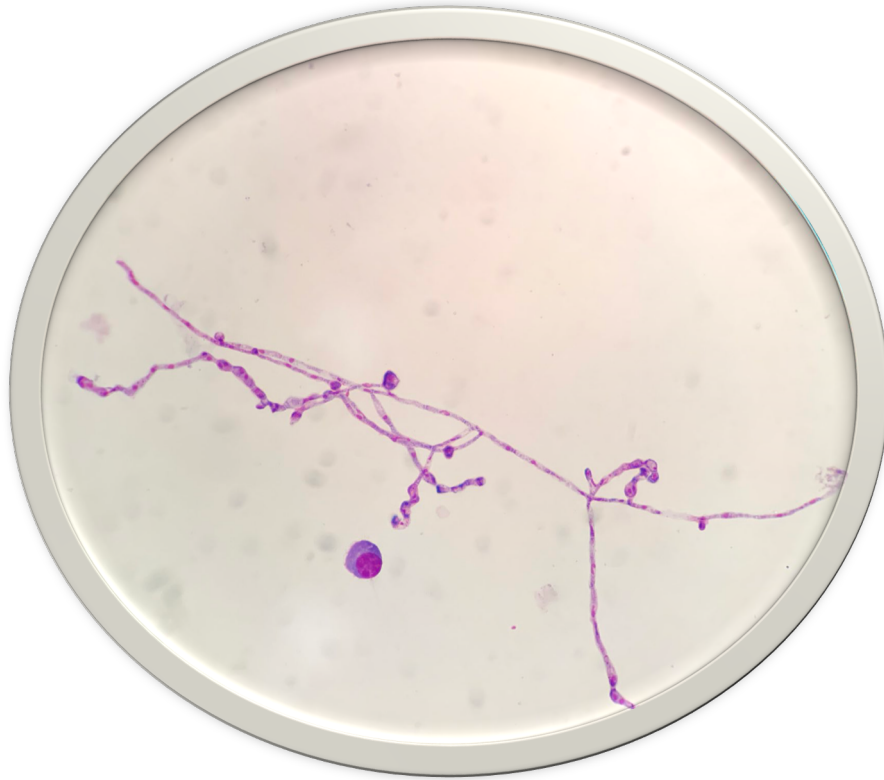


¿Cómo se defienden las plantas de los patógenos?



CURSO 2021-2022

PROFESORA IES COORDINADORA: *Dra Elena León Rodríguez*

IES Fidiana de Córdoba

INVESTIGADORES: *Dra Elena Prats y Dra Gracia Montilla.*

Instituto de Agricultura Sostenible- CSIC de Córdoba

ALUMNADO:

Laura Berlanga Varo (1º BACH, IES Fidiana Córdoba)
María Juárez Rubio (1º BACH, IES Fidiana Córdoba)
Gema Rodríguez Ramos (1º BACH, IES Fidiana Córdoba)
Lucía Pérez Rojas (1º BACH, IES Fidiana Córdoba)

Índice

Resumen.

1. Introducción.....	Pg. 4
2. Objetivos y planificación de la investigación.....	Pg.4
3. Fundamentos teóricos.....	Pg.4
4. Materiales y métodos.....	Pg.4
5. Resultados.....	Pg.6
6. Conclusiones.....	Pg.9
7. Agradecimientos.....	Pg. 10
8. Bibliografía.....	Pg. 10

¿Cómo se defienden las plantas de los patógenos?

E. Prats¹, G. Montilla¹, E. León²

L. Berlanga², M. Juárez², L. Pérez², G. Rodríguez²

¹Instituto Agricultura Sostenible IAS-CSIC (Córdoba)

²I.E.S. Fidiana (Córdoba)

Resumen introductorio

Hoy en día el rendimiento medio de las principales cosechas representa menos de un 22% de su rendimiento récord, es decir, que se podría llegar a tener en condiciones óptimas. La diferencia se debe sobre todo a factores ambientales adversos y a los efectos de enfermedades y plagas que además reducen la calidad de las cosechas. La lucha frente a las enfermedades no puede o no debe basarse en el uso intensivo de agroquímica que tiene un gran impacto ambiental negativo y que amenazan tanto al medio ambiente como al consumidor. De ahí que hoy en día, se promueva una agricultura limpia y sostenible. En este sentido el uso de variedades resistentes tiene una especial importancia en mayor rendimiento, calidad y sostenibilidad. En este proyecto se van a transmitir las principales técnicas para la identificación de resistencia al oídio, un hongo fitopatógeno que causa importantes pérdidas económicas. No solo nos centraremos en la identificación de resistencia, sino que explicaremos cómo los diferentes mecanismos no son igualmente deseables para lograr plantas con resistencia durable lo que es esencial en el marco de una agricultura sostenible.

Distintas variedades de cebada (Riso R, Pallas, y P01), una vez crecidas en respectivas macetas, se inocularon con oídio. Utilizando una torre de inoculación de plástico y una pistola de aire a presión; en el microscopio se identificaron las conidias y las estructuras de infección del hongo. Posteriormente se realizaron tinciones específicas para las estructuras del hongo, lo que permitió la identificación al microscopio de los diferentes mecanismos de resistencia. Se tomaron datos de germinación y de diferentes estadios de infección del hongo lo que permite deducir los mecanismos de resistencia (papilas, hifas y HR). Los datos demuestran que los genotipos Riso R y P01 son más resistentes, presentando Riso R una resistencia a la penetración celular y P01 resistencia hipersensible, mientras que las Pallas son susceptibles a la infección por el oídio.

Palabras claves: oídio, resistencia, sostenibilidad, cebada

1. Introducción

Las plantas presentan mecanismos de resistencia para defenderse de los patógenos, sin embargo, todos no son igualmente eficaces. Algunos son más fáciles de manejar a la hora de mejorar una variedad, otros pueden ser más duraderos en el campo etc.

Las plantas resistentes se pueden identificar siguiendo la aparición de síntomas tras la inoculación, pero mediante técnicas microscópicas se pueden determinar el tipo de mecanismo que hace posible la resistencia lo que es muy importante sobre todo para mejorar las variedades para que la resistencia sea más duradera.

2. Objetivos y planificación de la investigación

En este proyecto tenemos como objetivo fundamental caracterizar la resistencia de 3 variedades de cebada a un hongo fitopatógeno, el oidio, tanto visualmente como microscópicamente, para poder determinar los mecanismos defensivos que operan en cada una de ellas y por tanto seleccionar las que serían mejores para usar en mejora por tener una resistencia más duradera.

Esta investigación se ha realizado en cuatro sesiones presenciales en el IAS CSIC de Córdoba y sesiones on-line para la elaboración de los documentos.

● 1ª Sesión.

Comprensión del objetivo general del proyecto y siembra de plantas. Tras una breve explicación, se sembraron las semillas de los diferentes genotipos, se recolectaron las hojas en las que el hongo oidio estaba esporulando, y se procedió a la inoculación la 1ª hoja. Posteriormente, se realizó el conteo esporas/mm² y se determinó la viabilidad de las esporas. Finalmente, se incubaron y se recogió un pequeño trozo para su observación microscópica.

● 2ª Sesión

Evaluación macroscópica y microscópica de la hoja. Se evaluaron los síntomas visibles de la infección. Tras ello, se prepararon las muestras para su observación al microscopio eliminando su clorofila y tiñéndolas. Tras el montaje de las preparaciones con las muestras, se reconocieron las estructuras de infección del oidio y los mecanismos de resistencia generados por las plantas.

● 3ª Sesión

Análisis de los datos e interpretación de los resultados. Se introdujeron los datos en una página de Excel y se hicieron las gráficas con la comparativa entre los diferentes genotipos. Se realizó la media de los datos obtenidos y se analizaron estadísticamente mediante el cálculo del error estándar. Posteriormente, se discutió cuáles eran los genotipos de mayor interés y por qué.

● 4ª sesión

Preparación de los documentos de investigación. Se trabajaron los documentos en forma plantilla en carpetas compartidas online. De esta manera todo el grupo trabaja en el desarrollo y van siguiendo las indicaciones de las investigadoras y de la tutora IES coordinadora.

- a) Preparación de un resumen/abstract
- b) Preparación de una memoria de investigación
- c) Preparación de un póster/panel
- d) Preparación de una presentación en diapositivas
- e) Preparación del texto de la exposición para la defensa

3. Fundamentos teóricos

El **oídio** es la enfermedad de hojas más extendida de los cereales en el mundo. Los cereales afectados por el oídio producen pocas cañas y granos por cabeza, además los granos pueden estar vacíos. Esto provoca importantes pérdidas a los agricultores.

El **oídio** es la enfermedad de hojas más extendida de los cereales en el mundo. Es un hongo parásito, de aspecto pulverulento, que necesita un organismo vivo para sobrevivir y que ataca generalmente las partes aéreas de las plantas.

-EL CICLO DE INFECCIÓN DEL OIDIO

1. El **inóculo primario** (la manera principal en que se dispersa el hongo) son **ascosporas** o **conidias** que se difunden principalmente por el aire o la lluvia. El hongo necesita una humedad alta pero no agua libre para la germinación de la espora y la posterior infección.
2. Una vez que germina produce un **tubo germinativo primario "PGT"** que sirve para que detecte si está sobre una planta a la que puede infectar, anclarse mediante sustancias pegajosas que produce y absorber agua.
3. Después produce el **tubo apresorial "AGT"** que es el que iniciará la infección. Para ello directamente produce una estructura llamada apresorio que es como un gancho que le sirve para ejercer presión sobre la célula, después produce la **clavija de penetración** que es como una aguja que intenta penetrar en la célula.
4. Si lo consigue formará otra estructura que le sirve para extraer el alimento a la célula (ya que al ser un **hongo biotrofo** necesita alimentarse de una célula viva). Esta estructura se denomina **haustorio** y en el caso de los **oidios** de los cereales tiene un cuerpo central redondeado y unos "dedos" hasta diez o más que se extienden a cada lado.

5. El **haustorio** va tomando nutrientes y esto le permite al hongo crecer en la superficie produciendo **hifas** que a su vez producirán **apresorios secundarios** a través de los cuales penetrará en otras células produciendo otros **haustorios** que le permitirán crecer más y más en la superficie de la hoja.
6. A los 4 o 5 días de la primera infección se empiezan a formar los **conidióforos** donde se forman nuevas esporas que se dispersarán con el viento o la lluvia a hojas vecinas produciendo nuevos ciclos de la enfermedad.

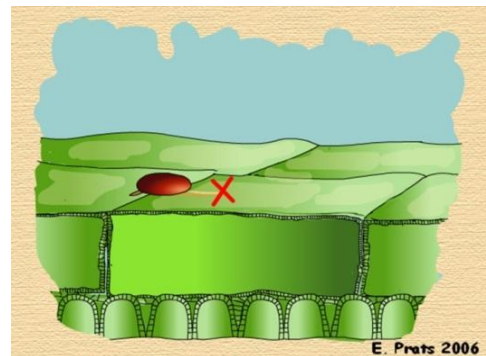
-SÍNTOMAS DE LA ENFERMEDAD.

Los síntomas se pueden encontrar en todas las partes aéreas de la cebada: hojas, tallos y espigas, pero las hojas son normalmente las más infectadas. Los primeros síntomas de la infección son manchas cloróticas en el tejido de la planta. Pústulas blancas del hongo se desarrollan pronto y rápidamente producen masas de esporas que dan el aspecto de polvillo.

-MECANISMOS DE DEFENSA.

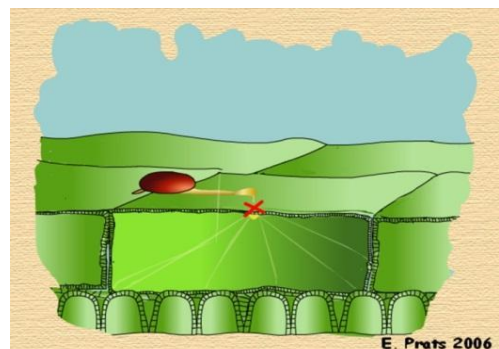
1) MECANISMOS PRE-PENETRACIÓN:

Durante la germinación y el crecimiento del PGT, AGT y del apresorio. Estos mecanismos se deben sobre todo a que las plantas pueden segregar sustancias tóxicas a la superficie y limitar este crecimiento.



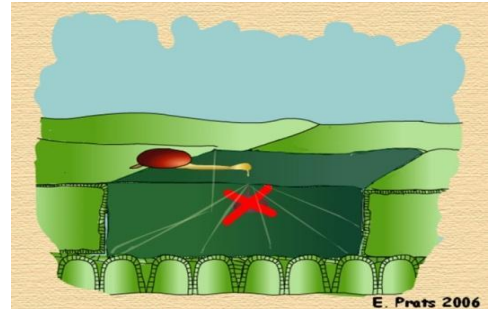
2) MECANISMOS DURANTE LA PENETRACIÓN:

Al tiempo que el oidio intenta penetrar en la célula, la planta intenta endurecer la pared celular y particularmente en el lugar donde ejerce presión el apresorio se forma una estructura llamada papila que es como una barrera tanto física, por su dureza, como química, ya que también contiene compuestos tóxicos para el hongo.



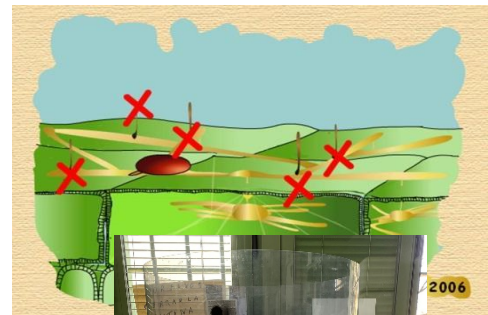
3) RESISTENCIA HIPERSENSIBLE (HR):

Si el oídio consigue penetrar, la planta podría desencadenar una HR, que lleva a la muerte programada de la célula que está siendo atacada. Así mediante este “suicidio” de una sola célula la planta salvaguarda el resto de la hoja, ya que el oídio necesita de la célula viva para alimentarse. Esta reacción solo se da si la célula contiene unos genes denominados “R” cada uno de ellos debe de reconocer el gen de avirulencia que porta ese aislado concreto de oídio. Si no se da este reconocimiento no se da la HR.



4) MECANISMOS POST-HAUSTORIALES:

Aun cuando el oídio haya penetrado en la célula y producido un haustorio, la planta tiene una última posibilidad de limitar su crecimiento mediante estos mecanismos que dificultan que tome nutrientes y por tanto que crezca y se multiplique.



4. Materiales y métodos

a. Asignación de variables

- Las variables ensayadas en este proyecto son:
- Variable dependiente: número de papilas, hifas, HR crecidas en las distintas variedades de cebada.
- Variable independiente: conjunto de genotipos (**PALLAS, RISO R, y P01**)

b. Material experimental

Hay que explicar un poco cada material y poner una foto.

- Semillas de Pallas, Riso R, P01
- Oídio
- Torre de inoculación que consta de monedas, aro de inoculación, y torre metálica
- Pistola de aire comprimido se ha utilizado para echar el oídio a nuestras variables independientes
- Tijeras y pinzas
- Ácido acético y etanol



Figura 1: Torre de inoculación.

- Cámara de cultivo
- Placas de Petri
- Lactoglicerol
- Aniline blue
- Tierra formada por una mezcla de arena y turba se ha utilizado para cultivar las plantas
- Microscopio óptico
- Porta y cubres
- Probeta y pipeta
- Vaso de precipitados
- Rotulador permanente

c. Diseño experimental

1º: Siembra de Plantas: La siembra se realizó en tubos para inocular posteriormente sin tener que cortar las plantas. Los tubos se dejaron en una cámara climática para que las plantas crezcan en condiciones controladas de luz y temperatura.



2º Recolección del inóculo: Se recogieron de la cámara de cultivo, donde se está multiplicando el odio, y hojas que estén esporulando para usarlas en la inoculación. Se utilizaron plantas de unos 10 días, inoculando la 1º hoja.

3º Inoculación: Se utilizó una torre de inoculación para la deposición homogénea de las esporas que serán sopladas desde las hojas enfermas a las sanas mediante un compresor de aire.

4º Conteo de esporas y determinación de su viabilidad: Bajo la torre se colocó un portaobjetos para poder realizar el conteo de esporas. Después, se visualizó el portaobjetos al microscopio y se calculó la cantidad de esporas que han caído por mm², teniendo en cuenta solo las que son viables. Se ajustó la inoculación a unas 30-50 esporas/mm².

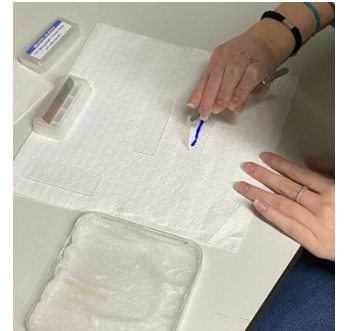
5º Incubación de las plantas: Tras la inoculación, las plantas se incubaron en la cámara climática para que proceda el proceso de infección. De estas plantas a las 48h se cogió un pequeño segmento para las observaciones microscópicas y el resto se mantuvo en la cámara climática hasta los 8 días en que se realizará la evaluación macroscópica de los síntomas.

6º Evaluación de síntomas macroscópicos de la enfermedad: A los 8 días después de la inoculación se procede a evaluación macroscópica, evaluando el porcentaje de hoja cubierta con micelio. Se realiza la evaluación en cada una de las 5 repeticiones.

7º Fijación y clarificación de las plantas: A las 48 h después de la inoculación, las plantas se fijaron en placas Petri sobre papel impregnado de una solución de etanol: ácido acético en proporción 3:1. Se dejaron en esta solución hasta que la hoja se decoloró

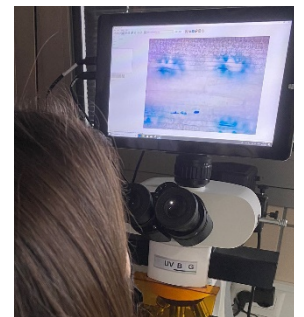
completamente. Una vez decoloradas las plantas se cambian a placas Petri en las que el papel está humedecido con agua para limpiar las hojas. Se dejan al menos 4h.

8º Preparación de muestras para el microscopio: Después se cambiaron a otras placas Petri en las que el papel estaba humedecido en una solución de ácido láctico: glicerol: agua en una proporción 1:1:1. En estas placas las muestras se mantuvieron en perfectas condiciones hasta que se mira al microscopio.



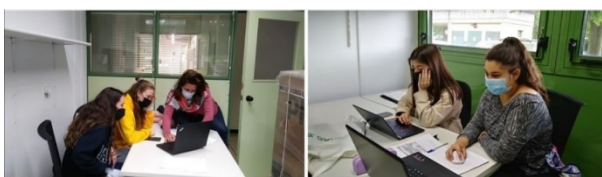
9º Tinción y montaje de las muestras: Las muestras de hoja se tiñeron con una solución de aniline blue al 1%, con cuidado de que la solución no desplace las esporas que no estén bien adheridas. La solución se depositó sobre el cubre, después la hoja, se echó un poco de lactoglicerol al porta y finalmente el cubre con la hoja adherida se depositó sobre el porta.

10º Evaluación microscópica de las muestras: Se reconocieron las diferentes estructuras de infección del hongo y los mecanismos de resistencia que detienen su crecimiento. Cada alumno evaluó 5 hojas (una de cada uno de los diferentes genotipos)



Primero se determinó el porcentaje de germinación en 60 esporas, después, mediante la observación de 30 unidades de infección con apresorio, se evaluó la formación de papilas, la presencia de HR y el porcentaje de colonias establecidas con hifas completando las plantillas de evaluación.

11º Preparación del póster y memoria científica: Los datos obtenidos por cada alumno se introdujeron en una página de Excel y determinó la media, el error estándar y se realizó la gráfica comparativa de los genotipos. Los datos se introdujeron en un programa estadístico



y se realizó un análisis de medias para comprobar si las diferencias entre genotipos son significativas



Se pusieron en común todos los resultados obtenidos y discutió sobre cuáles son los genotipos que les parecen de mayor interés para introducir en un programa de mejora y por qué.

5. Resultados

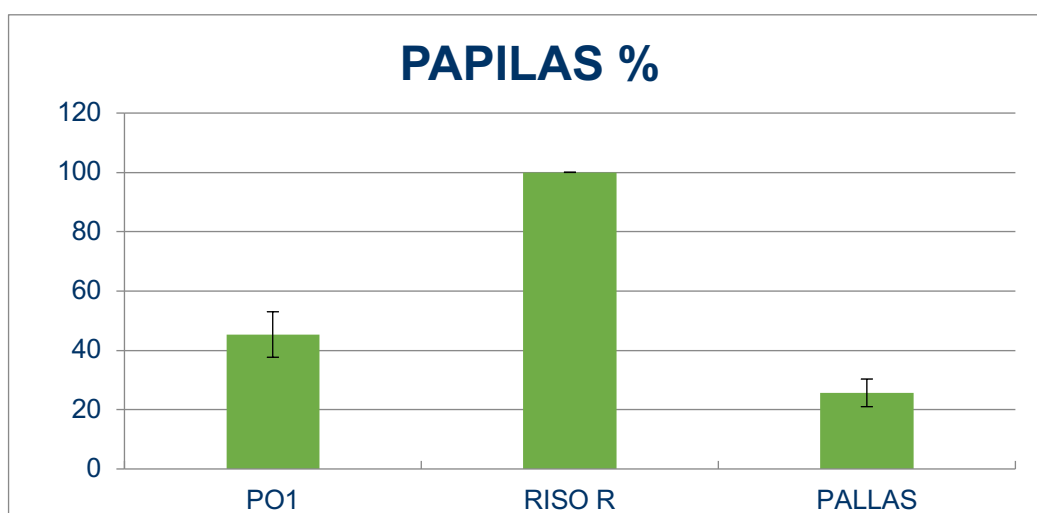
GENOTIPO	REPETICIÓN	PAPILAS %	HR %	HIFAS %
PO1	1	53	47	0
PO1	2	30	63	7
PO1	3	53	47	0
MEDIA PO1		45,33	52,33	2,33

ERROR ESTÁNDAR		7,67	5,33	2,33
RISO R	1	100	0	0
RISO R	2	100	0	0
RISO R	3	100	0	0
MEDIA RISO R		100	0	0
ERROR ESTÁNDAR		0	0	0
PALLAS	1	17	0	83
PALLAS	2	27	0	73
PALLAS	3	33	0	67
MEDIA PALLAS		25,67	0	74,33
ERROR ESTÁNDAR		4,67	0	4,67

Tabla1. Porcentaje de mecanismos de resistencia en cada una de las variedades de cebada: Pallas, P01 y Riso R.

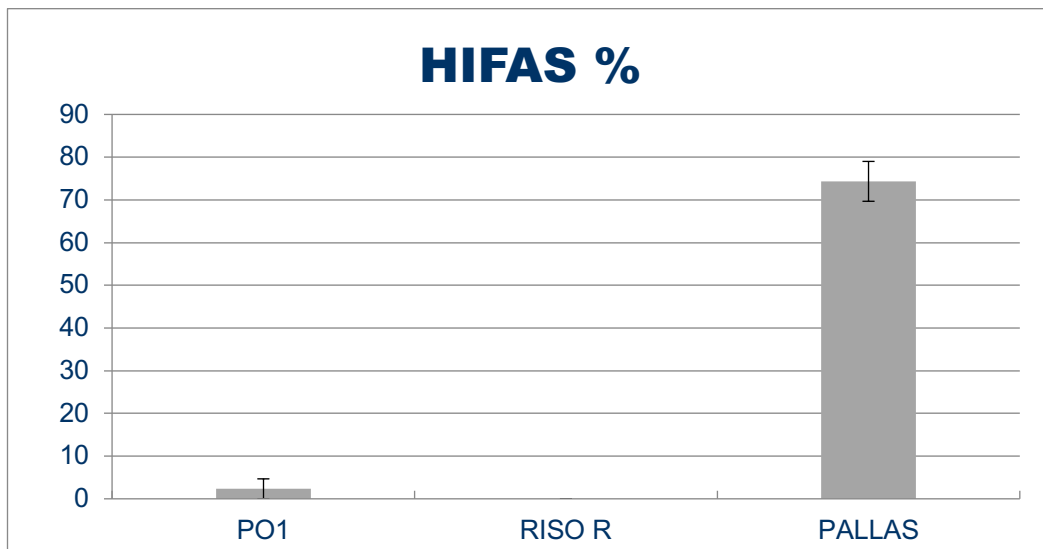
GENOTIPO	PAPILAS %	HR %	HIFAS %
PO1	45,33	52,33	2,33
RISO R	100	0	0
PALLAS	25,67	0	74,33
E.ESTANDAR	7,67	5,33	2,33
E.ESTANDAR	0	0	0
E.ESTANDAR	4,67	0	4,67

Tabla2. Porcentaje medio y error estándar de los mecanismos de resistencia en cada una de las variedades de cebada: Pallas, P01 y Riso R.



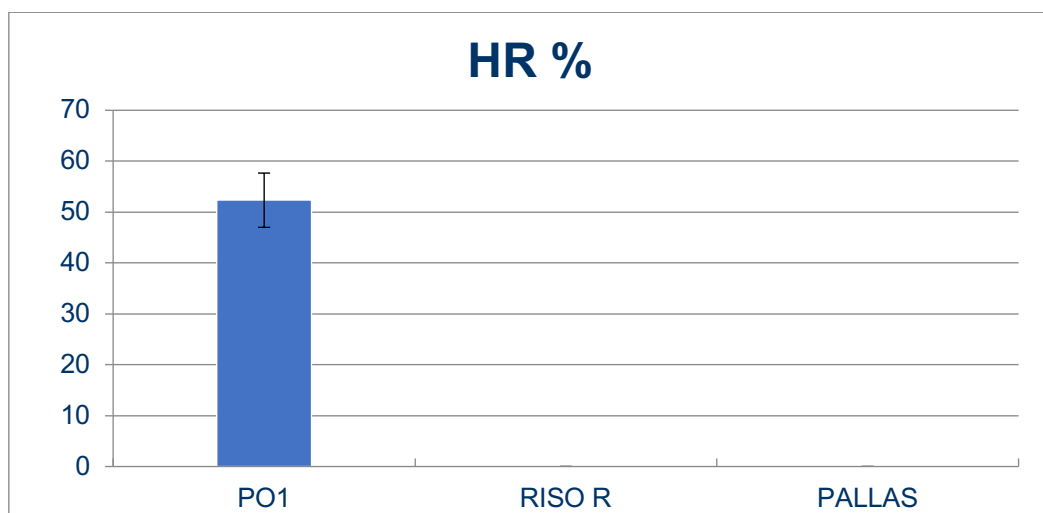
Gráfica1. Porcentaje de papilas en cada una de las variedades de cebada: Pallas, P01 y Riso R.

La formación de papilas es un mecanismo de resistencia primario que se expresa en mayor proporción en P01 y Riso R.



Gráfica2. Porcentaje de hifas en cada una de las variedades de cebada: Pallas, P01 y Riso R.

La formación de hifas se encuentra en mayor cantidad en Pallas , debido a que no han desarrollado mecanismos de resistencia, las hifas están presentes un poco en P01 y sin apenas aparición en Riso R.



Gráfica3. Porcentaje de HR en cada una de las variedades de cebada: Pallas, P01 y Riso R.

La resistencia hipersensible por muerte celular es un mecanismo de defensa que se da sobre todo en P01.

6. Conclusiones

1.- Los datos demuestran que los genotipos Riso R y P01 son las más resistentes porque expresan en menor cantidad la formación de hifas por parte del hongo.

2.-El genotipo Riso R es el más resistente al hongo ya que presenta mayor porcentaje de formación de papilas. Este mecanismo es más interesante ya que es un mecanismo de resistencia primaria que evita la penetración y crecimiento del hongo

3.-El segundo genotipo más resistente, P01 presenta un mayor porcentaje de resistencia hipersensible (HR). Este mecanismo de defensa tiene mayor coste energético para la planta ya que despliega más medios y además sacrifica células propias para impedir el avance del hongo.

4.- Por el contrario, el genotipo Pallas es el más susceptible a la infección por el oídio.

7. Agradecimientos **terminarlos**

-A los investigadores Elena.Prats y Gracia Montilla por habernos enseñado todo lo que conlleva un proyecto científico

-A la Tutora coordinadora IES Elena León por la confianza y apoyo mostrado a su alumnado

-A los proyectos Fidiciencia y Erasmus+ por darnos la oportunidad de realizar esta actividad

-A la Consejería de Educación por darnos la oportunidad de realizar esta actividad

-Al IES Fidiana por darnos la oportunidad de realizar esta actividad

-Y al IAS por darnos la oportunidad de aprender cómo se trabaja en un laboratorio y los pasos que debe seguir una investigación científica.

8. Bibliografía

Hückelhoven R. (2007) Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Ann. Rev. Phytopathol.* 45, 101-127.

Mur LAJ, Kenton P, Lloyd AJ, Ougham H, Prats E. (2008) The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know?

Journal of Experimental Botany 59, 501-20.

Zeyen, R.J., Carver, T.L.W. and Lyngkjaer, M.F. (2002) Powdery Mildews: A Comprehensive Treatise (Belanger, R.R., Bushnell, W.R., Dik, A.J. and Carver, T.L.W. eds). St. Paul, MN, USA: American Phytopathological Society, pp. 107-125.

