2007. Publicación de la EEA INTA Bella Vista Centro Regional Corrientes- Argentina. Serie Técnica N° 23. pp 44.
- Monaghan J, Zipfel C (2012)** Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Current Opinion in Plant Biology* 15, 349-357.
- Mur LA, Kenton P, Atzorn R, Miersch O, Wasternack C (2006)** The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiology* 140, 249–262.
- Murashige T, Skoog F (1962)** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15(3), 473-497.
- Musto M, Potenza G, Cellini F (2014)** Inhibition of *Penicillium digitatum* by a crude extract from *Solanum nigrum* leaves. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 18(2), 174-180.
- Nafie E, Mazen M (2008)** Chemical-induced resistance against brown stem rot in soybean: the effect of benzothiadiazole. *Journal of Applied Sciences Research* 4(12), 2046-2064.
- Nagpala EG, Guidarelli M, Gasperotti M, Masuero D, Bertolini P, Vrhovsek U, Baraldi E (2016)** Polyphenols Variation in Fruits of the Susceptible Strawberry Cultivar Alba during Ripening and upon Fungal Pathogen Interaction and Possible Involvement in Unripe Fruit Tolerance. *Journal of agricultural and food chemistry* 64(9), 1869-1878.
- Noel JP, Austin MB, Bomati EK (2005)** Structure–function relationships in plant phenylpropanoid Biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 8, 249–253
- Oostendorp M, Kunz W, Dietrich B, Staub T (2001)** Induced disease resistance in plants by chemicals. *European Journal of Plant Pathology* 107, 19–28. doi:10.1023/A:1008760518772
- Palacios J (2005)** Citricultura. Editorial Alfabet. Tucumán. Argentina, 519.
- Pandey D, Rajendran SRCK, Gaur M, Sajeesh PK, Kumar A (2016)** Plant defense signaling and responses against necrotrophic fungal pathogens. *Journal of Plant Growth Regulation* 35(4), 1159-1174.
- Panwar J, Swarnalakshmi K (2005)** PGPR: A NEW GROUP OF BIOFERTILIZERS FOR SUSTAINABLE CROP PRODUCTIVITY. *Developments in Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of Plants* 1, 159.
- Paredes V, Pérez D, Rodríguez G, Figueroa D, Salas H (2013)** Producción y comercialización del limón de Tucumán en el año 2012. Comparación de los gastos de implantación y producción en las campañas 2011/12 y 2012/13. Reporte Agroindustrial. Estadísticas y márgenes de cultivos tucumanos. Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombes. Tucumán. Argentina
- Parente E, Hill C (1992)** A comparison of factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria. *Journal of Applied Bacteriology* 73, 290-298.

- Park D-S, Landini S, Graham MY, Graham TL (2001)** Induced distal defense potentiation against *Phytophthora sojae* in soybean. *Physiological and molecular plant pathology* 60(6), 293-310.
- Park CY, Heo WD, Yoo JH, Lee JH, Kim MC, Chun HJ, Moon BC, Kim IH, Park HC, Choi MS, Ok HM, Cheong MS, Lee SM, Kim HS, Lee KH, Lim CO, Chung WS, Cho MJ (2004a)** Pathogenesis-related Gene Expression by Specific Calmodulin Isoforms Is Dependent on NIM1, a Key Regulator of Systemic Acquired Resistance. *Molecules and cells* 18, 207-213.
- Park HC, Kim ML, Kang YH, Jeon JM, Yoo JH, Kim MC, Park CY, Jeong JC, Moon BC, Lee JH, Yoon HW, Lee S, Chung WS, Lim CO, Lee SY (2004b)**. Pathogen- and NaCl-Induced Expression of the SCaM-4 Promoter Is Mediated in Part by a GT-1 Box That Interacts with a GT-1-Like Transcription Factor 1. *Plant Physiology* 135, 2150-2161.
- Patra B, Schluttenhofer C, Wu Y, Pattanaik S, Yuan L (2013)** Transcriptional regulation of secondary metabolite biosynthesis in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1829(11), 1236–1247
- Paulert R, Talamini V, Cassolato JEF, Duarte MER, Nosedá M, Smania Júnior A, Stadnik MJ (2009)** Effects of sulfated polysaccharide and alcoholic extracts from Green seaweed *Ulva fasciata* on anthracnose severity and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Plant Diseases and Protection* 116, 63-270.
- Perez W (2008)** Manual técnico. El tizón tardío de la papa. International Potato Center
- Pérez DP, Rodríguez G (2011)** Biocombustibles en la Argentina y Tucumán, cifras de la industria en el período 2009-2011. Reporte Agroindustrial N°52/Estadísticas y márgenes de cultivos tucumanos/EEAOC.
- Pérez Gómez S, Vallejo J, Fontana P, Rago A (2010)** Evaluación de estría roja en los cañaverales de Tucumán. Resumen presentado en: XVI Reunión Técnica Nacional de la Caña de Azúcar. Tucumán, Argentina.
- Peteira B, Fernández A, Rodríguez H, González E (2008)** Bion and Fitomas effect as resistance inducers in rice plants infested with *Steneotarsonemus spinki*. *Revista de Protección Vegetal* 23(1), 32-37.
- Pfaffl MW (2001)** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45.
- Pichersky E, Gang DR (2000)** Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in plant science* 5, 439-445.
- Pieterse CM, Leon-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees SC (2009)** Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature chemical biology* 5(5), 308-316.
- Ploper L, González V, Pérez B, Pioli R, Rodríguez Pardina P, Scandiani M, Distefano S, Sillón M (2008)**. Enfermedades de *Glycine max* (L.) Merrill (soja, soya, poroto soja, frijol soja). Atlas Fitopatológico Argentino. Septiembre. <http://www.fitopatoatlas.org.ar/default.asp?hospedante>

- Ploper LD, González V, Hecker L, De Lisi V, Devani M (2011)** Evolución, situación actual y manejo de la mancha anillada de la soja en el noroeste argentino. 5° Congreso de la Soja del Mercosur- 1° Foro de la Soja Asia-Mercosur
- Ploper LD, González V, De Lisi V, Reznikov S, Stegmayer CA, Henriquez DD, Devani Mr (2013)** Investigación sobre la mancha anillada de la soja en la región noroeste de la Argentina (NOA). World Soybean Reseach Conference
- Poupard P, Parisi L, Campion C, Ziadi S, Simoneau P (2003)** A wound-and ethephon-inducible PR-10 gene subclass from apple is differentially expressed during infection with a compatible and an incompatible race of *Venturia inaequalis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62(1), 3-12.
- Rakwal R, Agrawal GK, Yonekura M (1999)** Separation of proteins from stressed rice *Oryza sativa* L. leaf tissues by two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, induction of pathogenesisrelated and cellular protectant proteins by jasmonic acid, UV irradiation and copper chloride. *Electrophoresis* 20:3472–3478
- Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF. (2003).** Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience letters* 339(1), 62-66.
- Rifkin (2011)** <http://www.thethirdindustrialrevolution.com/>
- Rigano LA, Payette C, Brouillard G, Marano MR, Abramowicz L, Torres PS, Yun M, Castagnaro AP, ElOirdi M, Dufour V, Malamud F, Dow JM, Bouarab K, Vojnov AA (2007).** Bacterial cyclic beta-(1,2)-glucan acts in systemic suppression of plant immune responses. *The Plant cell* 19(6), 2077-89. doi:10.1105/tpc.106.047944
- Robert N, Ferran J, Breda C, Coutos-Thévenot P, Boulay M, Buffard D, Esnault R (2001)** Molecular characterization of the incompatible interaction of *Vitis vinifera* leaves with *Pseudomonas syringae* pv *pisi*, expression of genes coding for stilbene synthase and class 10 PR protein. *European Journal of Plant Pathology* 107 (2), 249-261.
- Robert-Seilaniantz A, Grant M, Jones JD (2011)** Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annual review of phytopathology* 49, 317-343.
- Rojas CM, Senthil-Kumar M, Tzin V, Mysore K (2014)** Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. *Frontiers in plant science* 5, 17.
- Rubinstein J (2015)** *Fragaria x ananassa*: Past, Present and Future Production of the Modern Strawberry. <http://conservancy.umn.edu/handle/11299/175838>
- Samoon HA, Dar SA, Zehra B, Mahdi SS, GI Hassan SA (2010)** Bio-fertilizers in Organic Agriculture. *Journal of Phytology* 2(10).
- Sanchez L, Courteaux B, Hubert J, Kauffmann S, Renault J, Clément C, Baillieul F, Dorey S (2012)** Rhamnolipids Elicit Defense Responses and Induce Disease Resistance against Biotrophic, Hemibiotrophic, and Necrotrophic Pathogens That Require Different Signaling Pathways in *Arabidopsis* and Highlight a Central Role for Salicylic Acid. *Plant Physiology* 160, 1630–1641

- Santos F, Peñaflor MFG, Paré PW, Sanches PA, Kamiya AC, Tonelli M, Nardi C, Bento JMS (2014)** A novel interaction between plant-beneficial rhizobacteria and roots: colonization induces corn resistance against the root herbivore *Diabrotica speciosa*. *PLoS one* 9(11), e113280.
- Sarah SN, Sijam K, Omar D (2012)** Antibacterial activity of *Psidium guajava* L. methanol leaf extract against plant pathogenic bacteria in the genera *Pectobacterium* and *Xanthomonas*. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 246-252
- Sayago JE, Ordoñez RM, Negrillo Kovacevich L, Torres S, Isla MI (2012)** Antifungal activity of extracts of extremophile plants from the Argentine Puna to control citrus postharvest pathogens and green mold. *Postharvest Biology and Technology* 67, 19–24
- Sbarbati Nudelman N (2011)** Uso sustentable de agroquímicos. http://163.10.34.134/bitstream/handle/10915/27831/Documento_completo.pdf?sequence=1
- Schaad N, Postnikova E, Lacy GH, Sechler A, Agarkova I, Stromberg PE, Stromberg VK, Vidaver AK (2005)** Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex *Hasse* 1915) *Dye* 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex *Hasse*) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex *Gabriel* 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex *Riker and Jones*) *Gabriel et al.*, 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex *smith* 1901) *Dye* 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex *Riker and Jones*, 1935) *dye* 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex *Riker et al.*, 1935) sp. nov. nom. rev.; and "var. *fuscans*" of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex *Smith*, 1987) *Dye* 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. *Systematic and applied microbiology* 28(6), 494-518.
- Schaad NW, Postnikova E, Sechler A, Clafin L, Vidaver A, Jones JB, Agarkova I, Ignatov A, Dickstein E, Ramundo B (2008)** Reclassification of subspecies of *Acidovorax avenae* s. *Avenae* (Manns 1905) *emend.*, *A. cattleyae* (Pavarino, 1911) *comb.nov.*, *A. cotrulli* (Schaad et al., 1978) *comb.nov.*, and proposal of *A. oryzaesp.nov.* *Systematic and applied microbiology* 31, 434-446.
- Sreenivasan TV AB, Heinz DJ (1987)** Cytogenetics. In: DJ H (ed) *Sugarcane improvement through breeding*. Amsterdam, 211-253
- Segonzac C, Zipfel C (2011)** Activation of plant pattern-recognition receptors by bacteria. *Current opinion in microbiology* 14(1), 54-61.
- Seong Soo J, Yun-Bae K, Do Ik L (2010)** Antimicrobial and Antioxidant Properties of Secondary Metabolites from White Rose Flower. *Plant Pathology Journal* 26(1), 57-62.
- Shalaby S, Horwitz BA (2015)** Plant phenolic compounds and oxidative stress: integrated signals in fungal–plant interactions. *Current genetics* 61(3), 347-57. doi: 10.1007/s00294-014-0458-6
- Sheikh M, Malik AR, Meghavanshi MK, Mahmoody I (2012)** Studies on Some Plant Extracts for Their Antimicrobial Potential against Certain Pathogenic Microorganisms. *American Journal of Plant Sciences* 3: 209-213.
- Siegel MR, Ragsdale NN (1978)** Antifungal mode of action of imazalil. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 9(1), 48-56.

- Silva C, Regasini LO, Petrônio MS, Silva DHS, Bolzani VS, Belasque J, Sacramento LVS, Ferreira H (2013)** Antibacterial Activity of Alkyl Gallates against *Xanthomonas citri* subsp. *Citri*. *Journal of Bacteriology* 195, 85–94
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM (1999)** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299, 152-178.
- Soares RM, Godoy CV, Oliveira MC (2009)** Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha alvo da soja. *Tropical Plant Pathology* 34(5), 333-338.
- Sommer NF, Fortlage RJ, Edwards DC (2002)** Postharvest diseases of selected commodities. En: Kader A.A. (Ed). *Postharvest Technology of Horticultural Crops*. University of California. Press. Berkeley. pp: 197-249.
- Spoel SH, Dong X (2012)** How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology* 12(2), 89-100.
- Terry LA, Joyce DC, Adikaram NKB, Khambay BPS (2004)** Preformed antifungal compounds in strawberry fruit and flower tissues. *Postharvest Biology and Technology* 31(2), 201-212.
- Thomma BP, Penninckx IA, Cammue BP, Broekaert WF (2001)** The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Current opinion in immunology* 13(1), 63-68.
- Ton J, Van Pelt JA, Van Loon LC, Pieterse CM (2002)** Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in *Arabidopsis*. *Molecular plant-microbe interactions* 15(1), 27-34.
- Ton J, Jakab G, Toquin V, Flors V, Iavicoli A, Maeder MN, Mauch-Mani B (2005)** Dissecting the β -aminobutyric acid-induced priming phenomenon in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* 17(3), 987-999.
- Torres Leal GJ (2005)** Manejo de post-cosecha de limones y limas ácidas en el noroeste de Argentina. In: *Actas del II Seminario Internacional de Postcosecha de los Cítricos*. Concordia, Entre Ríos, Argentina. Ediciones INTA, 79-83 pp.
- Tsuda K, Katagiri F (2010)** Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Current opinion in plant biology* 13, 459–465.
- Tulipani S, Marzban G, Herndl A, Laimer M, Mezzetti B, Battino M (2011)** Influence of environmental and genetic factors on health-related compounds in strawberry. *Food chemistry* 124(3), 906-913.
- Ulrich-Merzenicha G, Panekb D, Zeitlerb H, Vettera H, Wagnerc H (2010)** Drug development from natural products: Exploiting synergistic effects. *Indian Journal of Experimental Biology* 48, 208-219.
- Vaccaro NC (1994)** Comportamiento y difusión de la «Chicharrita de los Citrus» *Diaphorina citri* (Homoptera:Diaphoridae) en la zona citrícola de Entre Ríos. EEA INTA, Concordia, Entre Ríos: Carpeta de Información Citrícola.
- Viñas I, Teixidó N, Abadias M, Torres R, Usall J (2006)** Alternativas a los fungicidas de síntesis en el control de las enfermedades de postcosecha de frutas. *Innovaciones*

fisiológicas y tecnológicas de la maduración postrecolección de frutas y hortalizas. Editorial D. Valero y M. Serrano. Orihuela, Alicante, España. pp: 263-373. Fuente: <http://www.horticom.com/pd/imagenes/66/025/66025.pdf>

- Von Rad U, Mueller MJ, Durner J (2005)** Evaluation of natural and synthetic stimulants of plant immunity by microarray technology. *New Phytologist* 165(1), 191-202.
- Wang SY, Lin SS (2002)** Composts as soil supplement enhanced plant growth and fruit quality of strawberry. *Journal of plant nutrition* 25(10), 2243-2259.
- Wang J, Huang Y, Fang M, Zhang Y, Zheng Z, Zhao Y, Su W (2002)** Brefeldin A, a cytotoxin produced by *Paecilomyces* sp. and *Aspergillus clavatus* isolated from *Taxus mairei* and *Torreya grandis*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 34(1), 51-57. doi: 10.1111/j.1574-695X.2002.tb00602.x
- Wang S, Sun Z, Wang H, Liu L, Lu F, Yang J, Zhang M, Zhang S, Guo Z, Bent AF, Sun W (2015)** Rice OsFLS2-mediated perception of bacterial flagellins is evaded by *Xanthomonas oryzae* pvs. *oryzae* and *oryzicola*. *Molecular plant* 8(7), 1024-1037.
- Wei ZM, Laby RJ, Zumoff CH, Bauer DW, He SY, Collmer A, Beer SV (1992)** Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science* 257(5066), 85-88.
- Wicklow DT, Poling SM (2009)** Antimicrobial activity of pyrrocidines from *Acremonium zeae* against endophytes and pathogens of maize. *Phytopathology* 99(1), 109-115.
- Willems A, Goor M, Thielemans S, Gillis M, Kersters K, De Ley J (1992)** Transfer of several phytopathogenic *Pseudomonas* species to *Acidovorax* as *Acidovorax avenaesubsp. nov., comb. nov., Acidovorax avenaesubsp. citrulli, Acidovorax avenaesubsp. cattleyae,* and *Acidovorax konjaci*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 42(1), 107-119.
- Williner MR, Pirovani ME, Güemes D (2003)** Ellagic acid content in strawberries of different cultivars and ripening stages. *Journal Science Food Agriculture* 83, 842-845.
- Wiesel L, Newton AC, Elliott I, Booty D, Gilroy EM, Birch PR, Hein I (2014)** Molecular effects of resistance elicitors from biological origin and their potential for crop protection. *Frontiers in plant science* 5, 655.
- Xie YR, Chen ZY, Brown RL, Bhatnagar D (2010)** Expression and functional characterization of two pathogenesis-related protein 10 genes from *Zea mays*. *Journal of plant physiology* 167(2), 121-130.
- Xu P, Jiang L, Wu J, Li W, Fan S, Zhang S (2014)** Isolation and characterization of a pathogenesis-related protein 10 gene (GmPR10) with induced expression in soybean (*Glycine max*) during infection with *Phytophthora sojae*. *Molecular biology reports* 1(8), 4899-909.
- Yamamoto M, Nakatsuka S, Otani H, Kohmoto K, Nishimura S (2000)** (+)-Catechin acts as an infectional inhibiting factor in strawberry leaf. *Phytopathology* 90, 595-600.
- Yang W, Xu X, Li Y, Wang Y, Li M, Wang Y, Ding X, Chu Z (2016)** Rutin-Mediated Priming of Plant Resistance to Three Bacterial Pathogens Initiating the Early SA Signal Pathway. *PLOS one* 11(1), 1-15. e0146910