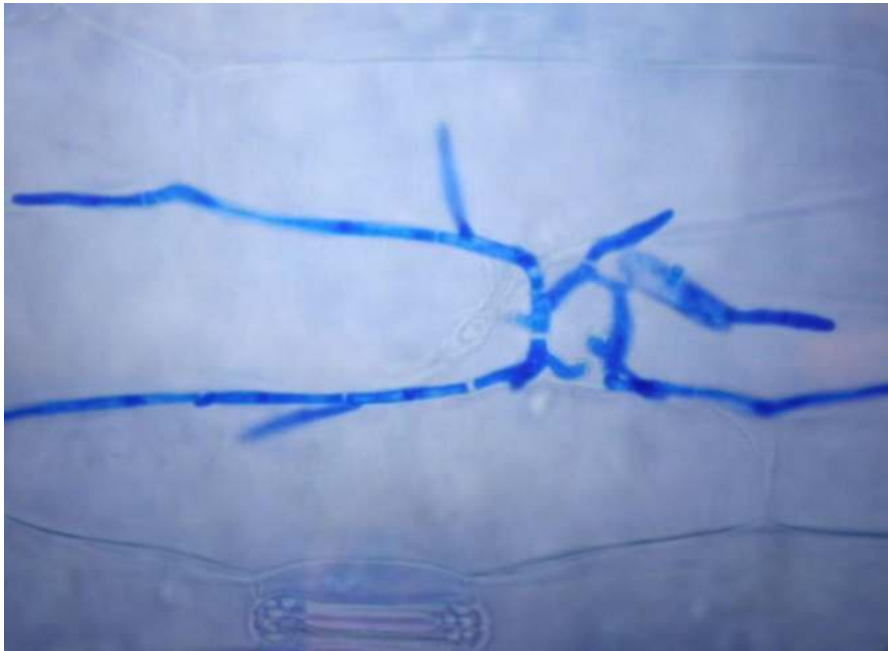


MEMORIA DETECTIVE DE PLANTAS



¿CÓMO SE DEFIENDEN LAS PLANTAS DE LOS PATÓGENOS?

CURSO 2023-24

PROFESORES COORDINADORES: D. Andrés Zamorano Medina y Dña. Elena León Rodríguez

IES Fidiana de Córdoba

INVESTIGADORES: Dra Elena Prats, Dra Gracia Montilla y Dr. Francisco José Canales.

Instituto de Agricultura Sostenible- CSIC de Córdoba

ALUMNADO:

Leoncio Torralbo Jiménez (1º BACH C, IES Fidiana, Córdoba)

Natalia Parejo Martín (1º BACH C, IES Fidiana, Córdoba)

Paula Moreno Contreras (1º BACH C, IES Fidiana, Córdoba)

Rubén Ortiz López (1º BACH C, IES Fidiana, Córdoba)

1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día, el rendimiento de las cosechas es un 22% más bajo de lo que potencialmente podrían ser. Entre los principales factores causantes de esta reducción de rendimiento están las enfermedades en las plantas, las cuales reducen mucho, además, la calidad de las cosechas. Dichas enfermedades también ocurren por el uso intensivo de químicos, por eso se intenta promover una agricultura limpia y sostenible.

En este proyecto, vamos a ver la resistencia de tres variedades de cebada frente al oídio, que es un hongo fitopatógeno que causa grandes e importantes pérdidas económicas, también veremos que cada planta puede tener diferentes mecanismos de resistencia frente a dicho hongo.

2. OBJETIVOS

El objetivo de este proyecto es comprobar la respuesta que tienen tres variedades de cebada al sufrir una infección por oídio y ver cómo se defiende cada una, limitando o no la germinación del patógeno y afectando la producción de hifas, mediante mecanismos de resistencia como las papilas o la reacción hipersensible (HR), para comprobar la planta que presenta mayor resistencia.

3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Primero se comenzará hablando sobre el oídio, una de las enfermedades de hojas más extendida de los cereales en el mundo. Los cereales afectados tendrán problemas de producción. Esto provocaría pérdidas a los agricultores.

El inóculo primario, es decir la principal manera de dispersión del hongo, son las conidias (conidiosporas) que se dispersan por el aire. Una vez que germina, produce un tubo germinativo primario (PGT). Después produce el tubo apresorial (AGT), que iniciará la infección. Para ello produce un apresorio, una especie de gancho que sirve para ejercer presión sobre la célula y penetrarla. Si lo consigue creará un haustorio, una estructura para robarle a la célula el alimento. El haustorio tomará nutrientes que le permiten al hongo crecer y producir hifas a su alrededor, que a su vez forman apresorios secundarios que penetrarán a otras células.

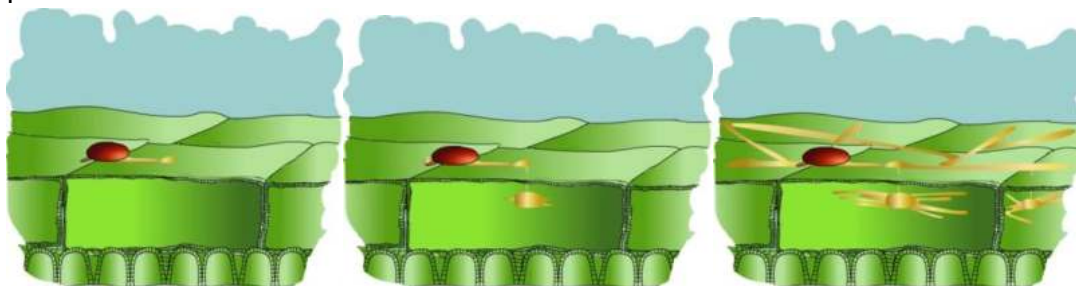


Fig. 1. Diferentes pasos de la infección por oídio

4. MATERIALES Y MÉTODOS

a. Diseño del material experimentado y/o de los instrumentos de recogida de información

Se precisa de:

- Tubos para sembrar las plantas.
- Torre de inoculación, para dispersar las esporas de las hojas enfermas a las sanas con un compresor de aire de manera uniforme.
- Porta para montar una hoja con esporas y visualizarla en el microscopio más adelante.
- Placas de petri, con un papel humedecido en una solución de etanol:ácido acético en proporción 3:1 para la clarificación de la hojas o una solución de ácido láctico:glicerol:agua en proporción 1:1:1. para la fijación.
- Aniline blue al 1% para teñir las hojas.
- Microscopio para evaluar las hojas e identificar las diferentes estructuras de infección del hongo.

b. Diseño del trabajo de laboratorio



En primer lugar, se sembrarán semillas de los diferentes genotipos en tubos para inocular posteriormente sin tener que cortar las plantas. Dichos tubos se dejarán en una cámara climática para controlar su luz y temperatura.

Fig.2. Siembra



Para el experimento se utilizarán hojas de unos 10 días y se utilizarán hojas previamente infectadas y que contienen el hongo en fase de esporulación. Se utilizará la torre de inoculación para soplar las esporas de las hojas enfermas a las sanas. Bajo la torre se colocarán portas de microscopio para realizar el conteo de esporas y verificar la viabilidad de las mismas. Tras la inoculación, las plantas se incuban en una cámara climática con condiciones que favorecen la infección.

Fig. 3. Planta 10 días



A los ocho días se evalúan los síntomas macroscópicos de la enfermedad. A las 48 horas de la inoculación las plantas se fijan en placas Petri sobre papel impregnado de una disolución de solución de etanol:ácido acético en proporción 3:1. Se dejan en la solución hasta su decoloración. Tras esto, se cambian a nuevas placas de Petri donde el papel está humedecido con una solución de ácido láctico:glicerol:agua en proporción 1:1:1.

Fig.4. Decoloración de las hojas

Posteriormente, las muestras se tiñen con una solución de aniline blue al 1%. La solución se deposita sobre el cubre, después la hoja, se echa un poco de lactoglicerol al porta y finalmente el cubre con la hoja adherida se deposita sobre el porta.

Finalmente se evalúan microscópicamente las muestras, identificando las estructuras de infección del hongo y los mecanismos de resistencia que detienen su crecimiento.



Fig. 5. Observación de estructuras de infección en el microscopio

Los datos obtenidos se introducen en una página Excel. Se determinará la media, el error estándar y se creará la gráfica comparativa de los genotipos.

c. Planificación de la investigación

● 1ª Sesión: 30/10/2023

Breve explicación de las normas de seguridad en el laboratorio, objetivos del proyecto, introducción a las enfermedades de las plantas y las respuestas de resistencia. Explicación de las sesiones y comienzo de la experimentación y siembra de plantas.

● 2ª Sesión: 29/11/2023

Inoculación, identificación y conteo de esporas, incubación de plantas, evaluación de síntomas macroscópicos, preparación de muestras para microscopía.

● 3ª Sesión: 31/1/2024

Evaluación de muestras al microscopio.

● 4ª Sesión: 21/2/2024

Análisis e interpretación de datos. Elaboración de un póster científico.



Fig. 6. Distintas fases de la investigación.

5. RESULTADOS

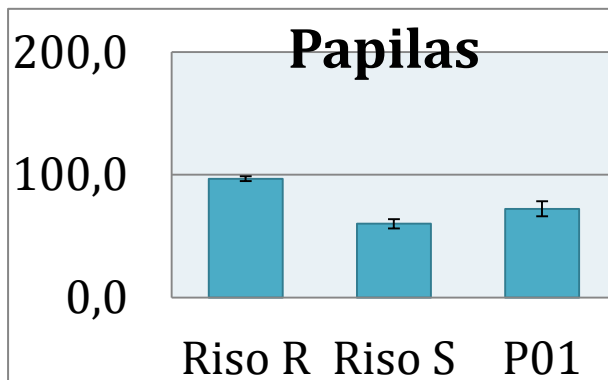
a. Recogida de datos

Con los instrumentos y herramientas necesarias para la obtención de datos, disponiendo del microscopio y una muestra previa para ser examinada por este, se recogen los datos realizando más de una repetición de cada genotipo para poder realizar un análisis estadístico. Se apuntan los datos observados en cada una de las muestras para así poder percibir las diferencias entre cada una. Estos documentos son valorados a través de unas tablas en las que se clasifican dependiendo de la presencia que haya de distintos mecanismos de resistencia en cada muestra. En cada columna se tomarán apuntes a partir de lo observado a través del microscopio. Contando así, la germinación, formación de papilas, de HR y por último de hifas que puedan encontrarse en la hoja inoculada.

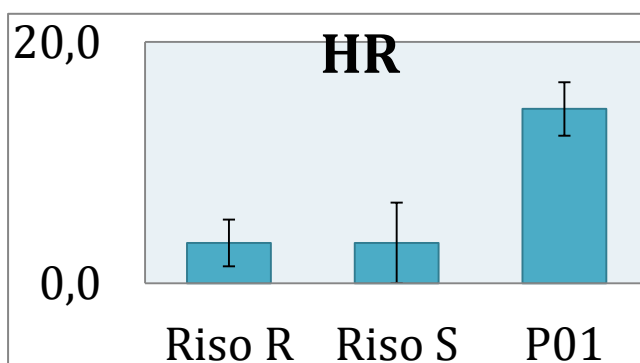
A partir de los distintos resultados que han sido obtenidos a partir de las muestras, en las diferentes gráficas se pueden hacer comparaciones entre estas que sirven de ayuda para su entendimiento. Así podemos valorarlas basándonos en lo observado en ellas. Los resultados son introducidos en un archivo de Excel para poder clasificar los resultados de forma correcta. En cada gráfica se podrá observar el efecto que ha tenido el hongo en los diferentes genotipos.

6. DISCUSIÓN

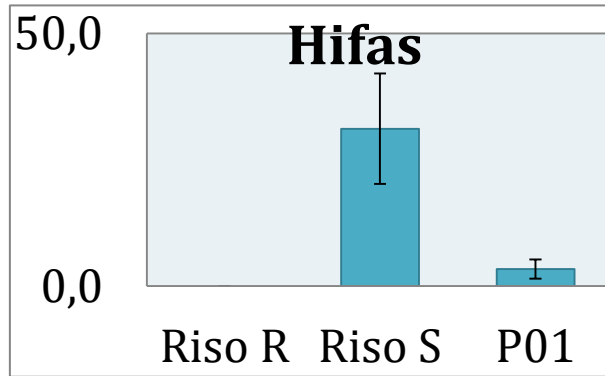
En cada gráfica determinar la valoración de datos obtenidos, dar información sobre los diferentes porcentajes en presencia de HR, formación de papilas y colonias creadas por hifas. Se comparan así las muestras de los diferentes genotipos, entre: Riso R, Riso S y P01. En cada gráfica se valorará los diferentes genotipos a partir de las muestras estudiadas de cada uno.



Gráfica que representa el número de muestras de cada variedad que presentan la formación de papilas.



Gráfica que representa el número de muestras de cada variedad que presentan una respuesta hipersensible



Gráfica que representa el número de muestras de cada variedad que presentan la formación de hifas por parte del hongo

7. CONCLUSIONES

- Nuestro objetivo era descubrir los mecanismos de defensa de las plantas frente a los patógenos
- Finalmente, hemos descubierto que los genotipos RISO-R y P01 son los más resistentes al oídio porque limitan la formación de hifas por parte del hongo.
- Y el genotipo RISO-S es susceptible.

8. AGRADECIMIENTOS

Nuestra opinión final de este trabajo se podría describir en que ha sido apasionante e intrigante en todo momento ya que queríamos descubrir cuáles genotipos eran resistentes a estos patógenos y cuáles eran susceptibles, y una de las cosas más importante es que hemos obtenido muchos conocimientos nuevos sobre las plantas, sus mecanismos de resistencia a patógenos, la forma de investigar y el uso de diversas técnicas para averiguarlo.

Queremos agradecer a:

-A los investigadores Dr. Francisco José Canales, Dra Elena Prats y Dra Gracia Montilla del Instituto de Agricultura Sostenible-CSIC de Córdoba por ayudarnos en todo el proceso de la investigación, y por enseñarnos las pautas a seguir para llegar a nuestro ansiado resultado.

-A los profesores tutores IES que coordinan el proyecto: Elena León Rodríguez, María del Mar Moreda y Andrés Zamorano Medina del IES FIDIANA, por guiarnos y acompañarnos en el proyecto ya que sin ellos nada hubiera sido posible.

-A los centros de investigación: IAS CSIC por dejarnos disfrutar de sus instalaciones y materiales y por proporcionarnos esta investigación tan apasionante.

-Al proyecto fidiciencia 2.0 por brindarnos esta oportunidad única e irrepetible

-A la Consejería de Educación por darnos la oportunidad de realizar este proyecto.

Y finalmente gracias por su apoyo al IES Fidiana y al IAS CSIC.

9. 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.
- Dreiseitl A. (2020). A novel way to identify specific powdery mildew resistance genes in hybrid barley cultivars. *Scientific Reports* 10, Article 18930

ABSTRACT

Los factores ambientales adversos, las enfermedades y las plagas reducen la calidad de las cosechas, las cuales pueden representar un 22 % menos de su rendimiento en condiciones óptimas. La lucha frente a estas enfermedades no debe hacerse solo con el uso intensivo de agroquímica ya que tiene un gran impacto ambiental negativo y amenazan 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 el mayor rendimiento, calidad y sostenibilidad. En este proyecto se identifican los mecanismos de resistencia de diferentes variedades de cebada (Riso R, Riso S, y P01) al oídio, un hongo fitopatógeno que causa importantes pérdidas económicas, para poder seleccionar plantas con mecanismos de resistencia durable, lo cual es esencial en el marco de una agricultura sostenible. Las distintas variedades de cebada se inocularon con oídio utilizando una torre de inoculación y una pistola de aire a presión. Se tomaron datos de germinación y de los diferentes estadios de infección del hongo. Posteriormente, se realizaron tinciones específicas para las estructuras del hongo (conidias y estructuras de la infección), lo que permitió la identificación al microscopio de los diferentes mecanismos de resistencia. Los datos demuestran que los genotipos Riso R y P01 son más resistentes, presentando Riso R una resistencia a la penetración celular y P01 una resistencia hipersensible, mientras que el genotipo Riso S es más susceptible a la infección por el oídio. Los investigadores participantes del IAS están financiados por el proyecto [PID2022-142574OB-I00] financiado por: MICIU/AEI/10.13039/501100011033 y por FEDER, UE