

**CONVENIO DE COOPERACIÓN CIENTÍFICA ENTRE
EL INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA Y LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

Entre LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA, en adelante "LA FACULTAD", con domicilio legal en la calle Haya de la Torre y Medina Allende de la Ciudad de Córdoba, representado en este acto por el Decano Marcelo Mariscal, DNI.: 24627114 por una parte y el INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA, en adelante "EL INTA" con domicilio legal en calle Rivadavia 1439, de la ciudad de Buenos Aires, representado en este acto por el Presidente del Consejo Directivo Ing. Mariano Garmendia, por la otra, acuerdan suscribir el presente Convenio de Cooperación Científica que quedará sujeto a las siguientes cláusulas

FINALIDAD DEL CONVENIO.

PRIMERA: "EL INTA" y "LA FACULTAD", cooperarán para evaluar el "potencial bio-protector contra plagas y microorganismos de nanoemulsiones de Ramnolípidos conteniendo aceites esenciales aplicadas sobre cultivos de interés agroindustrial" de acuerdo con el Proyecto de Trabajo y Cronograma de Actividades presentados en el Anexo I.

COMITÉ COORDINADOR

SEGUNDA: A los efectos del logro de los fines propuestos, se crea un Comité Coordinador integrado por un miembro titular y uno suplente por cada una de las partes, el que deberá constituirse dentro de los quince (15) días de la firma del convenio. Las partes podrán reemplazar sus representantes cuando así lo consideren conveniente, con obligación de comunicar por escrito en forma inmediata a la otra parte, los reemplazantes designados.

TERCERA: El Comité Coordinador tendrá las siguientes atribuciones y funciones: a) Preparar el Programa Anual de Actividades, el correspondiente presupuesto anual de gastos y el flujo de fondos para su ejecución. b) Modificar el Programa Anual de Actividades y su correspondiente presupuesto en cualquier momento de su desarrollo, cuando a través del seguimiento se compruebe la necesidad de hacerlo para el logro de los objetivos del convenio. c) Proceder al seguimiento de los trabajos afectados al convenio y establecer el grado de avance del Proyecto. d) Tratar todas las formulaciones, propuestas y/o recomendaciones que surjan de las partes contractuales, referente al Proyecto conjunto y que no estén comprendidas en el detalle de funciones. e) Resguardar la confidencialidad de la información cuando la misma tenga este carácter. f) Aprobar las publicaciones y/o documentos producidos. g) Lo tratado y resuelto en las reuniones ordinarias y extraordinarias será consignado en actas las que deberán ser firmadas por los miembros titulares y suplentes presentes de cada institución; además, serán elevadas copias a las autoridades respectivas, la Dirección de Relaciones Institucionales del INTA y a la Prosecretaria de Valorización del Conocimiento y Transferencia Tecnológica de la "LA FACULTAD"

OBLIGACIONES DEL INTA

CUARTA: El INTA, a través del Instituto de Patología Vegetal, conducirá los trabajos necesarios para el logro de los objetivos indicados en la cláusula primera. El INTA designará como responsable del presente convenio a la Dra. Natalia G. Meneguzzi con funciones de coordinación y responsabilidad de la ejecución técnica y administrativa de las actividades correspondientes al INTA.

QUINTA: "EL INTA" se compromete a aportar los recursos económicos y físicos necesarios para el logro de los objetivos indicados en la cláusula cuarta, detallados en el Anexo II.

SEXTA: "EL INTA" se compromete a aportar el personal profesional detallado en el Anexo III,

especificando su responsabilidad y tiempo afectado por cada uno de ellos. EL INTA, a través del Comité Coordinador, se obliga a comunicar por escrito, a "LA FACULTAD" sobre los cambios eventuales que pudieran producirse, con la obligación de que los mismos no afecten el objetivo del presente convenio ni el programa de actividades estipulado.

OBLIGACIONES DE "LA FACULTAD"

SEPTIMA: "LA FACULTAD" a través del Departamento de Química Biológica Ranwel Caputto, conducirá los trabajos necesarios para el logro de los objetivos indicados en la cláusula primera y detallados en el cronograma del Anexo I. "LA FACULTAD" designará como responsable del presente convenio a la Dra. Georgina Fabro con funciones de coordinación y responsabilidad de la ejecución técnica y administrativa de las actividades correspondientes a "LA FACULTAD".

OCTAVA: "LA FACULTAD", se compromete a acompañar la ejecución de los recursos económicos y físicos necesarios para el logro de los objetivos indicados en la cláusula primera y detallados en el Anexo I y Anexo II.

NOVENA: "LA FACULTAD" se compromete a aportar el personal profesional enunciado en el Anexo III, especificando la responsabilidad y tiempo afectado por cada uno de ellos para el cumplimiento de las actividades. "LA FACULTAD", a través del Comité Coordinador, se obliga a comunicar por escrito a "El INTA" sobre los cambios eventuales que pudieran producirse con la obligación que los mismos no afecten el objetivo del presente convenio ni el programa de actividades estipulado.

INSTRUMENTACION.

DECIMA: En los años sucesivos a la firma del presente Convenio, las partes, a través del Comité Coordinador, deberán elaborar y elevar a las autoridades competentes, para su aprobación y firma, las actas donde se establece el proyecto de trabajo, cronograma anual de actividades, el presupuesto anual estimado y personal participante. Se entiende por autoridad competente por el INTA al director del Centro de Investigaciones Agropecuarias y al Secretario General de la "LA FACULTAD".

CONFIDENCIALIDAD

DECIMO PRIMERA: Cada una de las partes se compromete a no difundir las informaciones científicas o técnicas pertenecientes a la otra parte, a las que haya podido tener acceso, siempre que esas informaciones no sean de dominio público, o las partes acuerden expresamente lo contrario. Los datos e informes obtenidos durante la realización de los proyectos o acciones conjuntas, así como los resultados finales tendrán carácter confidencial, y su utilización total o parcial para su publicación, conferencia u otras modalidades de difusión, requerirá conformidad expresa de ambas partes.

PROPIEDAD INTELECTUAL.

DECIMO SEGUNDA: Si como consecuencia de los trabajos realizados en el presente Convenio, se obtuviesen resultados que permitan el depósito de derechos de propiedad intelectual, los porcentajes de participación en la propiedad intelectual y la carga de los costos necesarios para la obtención serán definidos en un nuevo convenio de Vinculación Tecnológica.

EXPLOTACION DE LOS RESULTADOS.

DECIMO TERCERA: Si como consecuencia de los trabajos realizados en el presente Convenio, se obtuviesen resultados que permitan la explotación comercial de los resultados de la investigación, las partes acordaran la distribución de los beneficios que deriven de su explotación en un CONTRATO

DE LICENCIA que se realizará con el licenciatario encargado de tal explotación comercial.

PROPIEDAD DE LOS BIENES.

DECIMO CUARTA: Los bienes muebles e inmuebles de “LA FACULTAD” y de “EL INTA” afectados a la ejecución del presente convenio que se destinen al desarrollo de los planes de trabajo, o los que pudieran agregarse y/o utilizarse en el futuro, continuarán en el patrimonio de la parte a la que pertenecen, o con cuyos fondos hubiesen sido adquiridos, salvo determinación en contrario manifestada formalmente.

DECIMO QUINTA: Los elementos inventariados entregados por una de las partes a la otra en calidad de préstamo deberán ser restituidos a la parte que los haya facilitado una vez cumplida la finalidad para la que fueron entregados, en buen estado de conservación, sin perjuicio del desgaste ocasionado por el uso normal y la acción del tiempo. La partereceptora será considerada a todos los efectos como depositaria legal de los elementos recibidos.

AUTONOMIA DE LAS PARTES Y RESPONSABILIDADES

DECIMO SEXTA: El INTA y “LA FACULTAD” dejan formalmente establecido que cada una afrontará los riesgos de accidentes y/o enfermedades de su propio personal mientras desempeñen sus actividades y se hará cargo del mantenimiento de los bienes puestos a su disposición para el cumplimiento de los objetivos del presente convenio. También asumirán la responsabilidad por todo acto u omisión que cause gravamen de cada una de las partes respecto a su propio personal.

DECIMO SEPTIMA: La falta de cumplimiento de sus obligaciones por parte del personal del “LA FACULTAD” o de “EL INTA” afectado a la ejecución del presente convenio determinará la elevación de los respectivos antecedentes, previo informe del Comité Coordinador, a la parte de quien dependa a los efectos de que adopten las medidas que correspondan según los estatutos que lo rijan.

DECIMO OCTAVA: En toda circunstancia o hecho que tenga relación con este instrumento las partes mantendrán la individualidad y autonomía de sus respectivas estructuras técnicas y administrativas y asumirán particularmente en consecuencia, las responsabilidades consiguientes.

POSIBILIDAD DE ACUERDOS CON IGUAL FINALIDAD.

DECIMO NOVENA: Se deja expresa constancia que la suscripción del presente Convenio no significa un obstáculo para que la “LA FACULTAD” o “EL INTA” en forma conjunta o individual puedan celebrar otros acuerdos con idéntica finalidad con otras Entidades o Instituciones del país o del extranjero. En ese supuesto las partes deberán notificar anticipadamente a la otra, dándole la intervención necesaria a fin de coordinar posibles tareas comunes.

RECAUDOS PARA EL NORMAL DESARROLLO.

VIGESIMA: “LA FACULTAD” o “EL INTA” en forma conjunta o separada tomarán los recaudos necesarios para evitar interferencias de cualquier índole que alteren el normal desarrollo de las actividades que surjan de los compromisos adquiridos por el presente convenio y las que les corresponden específicamente.

BUENA FE Y CORDIALIDAD.

VIGESIMO PRIMERA: “LA FACULTAD” y “EL INTA” observarán en sus relaciones el mayor espíritu de colaboración y las mismas se basarán en los principios de buena fe y cordialidad en atención a los altos fines perseguidos en común con la celebración del presente convenio.

CONTROVERSIAS Y JURISDICCION.

VIGESIMO SEGUNDA: Las partes se comprometen a resolver en forma directa y amistosa entre ellos y por las instancias jerárquicas que correspondan, los desacuerdos y discrepancias que pudieran originarse en el planteamiento y ejecución de las actividades, y en caso de contienda judicial se someten a la jurisdicción y competencia de los Tribunales en lo Contencioso Administrativo Federal y Civil y Comercial Federal de la Capital Federal, renunciando a cualquier otro fuero o jurisdicción que pudiera corresponder.

NOTIFICACIONES.

VIGESIMO TERCERA: Para todos los aspectos legales, las partes constituyen los domicilios que se mencionan "*ad initio*".

DURACION.

VIGESIMO CUARTA: El presente convenio tendrá una duración de un (1) año y entrará en vigencia a partir de la fecha de su firma, podrá ser prorrogado por un término igual mediante acuerdo de las partes y previa evaluación de los resultados obtenidos.

RESCISION.

VIGESIMO QUINTA: Cualquiera de las partes podrá rescindir el presente convenio cuando la otra no cumpla con la/s obligación/s establecidas en el mismo. Previamente deberá intimarse el cumplimiento efectivo de la/ misma/s, en un término de treinta (30) días corridos, bajo apercibimiento de proceder a la rescisión de este convenio.

VIGESIMO SEXTA: Cualquiera de las partes podrá rescindir unilateralmente el presente convenio comunicándolo por escrito a la otra parte con una anticipación de treinta días (30) a la fecha del vencimiento. La rescisión no dará derecho alguno a las partes a formular reclamos de indemnizaciones de cualquier naturaleza. En caso de una rescisión de esta índole, los trabajos en ejecución deberán continuar hasta su finalización.

En prueba de conformidad, se firman dos (2) ejemplares de un mismo tenor y a un solo efecto en la ciudad de a los días del mes de del año dos mil

por INTA

por "LA FACULTAD"

ANEXO I

CONVENIO DE COOPERACIÓN CIENTÍFICA ENTRE EL INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA Y LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

NOMBRE DEL PROYECTO: “Evaluación del potencial bio-protector contra plagas y microorganismos de nanoemulsiones de Ramnolípidos conteniendo aceites esenciales aplicadas sobre cultivos de interés agroindustrial”

EQUIPO DE TRABAJO: Dra. Lucille Tihomirova Kourdova (Becaria Postdoctoral-Prof. Asistente DS FCQ-UNC), Dra. Georgina FABRO (Inv. Adjunta CONICET, Prof. Adjunta UNC), Dra. María Laura Fanani (Inv. Principal CONICET, Prof. Titular UNC). Dra. Natalia G. Meneguzzi (Investigadora IPAVE-CIAP-INTA). Estud. Biotecnología Paula Maritano (FCQ, UNC).

LUGARES DONDE SE DESARROLLARÁ EL PROYECTO: Los experimentos de biología molecular se realizarán en el departamento de Química Biológica “Ranwel Caputto” (DQBRC-FCQ-UNC). Los experimentos de crecimiento de patógenos y testeo en invernadero en plantas de poroto se realizarán en espacio asignado a la Dra. Natalia Meneguzzi, IPAVE, INTA, Camino 60 cuadras km 5.5, X5119 Córdoba.

FINANCIAMIENTO:

- Subsidio Mabel Yudi, otorgado a la Dra. Kourdova (FCQ-UNC).
- PICT-2019-02331 otorgado a la Dra. Fanani, del cual la Dra. Fabro forma parte del grupo colaborador (FCQ-UNC).
- Fundación ArgenINTA, fondos administrados por la Dra. Meneguzzi (IPAVE-CIAP-INTA).

ANTECEDENTES

El poroto es una de las legumbres más consumidas en el mundo, tercera después de la soja y el maní. Este cultivo se destaca por su alto valor para ser comercializado por ser rico en proteínas y carbohidratos, siendo Argentina su principal exportador. Este cultivo se concentra principalmente en el Noroeste argentino; sin embargo, en los últimos años se ha incrementado su producción también en Córdoba (Reginatto, 2018). Las pérdidas en el rendimiento de las cosechas de esta legumbre se deben a distintos estresores abióticos (cambios en las condiciones climáticas) y bióticos, como hongos, virus y bacterias, que causan múltiples enfermedades en los cultivos (Casalderrey, 2018).

El tizón bacteriano (*Halo Blight*) del poroto es causado por la infección con las bacterias patógenas *Pseudomonas syringae* y *Xantomonas*. Se caracteriza por generar lesiones empapadas de agua en hojas, vainas, tallos o pecíolos, que rápidamente desarrollan halos amarillo verdosos (Arnold *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2021). Esta enfermedad causa grandes pérdidas en los cultivos de todo el mundo y es una de las enfermedades del poroto más difíciles de controlar, debido a que no existe un tratamiento curativo, sólo preventivos. Hasta el momento, el control de la enfermedad consiste en el uso de semillas con certificación sanitaria y/o la desinfección de las mismas con antibióticos, como así también el uso de semillas con resistencia genética (Zhang *et al.*, 2017). Para las plantas adultas se recomienda la pulverización con un bactericida genérico a base de cobre cuando aparecen los primeros síntomas. Sin embargo, su eficacia es limitada en la fase de floración, cuando los síntomas sólo pueden reducirse, pero no eliminarse. Dado que el cobre es un metal pesado, estos tratamientos también son perjudiciales para el medio ambiente y además se han documentado algunas cepas de *P. syringae pv. phaseolicola* resistentes al cobre (Zhang *et al.*, 2017). Es sabido que el uso desmedido de antibióticos y pesticidas en el ambiente conduce a la selección de bacterias hiperresistentes, cada vez más difíciles de eliminar. Por ello, es importante desarrollar nuevas formulaciones que puedan combatir o prevenir la enfermedad sin ser perjudiciales para el ambiente y la salud humana.

Una de las estrategias empleadas en la actualidad para combatir las enfermedades de las plantas es aumentar sus respuestas de defensa innata, provocando la inducción de un estado de memoria inmunológica de amplio espectro o *priming*. Esto permite que, frente a futuras infecciones, las plantas puedan responder con mayor rapidez y eficiencia a la presencia del patógeno (Ramírez-Carrasco, Martínez-Aguilar and Alvarez-Venegas, 2017). Distintos tratamientos con moléculas exógenas pueden inducir ese estado de *priming*, mejorando la respuesta inmune y la resistencia de las plantas a futuros estresores, tanto bióticos como abióticos. Así como en otras plantas, se conoce que la inducción de *priming* en el poroto mejora su resistencia a la infección de *P. syringae pv. phaseolicola* (Martínez-Aguilar *et al.*, 2016; Ramírez-Carrasco, Martínez-Aguilar and Alvarez-Venegas, 2017). Por lo cual, el uso de inductores de resistencia naturales o sintéticos para incrementar la inmunidad de las plantas es comercialmente atractivo, ya que no afectan negativamente al ambiente ni a los futuros consumidores, como se observa con el control químico con pesticidas.

Los Rhamnolípidos (RLs), producidos naturalmente por algunos microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa*, forman parte de los compuestos que pueden generar una respuesta inmune inducida en las plantas (Vatsa *et al.*, 2010; Sanchez *et al.*, 2012; Crouzet *et al.*, 2020). Se ha demostrado que estos glicolípidos tienen una amplia gama de propiedades antibacterianas y antifúngicas, ya sea directamente o a través de la estimulación del sistema inmunitario innato de las plantas (Vatsa *et al.*, 2010; Sanchez *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2017; Crouzet *et al.*, 2020). Debido a que son fácilmente biodegradables y que presentan una baja ecotoxicidad (Randhawa and Rahman, 2014), los RLs muestran un alto potencial para ser utilizados en la agricultura. Además, los RLs naturales son excelentes estabilizadores de emulsiones, por lo cual pueden ser capaces de encapsular compuestos hidrofóbicos bioactivos como los aceites esenciales (AEs), con conocidas propiedades antimicrobianas, combinando así las propiedades de ambos componentes y mejorando su eficacia como bioprotectores de las plantas. En los laboratorios de la Dra. Fabro y la Dra. Fanani, donde la Dra. Kourdova realiza sus investigaciones posdoctorales, se están desarrollando distintas nanoemulsiones de RLs y AEs de ruda, tomillo y árbol de té, con el fin de aplicarlos a plantas para mejorar su respuesta a infecciones con distintos patógenos y al ataque de insectos. Las nanoemulsiones conformadas por RLs y n-hexadecano (HD), un aceite de propiedades inertes, mostraron la capacidad de actuar como estimulantes del sistema inmune de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, mejorando su respuesta a la infección bacteriana de *Pseudomonas syringae pv tomato DC3000* (Mottola *et al.*, 2023). Además, estas nanoemulsiones fueron inocuas para la microbiota natural del suelo y para distintos microorganismos beneficiosos que suelen ser utilizados en formulaciones como bioinoculantes de semillas (Mottola *et al.*, 2023). Resultados preliminares indican que los RLs + AEs también disminuyen el crecimiento de bacterias patógenas en *A. thaliana* (Fig.1A) y tendrían una capacidad superior aún a la de los RLs + HD para combatir la infección de *P. syringae in planta* (Fig.1 B), sin afectar significativamente el crecimiento del patógeno *in vitro* (Fig.1 C). Esto sugiere que la disminución de la cantidad de patógeno en el tejido vegetal podría deberse a una mejora en la respuesta inmune de las plantas (Kourdova, datos sin publicar).

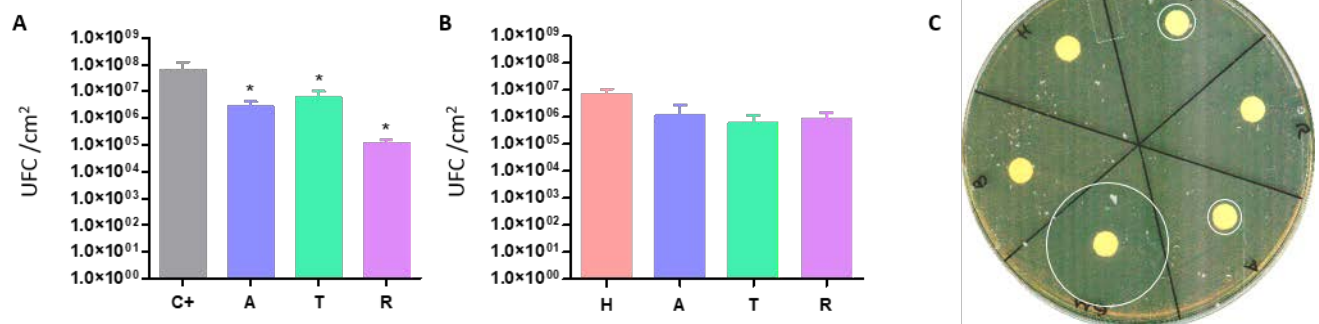


Fig. 1. Potencial de las nanoemulsiones de RLs y AEs para inhibir el crecimiento de *Pseudomonas syringae pv tomato DC3000*. (A) y (B) Se muestra el crecimiento bacteriano a las 72 horas post-infección de *Arabidopsis thaliana*, habiendo pre tratado las plantas con las nanoemulsiones. C+: control positivo de infección, sin RLs. A, T, R: nanoemulsiones de RLs + AEs de A - árbol de té, T - tomillo, R - ruda y H - hexadecano. UFC/cm²: unidades formadoras de colonia por centímetro

cuadrado de tejido foliar. Se muestran dos experimentos independientes. La evaluación estadística se realizó a través de *One Way ANOVA* con *Tukey's post hoc test*. * $p < 0,5$. (C) Inhibición del crecimiento de *Pseudomonas syringae pv tomato DC3000 in vitro* a través de ensayo de difusión en disco. Se muestra el halo de inhibición del crecimiento bacteriano (en blanco) ocasionado por los distintos tratamientos. B: buffer, GM: gentamicina como control positivo de inhibición.

HIPOTESIS: Estos resultados sugieren que **la inducción de la inmunidad vegetal y/o priming a través de la aplicación de nanoemulsiones compuestas por RLs y AEs en plantas de interés agrícola, como es el poroto, podría constituir una estrategia de control de plagas bacterianas efectiva, económica y sustentable.**

OBJETIVOS: En relación a lo expuesto anteriormente, el **OBJETIVO GENERAL** de este proyecto es **estudiar el efecto de las nanoemulsiones de RLs y AEs sobre el crecimiento de patógenos vegetales en el cultivo de poroto.**

Para cumplir con el objetivo general del proyecto se proponen los siguientes **OBJETIVOS ESPECÍFICOS (OE):**

1. Evaluar el potencial de las nanoemulsiones (NEs) como desencadenantes de las respuestas de defensa y el establecimiento de priming del poroto común (*Phaseolus vulgaris L.*).

Primero se analizará la capacidad de las NEs de inducir marcadores de defensa (biomarcadores) en plantas sanas (hojas) evaluando diferentes protocolos de pretratamiento con NEs previos a la inoculación de bacterias patógenas aisladas de semillas de poroto (dosis, tiempos, sistemas de aplicación) para determinar el más adecuado. Luego, se realizarán infecciones de prueba con bacterias patógenas aisladas de semillas de poroto por la Dra. Meneguzzi, que han sido pre-clasificadas por su nivel de agresividad en base a sintomatología (lesiones causadas en hojas). Las bacterias serán aplicadas post-tratamiento con NEs, y se volverá a analizar la expresión génica a diferentes tiempos para evidenciar la existencia o no del fenómeno de priming o resistencia inducida, a nivel molecular.

2. Evaluar el efecto de las nanoemulsiones (NEs) sobre el cultivo del poroto común (*Phaseolus vulgaris L.*) en respuesta a condiciones de estrés biótico causado por infecciones bacterianas.

En base a los antecedentes del grupo obtenidos con la planta modelo *A. thaliana*, se postula que NEs con combinaciones óptimas de RLs y AEs podrían tener la capacidad de disminuir la proliferación de patógenos bacterianos en plantas de interés agrícola hortícola, como el poroto. Para abordar este objetivo se evaluará: a) si las nanoemulsiones tienen efectos inhibitorios directos sobre el crecimiento de los patógenos bacterianos *in vitro*, b) si las NEs causan alteraciones fisiológicas/histológicas en los tejidos vegetales, tanto transitorias asociadas a respuestas de defensa, como permanentes y no deseadas (ej: muerte), y c) si los pre-tratamientos de plantas con NEs afectan el desarrollo de síntomas de enfermedad y el crecimiento del patógeno *in planta*. Para ello se estudiarán parámetros de crecimiento bacteriano *in vivo* y se realizarán fenotipados de plantas inoculadas y no inoculadas (pre tratadas o no con NEs) para evaluar y cuantificar distintos aspectos del progreso de la infección bacteriana y del desarrollo vegetal normal.

3. Evaluar la toxicidad de las nanoemulsiones sobre la microbiota natural del suelo y bioinoculantes de uso agrícola.

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal son microorganismos que existen en la rizosfera y participan directa o indirectamente en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Debido a su bajo coste y a su sencillo método de aplicación, el uso de estos bioinoculantes se recomienda en la agricultura sostenible para mejorar el estado nutricional de las plantas y para suprimir los patógenos transmitidos por el suelo (Verma *et al.*, 2018). Para evaluar el impacto ambiental de las NEs se realizarán ensayos de crecimiento microbiano *in vitro*, evaluando la posible toxicidad de los preparados sobre microbiota presente naturalmente en el suelo y sobre distintos bioinoculantes de uso agrícola.

MATERIALES Y MÉTODOS

Nanoemulsiones: Para obtener las diferentes nanoemulsiones, se combinarán los RLs naturales

extraídos de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* con AEs de tomillo, ruda o árbol de té. Estas se formarán por ultrasonificación con diferente relación RLs / AEs y su estabilidad será monitoreada por dispersión dinámica de la luz. Como control de emulsificación se utilizará el aceite n-hexadecano, que no posee el efecto bioactivo de los AEs. Se prepararán las NEs como se indica en Mottola et al., 2023 en el DQBRC-FCQ-UNC.

Plantas: Plantas de poroto común (*Phaseolus vulgaris* L. (diferentes cultivares de interés) de entre 1 y 3 semanas (estadio V2, V3). Se cultivarán en el invernadero asignado a la Dra. Meneguzzi (IPAVE-INTA).

Bacterias: Se utilizarán 4 cepas aisladas por la Dra. Meneguzzi de semillas de Porotos, que ella ha determinado que provocan síntomas del tizón bacteriano en campo con diferentes niveles de agresividad. Estas cepas pertenecen al género *Xanthomonas* pero su especie y subespecie están siendo determinadas. Utilizaremos un código de nomenclatura para proteger propiedad intelectual en caso que la especie sea secuenciada y su caracterización publicada por investigadores de INTA.

OE1. Para investigar la capacidad de las nanoemulsiones de RLs + AEs para inducir respuestas de defensa de las plantas a nivel molecular, se monitoreará la expresión de genes marcadores de defensas correspondientes a las vías de señalización del ácido salicílico (SA) y del ácido jasmónico (JA) seleccionados en base a bibliografía sobre activación de estas vías hormonales de defensa en poroto (Foucher *et al.*, 2020). Se comparará la expresión de dichos genes marcadores en plantas infectadas vs. no infectadas en presencia/ausencia de las nanoemulsiones, a diferentes tiempos post aplicación (3 días, 10 días, 30 días), con diferentes cantidades de NEs (a concentraciones de RLs 100, 300 y 1000 micromolar) y en diferentes tejidos que hayan sido expuestos directamente o no a los RLs + AEs, a los fines de determinar el posible establecimiento de *priming* luego de la inducción local de defensas debido al uso de las nanoemulsiones. Se determinarán las combinaciones más efectivas de tiempos y concentraciones según el nivel de activación de los genes biomarcadores. Condiciones seleccionadas se testearán repetidamente en invernadero como se describe en el objetivo 2.

OE2. Las plantas de poroto serán tratadas con distintas técnicas de infección a los fines de elegir la más apropiada y que más se asemeje a la infección que se da en los campos. Se utilizará como control positivo de la infección de las hojas el corte de estas con un bisturí embebido con la bacteria (método utilizado previamente por la Dra. Natalia Meneguzzi). Se comparará la aplicación del patógeno por rociado, por depósito de gota sobre la hoja y por infiltración con jeringa. En un segundo experimento se probará la capacidad de las nanoemulsiones de disminuir la proliferación del patógeno bacteriano realizando una curva de dosis respuesta de NEs, tanto en cultivos líquidos como sólidos del patógeno aislado, de manera *in vitro*. Luego se evaluarán los efectos de las NEs sobre el crecimiento de la bacteria *in planta*. Para ello, plantas de poroto (estadio V2, V3) serán tratadas a través de la aplicación seleccionada (ej: mediante spray) de las NEs sobre las hojas. Luego, X días post-tratamiento (tiempo de inducción de defensas testeado en el OE1) se realizarán sobre las mismas infecciones con el patógeno bacteriano siguiendo la metodología previamente establecida. Posteriormente se evaluarán y cuantificarán (fotografiado y medición) los síntomas macroscópicos de la infección bacteriana a los fines de elegir la dosis que genera mejor respuesta frente al patógeno. En un tercer set de experimentos se tratará a las plantas con la/las dosis elegida/s de nanoemulsiones y se monitoreará el crecimiento (biomasa u otros parámetros) durante los tratamientos para detectar si hay efectos negativos sobre el desarrollo vegetal. Asimismo, se procederá a determinar los parámetros fisiológicos e histológicos propios de la respuesta de defensa vegetal en plantas infectadas vs. no infectadas pre tratadas o no con las nanoemulsiones (inducción de muerte celular programada mediante tinción con azul de tripano, acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante la tinción con 3',3'-diaminobencidina (DAB) y deposiciones de callosa en la pared celular mediante tinción con azul de anilina (Cambiagno *et al.*, 2015; Fabro, Rizzi and Alvarez, 2016; Mottola *et al.*, 2023). Este objetivo será realizado en conjunto en ambas instituciones: los ensayos de laboratorio serán realizados en el DQBRC con muestras crecidas e inoculadas en el IPAVE.

OE3. Para analizar la toxicidad de las nanoemulsiones sobre la microbiota del suelo se rociará el

sustrato de crecimiento de las plantas con las distintas preparaciones de RLs + AEs y posteriormente se evaluará el crecimiento de microorganismos extraídos del suelo. Paralelamente se evaluará el efecto de las nanoemulsiones sobre el crecimiento de distintos bioinoculantes cuyo uso en los cultivos favorece el crecimiento de las plantas (Verma *et al.*, 2018) y que suelen utilizarse en la siembra de poroto. Se investigará el efecto sobre las bacterias benéficas *Pseudomonas fluorescens* y *Azospirillum argentinense*, como así también sobre los hongos del género *Trichoderma spp.* Este objetivo será realizado en el DQBRC.

RESULTADOS ESPERADOS

1. Se espera obtener nanoemulsiones de RLs + AEs estables en el tiempo que afecten negativamente el crecimiento y/o capacidad infectiva de distintos organismos patógenos sobre las plantas. Dado que se conoce que los RLs *per se* presentan propiedades antimicrobianas frente a distintos patógenos, se teoriza una respuesta potenciada por los AEs, y de amplio espectro, permitiendo combatir múltiples enfermedades y ser extrapolable a diferentes cultivos. De esta manera, se trasladarían los resultados obtenidos en *A. thaliana* hacia el cultivo del poroto.

2. Se espera que las nanoemulsiones induzcan la expresión de marcadores de activación del sistema inmune de las plantas, provocando una respuesta de defensa sistémica en las mismas, pudiendo generar protección/resistencia en cualquier tejido vegetal, incluso uno distinto al lugar de aplicación. Además, se especula la inducción de una respuesta de *priming*, prolongada en el tiempo, lo cual permitiría a los vegetales hacer frente de una manera más rápida y eficaz a distintas situaciones de estrés biótico, que puedan aparecer posteriormente a la aplicación de las nanoemulsiones.

3. Se espera que la aplicación de las nanoemulsiones no tenga efectos perjudiciales sobre el crecimiento normal de las plantas y que además no exhiba efectos tóxicos sobre el ambiente, esto es: que no afecten de manera significativa al crecimiento de la microbiota natural del suelo ni tampoco interfieran con la sobrevivencia de distintos organismos benéficos/bioinoculantes.

La realización de este proyecto es relevante para extender/trasladar los resultados obtenidos en laboratorio con un modelo de estudio (*A. thaliana*) hacia plantas de cultivo de interés agrícola (Poroto). Además, permitirá iniciar conexiones con el INTA, industrias/incubadoras/proyectos biotecnológicos, que permitan continuar con la transferencia tecnológica al área agropecuaria, aportando una alternativa “verde” al mantenimiento de la sanidad vegetal en cultivos de interés agroindustrial. Además, será útil para que investigadores del INTA puedan caracterizar los aislados bacterianos de campo que están estudiando (secuenciamiento, patogenicidad, etc).

CRONOGRAMA DE TRABAJO (1 AÑO).

Mes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
OE1	x	x	x	x	x	x	x	x	x			
OE2					x	x	x	x	x	x	x	x
OE3		x	x	x	x	x	x					

PRESUPUESTO- COSTOS APROXIMADOS (USD/AR\$ a Septiembre 2023) a cubrir con el FINANCIAMIENTO DISPONIBLE ACTUAL Y SUBSIDIOS FUTUROS A SOLICITAR.

Categorías x OE	Biol. Mol	Invernadero
OE1	Fenol, DEPC, DNAsa, MMLV, qPCR mix: USD 450/AR\$ 157500.	Sustrato/macetas USD70/AR\$24.500
OE2	RLs, AEs, medios cultivo bacterianos (USD 600+450+60=1110/AR\$ 388500)	Sustrato/macetas USD210/AR\$73.500

OE3	Medios de cultivo USD200/AR\$ 70000.	Sustrato/macetas USD70/AR\$24.500
-----	--------------------------------------	-----------------------------------

BIBLIOGRAFÍA

- Arnold, D.L. *et al.* (2011) 'Pseudomonas syringae pv. phaseolicola: from "has bean" to supermodel', *Molecular Plant Pathology*, 12(7), pp. 617–627. doi:10.1111/J.1364-3703.2010.00697.X.
- Cambiagno, D.A. *et al.* (2015) 'The synthetic cationic lipid diC14 activates a sector of the Arabidopsis defence network requiring endogenous signalling components', *Molecular Plant Pathology*, 16(9), pp. 963–972. doi:10.1111/mpp.12252.
- Casalderrey, N.B. (2018) *Enfermedades del poroto (Phaseolus vulgaris) causadas por hongos y bacterias en el Noroeste argentino*. Available at: <https://inta.gov.ar/documentos/enfermedades-del-poroto-phaseolus-vulgaris-causadas-por-hongos-y-bacterias-en-el-noroeste-argentino-0>.
- Chen, Jianwei *et al.* (2017) 'Potential applications of biosurfactant rhamnolipids in agriculture and biomedicine', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(23–24), pp. 8309–8319. doi:<https://doi.org/10.1007/s00253-017-8554-4>.
- Chen, N.W.G. *et al.* (2021) 'Common bacterial blight of bean: a model of seed transmission and pathological convergence', *Molecular Plant Pathology*, 22(12), p. 1464. doi:10.1111/MPP.13067.
- Crouzet, J. *et al.* (2020) 'Biosurfactants in Plant Protection Against Diseases: Rhamnolipids and Lipopeptides Case Study', *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, p. 1014. doi:<https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.01014>.
- Fabro, G., Rizzi, Y.S. and Alvarez, M.E. (2016) 'Arabidopsis proline dehydrogenase contributes to Flagellin-Mediated PAMP-Triggered immunity by Affecting RBOHD', *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 29(8), pp. 620–628. doi:<https://doi.org/10.1094/MPMI-01-16-0003-R>.
- Foucher, J. *et al.* (2020) 'Common bean resistance to Xanthomonas is associated with upregulation of the salicylic acid pathway and downregulation of photosynthesis', *BMC Genomics* 2020 21:1, 21(1), pp. 1–19. doi:10.1186/S12864-020-06972-6.
- Martínez-Aguilar, K. *et al.* (2016) 'Use of BABA and INA As Activators of a Primed State in the Common Bean (Phaseolus vulgaris L.)', *Frontiers in plant science*, 7(MAY2016). doi:10.3389/FPLS.2016.00653.
- Mottola, M. *et al.* (2023) 'Nanoemulsions of synthetic rhamnolipids act as plant resistance inducers without damaging plant tissues or affecting soil microbiota', *Frontiers in Plant Science*, 14. doi:10.3389/fpls.2023.1195718.
- Ramírez-Carrasco, G., Martínez-Aguilar, K. and Alvarez-Venegas, R. (2017) 'Transgenerational Defense Priming for Crop Protection against Plant Pathogens: A Hypothesis', *Frontiers in Plant Science*, 8. doi:10.3389/FPLS.2017.00696.
- Randhawa, K.K.S. and Rahman, P.K.S.M. (2014) 'Rhamnolipid biosurfactants-past, present, and future scenario of global market', *Frontiers in Microbiology*, 5(SEP), p. 454. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00454>.
- Reginatto, J. (2018) *Análisis económico-financiero del poroto como alternativa en la rotación de cultivos para la zona norte de la provincia de Córdoba*. Available at: moz-extension://9a90f197-d534-493b-8fcd-a5e9ac2c7481/enhanced-reader.html?openApp&pdf=http%3A%2F%2Fpa.bibdigital.uccor.edu.ar%2F1569%2F1%2FTM_Reginatto.pdf.
- Sanchez, L. *et al.* (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(3), pp. 1630–1641. doi:10.1104/PP.112.201913.
- Vatsa, P. *et al.* (2010) 'Rhamnolipid Biosurfactants as New Players in Animal and Plant Defense against Microbes', *International Journal of Molecular Sciences* 2010, Vol. 11, Pages 5095-5108, 11(12), pp. 5095–5108. doi:10.3390/IJMS11125095.
- Verma, R.K. *et al.* (2018) 'Role of PGPR in sustainable agriculture: Molecular approach toward disease suppression and growth promotion', *Role of Rhizospheric Microbes in Soil: Volume 2: Nutrient Management and Crop Improvement*, pp. 259–290. doi:10.1007/978-981-13-0044-8_9.

Zhang, S. *et al.* (2017) 'Assessment of copper resistance in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, the pathogen of halo blight on snap bean', *Crop Protection*, 98, pp. 8–15.
doi:10.1016/J.CROPRO.2017.03.009.

ANEXO II

CONVENIO DE COOPERACIÓN CIENTÍFICA ENTRE EL INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA Y LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Aportes INTA

Recursos humanos	\$ 5000000
Insumos	\$ 150000
Total:	\$ 5150000
Equipamiento	Campana de flujo laminar, autoclave, agitador orbital, incubadoras/estufas de placas, centrifugas, balanzas de precisión.
Infraestructura	Invernaderos con condiciones controladas. Mesadas de laboratorio equipadas para manipular inóculos bacterianos.

Los fondos provienen de los siguientes finamientos: Fondos propios de INTA para RRHH y Fondos de Fundación ArgenINTA

Aportes Contraparte FCQ

Recursos humanos	\$5000000
Insumos	\$738500
Total:	\$5738500
Equipamiento	Campanas de flujo laminar, campanas de extracción para trabajo con solventes, autoclaves, estufas de cultivo, incubadoras de plantas, agitadores orbitales, termocicladores de PCR y PCR en tiempo real, microscopio de fluorescencia, Sonicadores, agitadores magnéticos, Tamañómetro, Potencial Z.
Infraestructura	Laboratorio de microbiología, salas de equipamiento.

Los fondos provienen del siguiente finamiento

- Subsidio Mabel Yudi, otorgado a la Dra. Kourdova (FCQ-UNC).
- PICT-2019-02331 otorgado a la Dra. Fanani, del cual la Dra. Fabro forma parte del grupo colaborador (FCQ-UNC).

ANEXO III

CONVENIO DE COOPERACIÓN CIENTÍFICA ENTRE EL INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA Y LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

PERSONAL PARTICIPANTE

POR "EL INTA"

Nombre y Apellido	Legajo	Función (Coordinador o Participante)	Unidad	Dedicación (días/año)	E-mail
Dra. Natalia Meneguzzi		Coordinadora y participante	IPAVE	60	nmeneguzzi@gmail.com

POR "FCQ"

Nombre y Apellido	DNI	Función (Coordinador o Participante)	Dedicación (días/año)	E-mail
Dra. Georgina Fabro	25861356	Coordinadora y participante	60	georgina.fabro@unc.edu.ar
Dra. M. Laura Fanani	23195090	Coordinadora	10	lfanani@unc.edu.ar
Dra. Lucille T. Kourdova	19061427	Participante	60	lukourdova@unc.edu.ar
Estud. Biotec. Paula Catalina Maritano	41965257	Participante	30	paula.maritano@unc.edu.ar



Universidad Nacional de Córdoba
1983/2023 - 40 AÑOS DE DEMOCRACIA

Hoja Adicional de Firmas
Informe Gráfico

Número:

Referencia: Convenio de Cooperación Científica INTA-FCQ UNC - nanoemulsiones biopesticidas Fabro-Meneguzzi-

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 12 pagina/s.