



VISTO, la propuesta de protocolo de trabajo entre la FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES, UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO Y LA FUNDACIÓN MANÍ ARGENTINO, Expediente Nro. 89370-5; y

CONSIDERANDO:

Que dicho protocolo de trabajo se enmarca dentro del Convenio Marco celebrado entre la Universidad Nacional de Río Cuarto y la Fundación Maní Argentino aprobado por Resolución del Consejo Superior N° 46/11, Expediente N° 89370.

Que el protocolo de trabajo tiene como objetivos apoyar y financiar el Proyecto "Herramienta biotecnológica para el mejoramiento del cultivo de maní expuesto a déficit hídrico". Para ello, la FUNDACIÓN aportará los recursos económicos y la FACULTAD los recursos humanos, infraestructura y capacidad operativa.

Que se designa como representante de la FACULTAD a la señora Decana, Dra. Marisa ROVERA y al Ing. Agr. Ricardo DIAZ como representante de la FUNDACIÓN. El Proyecto será dirigido por la Dra. Stella CASTRO y coordinado por la Dra. Ana FURLAN.

Que se cuenta con el Dictamen favorable de la Dirección de Asuntos Jurídicos Nro. 8621 de esta Universidad, obrante en foja 29.

Que, asimismo, se cuenta con los vistos favorables de la Secretaría Económica y de la Secretaría de Extensión y Desarrollo de esta Universidad, obrantes a Fojas 32 y 35 del expediente de referencia.

Que el mismo cumple con los requisitos establecidos en las reglamentaciones vigentes.

Que se cuenta con el despacho favorable de la Comisión de Investigación, Posgrado y Transferencia.

Por ello y en uso de las atribuciones conferidas por el Artículo 32 del Estatuto de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

**EL CONSEJO DIRECTIVO
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES**

RESUELVE:

ARTICULO 1ro.- Aprobar el Protocolo de Trabajo entre la FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES, UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO Y LA FUNDACIÓN MANÍ ARGENTINO, según se detalla en el ANEXO de la presente Resolución.



UNRC

Universidad Nacional de Río Cuarto
Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales

2019 - Año de la Exportación

ARTICULO 2do.- Regístrese, comuníquese. Tomen conocimiento las Áreas de competencia. Cumplido, archívese.

DADA EN LA SALA DE SESIONES DEL CONSEJO DIRECTIVO DE ESTA FACULTAD, A LOS TRES DIAS DEL MES DE OCTUBRE DEL AÑO DOS MIL DIECINUEVE.

RESOLUCION N°

308


Dra. MARCELA MORESSI
Sub Secretaría Técnica
FCEFQyN


Dra. MARISA ROVERT
Decana Fac. Cs. Exactas Fco-Qcas y Nat.



A N E X O

**PROTOCOLO DE TRABAJO
ENTRE LA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y
NATURALES
UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
Y
LA FUNDACIÓN MANÍ ARGENTINO**

En el marco del convenio aprobado por Resolución de Consejo Superior N° 46/11, Exp. N° 89370 entre la Universidad Nacional de Río Cuarto y la Fundación Maní Argentino, se estipula el presente Protocolo de Trabajo entre la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la UNRC, en adelante "La FACULTAD", con domicilio en Ruta Nacional 36, Km 601 de la ciudad de Río Cuarto, representada en este acto por la Señora Decana, Dra. Marisa ROVERA, por una parte y por otra la Fundación Maní Argentino, en adelante "La FUNDACIÓN", con domicilio legal en la calle 20 de Septiembre N° 863, General Cabrera (X5809AFP); Provincia de Córdoba, representada en este acto por su Presidente, Ing. Agr. Ricardo Díaz, denominadas en conjunto "Las PARTES", el cual estará sujeto a los siguientes artículos:

PRIMERO: La FUNDACIÓN, en uso de los atributos y facultades que le confieren su Estatuto, resuelve apoyar y financiar el Proyecto "**Herramienta biotecnológica para el mejoramiento del cultivo de maní expuesto a déficit hídrico**" que se describe en el **Anexo I**. La FACULTAD, por su parte, manifiesta contar con recursos humanos capacitados y estructura operativa apropiada para desarrollar el proyecto citado, así como con la facultad legal para asumir el compromiso de su ejecución.....

SEGUNDO: Para la realización del proyecto referido en el artículo primero, La FUNDACIÓN aportará los recursos económicos que se detallan en el **Anexo II** del presente Protocolo de Trabajo, en tanto que La FACULTAD aportará los recursos humanos, infraestructura y su capacidad operativa de conformidad con el Proyecto presentado por el área de Biología General del Departamento de Ciencias Naturales de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la UNRC.....

.....
TERCERO: El personal y los investigadores de La FACULTAD que participarán en el desarrollo del Proyecto descrito en el **Anexo I**, atenderán los requerimientos de La FUNDACION dentro de los términos fijados en el presente Protocolo de Trabajo.....

CUARTO: La FUNDACION podrá revisar la siembra, el mantenimiento, las mediciones, experimentaciones y toda otra tarea que se realice en los módulos,

[Handwritten signatures and marks at the bottom of the page]



lotes y laboratorios afectados a este Proyecto de Investigación, debiendo los investigadores de La FACULTAD colaborar en el procesamiento de datos y/o presentación de los informes que La FUNDACION considere necesarios, de conformidad con el Proyecto descrito en el Anexo I. La FACULTAD y sus investigadores arbitrarán los medios a su alcance para un eficaz y puntual cumplimiento del Protocolo de Trabajo, debiendo comunicar toda novedad o imprevisto que surgiere con la mayor celeridad y prontitud de manera fehaciente a fin de que La FUNDACION pueda adoptar los recaudos o medidas correctivas necesarias.....

QUINTO: Para la realización del Proyecto referido en el artículo primero se aprueba el Presupuesto que se detalla en el **Anexo II** del presente Protocolo de Trabajo. Los fondos allí consignados por un total de \$100.000 (Pesos cien mil) serán aportados por La FUNDACIÓN. El 40 % (cuarenta por ciento) se abonará al momento de la firma, el 30 % (treinta por ciento) contra entrega de informe parcial a los 6 (seis) meses y el 30 % (treinta por ciento) restante contra entrega y aprobación del informe final. Cada una de estas entregas se hará efectiva contra la presentación por parte de La FACULTAD de los recibos y comprobantes de rigor que correspondieren y conforme a lo establecido en el Cronograma de Actividades que se detalla en el **Anexo III**. La no presentación de comprobantes y/o Informes será considerado un incumplimiento de cláusula por parte de La FACULTAD y dará derecho a La FUNDACIÓN a retener los fondos respectivos hasta el efectivo cumplimiento de las obligaciones en mora o a disponer la suspensión transitoria o definitiva del presente Protocolo.....

SEXTO: La FUNDACIÓN se obliga a pagar los fondos detallados en el Anexo II del presente Protocolo a La FACULTAD, con domicilio en Ruta 36, km 601, CP 5800, Ciudad de Río Cuarto, mediante cheques bancarios y/o transferencias. Los fondos ingresarán a la Tesorería de la UNRC a la cuenta bancaria que La FACULTAD informe oportunamente a La FUNDACIÓN.....

SÉPTIMO: Los resultados parciales o definitivos que se obtengan en virtud del presente Protocolo de Trabajo podrán ser publicados de común acuerdo, dejándose constancia en las publicaciones de la participación de cada una de las partes. En cualquier caso, toda publicación o documento relacionado con este instrumento y producido en forma unilateral, hará siempre referencia al presente Protocolo firmado. Especialmente se tendrá en cuenta no afectar en forma alguna los intereses de terceros no involucrados en la investigación que puedan resultar en reclamos de ningún tipo. Las partes deberán manifestar claramente la colaboración prestada por la otra sin que ello signifique responsabilidad alguna para ésta respecto al contenido de la publicación o documento. Los derechos de propiedad intelectual, obtenidos como consecuencia de los trabajos realizados, se definirá conforme con los aportes intelectuales de cada una de ellas y en consonancia con el Convenio Marco que ambas instituciones tienen suscripto.....

[Handwritten signatures and scribbles]



OCTAVO: El presente Protocolo de Trabajo tendrá vigencia a partir de su firma y regirá hasta la presentación del informe definitivo, de acuerdo con lo establecido en su artículo quinto.....

NOVENO: El presente Protocolo de Trabajo podrá ser rescindido de común acuerdo o bien por decisión de una de las partes toda vez que ésta hubiere verificado el incumplimiento de alguna de sus cláusulas por causa atribuible a negligencia o impericia de la otra parte, debiendo mediar comunicación fehaciente de dicha decisión.....

DÉCIMO: Los Investigadores de La FACULTAD declaran conocer y aceptar el alcance y contenido de este Protocolo de Trabajo, así como sus obligaciones y responsabilidades en la ejecución del Proyecto descrito en el **Anexo I.**
.....

DÉCIMO PRIMERO: En pleno uso de sus derechos y facultades, y en conocimiento de las respectivas obligaciones aquí consignadas, Las PARTES intervinientes acuerdan someterse en caso de litigio a los Tribunales Federales de la Ciudad de Río Cuarto, renunciando expresamente a cualquier otro fuero o jurisdicción.....

DÉCIMO SEGUNDO: A los fines del presente Protocolo de Trabajo las partes fijan domicilio legal los indicados en el encabezamiento del presente.....

En este acto, se firman 3 (tres) ejemplares de igual tenor y contenido, recibiendo cada parte el suyo, en la ciudad de Río Cuarto, Provincia de Córdoba, República Argentina, a los días del mes de de 2019.-

Ing. Agr. Ricardo DÍAZ
Presidente
Fundación Maní Argentino

Dra. Marisa ROVERA
Decana
FCEFQyN - UNRC

Dra. MARCELA MORESSI
Sub Secretaría Técnica
FCEFQyN



ANEXO I

Fundación Maní Argentino

Proyecto de investigación relacionado con el sector manisero

HERRAMIENTA BIOTECNOLÓGICA PARA EL MEJORAMIENTO DEL CULTIVO DE MANÍ EXPUESTO A DÉFICIT HÍDRICO

Unidad Ejecutora

Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales (FCEFQyN)- Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC)

Investigador a cargo de la dirección

-Dra. Stella Castro, Profesora Extraordinaria Visitante. Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales (FCEFQyN)- Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC). DNI 11.473.669

Coordinación general del proyecto

-Dra. Ana Furlan, Investigadora Asistente de CONICET. Ayudante de primera dedicación simple. FCEFQyN- UNRC. DNI 32.000.657

Personal colaborador en el proyecto

- Dra. Eliana Bianucci, Investigadora Asistente de CONICET. Ayudante de primera dedicación simple. FCEFQyN- UNRC. DNI 29.581.668
- Dra. Carla Bruno, Ayudante de primera dedicación exclusiva. Facultad de Agronomía y Veterinaria (FAyV)- UNRC. DNI 27.322.095
- Microbiólogo Diego Perrig, INDRASA BIOTECNOLOGÍA S.A. Río Cuarto, Córdoba, Argentina. DNI 28.173.630
- Lic. Biotecnología. Juan Manuel Peralta. Becario doctoral CONICET. DNI 35.928.713
- Estudiante Francisco Villa. Becario de investigación SECyT-UNRC. DNI 39.422.374
- Estudiante Agustina Chiesa. Colaborador de Investigación SECyT- UNRC. DNI 35.669.968
- Estudiante Noelia Fassano. Colaborador de Investigación SECyT- UNRC. DNI 37.177.498

Línea estratégica Tecnología de cultivo

9) **Nutrición del cultivo:** Inoculación Fertilizantes, tipos, nutrientes, etc.

1. Antecedentes sobre el tema – Marco teórico

i. Estado actual del conocimiento sobre el tema

Importancia del cultivo de maní en la provincia de Córdoba e impacto del déficit hídrico en la producción

El cultivo de maní (*Arachis hypogaea* L.) ocupa el tercer lugar en el suministro mundial de semillas oleaginosas (USDA Foreign Agricultural Service, 2017), y nuestro país se encuentra entre los principales productores y exportadores mundiales junto a China, India, Nigeria y Estados Unidos (Ministerio de Agroindustria Argentina, 2017). A su vez, este es uno de los cultivos de mayor impacto regional localizándose principalmente en la región centro-sur de la provincia de Córdoba, donde se concentra casi el 90% de la producción primaria nacional (Barberis y col., 2015; Bolsa de cereales de la provincia de Córdoba, 2017a,b; Ministerio de Agroindustria Argentina 2017). Además, en esta región se lleva a cabo la totalidad del proceso industrial de los derivados del maní, con alto impacto económico y social en la provincia, así Argentina es el primer exportador mundial de productos derivados del maní (Ministerio de Agroindustria Argentina 2018).

En el contexto mundial de demanda de alimentos en cantidad y de mayor calidad, se prevé que para el año 2050 se necesita incrementar la producción en un 50% siendo Argentina uno de los 10 países con la capacidad de proveerlos. Pero esto, debe hacerse en un marco que contemple actividades agropecuarias, agroindustriales y agroalimentarias sustentables. Así, el desarrollo de Bioinsumos, Agricultura y Ganadería de Precisión, Buenas Prácticas agrícolas, pecuarias, agroalimentarias, Conservación de Suelos, Eficiencia en el uso del agua, Fertilización por ambientes, surgen como alternativas favorables para atender a este problema. Todo ello haciendo una conservación de los Recursos Genéticos, de la Biodiversidad, e implementando Bienes y Servicios Ecosistémicos (Bragachini y col., 2016).

El déficit hídrico es una de las condiciones naturales que más afectan la productividad agrícola en la región centro-sur de la provincia de Córdoba (Fernandez y Giayetto 2017). Aun cuando el maní es considerado como un cultivo resistente y adaptable a situaciones de sequía, para su establecimiento y producción la precipitación es el factor limitante en primera instancia. La literatura cita un rango óptimo entre 400 y 800 mm/ciclo de cultivo y se requiere, además, una buena distribución de las mismas con un período seco al final del ciclo, para favorecer la maduración y la recolección de las vainas. Cada etapa fenológica del maní requiere un adecuado suministro de agua, dentro de las cuales se destaca la floración, durante la cual los déficits de agua, provocan la caída de las flores o bien pueden obstaculizar la polinización (Doorenbos y col., 1979). Estudios realizados en Senegal, Israel y el Congo revelan que para el período de floración (entre el día 50 y el 90), los requerimientos de agua diaria son mayores que para las fases anteriores. Además, la etapa de formación de la vaina es muy exigente (Guillier 1970). Déficits de agua durante este período reducen el peso de las vainas y el contenido de aceite (Guillier y Silvestre 1970) y, la maduración del grano se caracteriza por reducir sus exigencias hídricas. De hecho, es recomendable que el final del ciclo (15 días antes de la cosecha) coincida con un período seco o de disminución de lluvias, que pueda permitir una buena madurez logrando que la humedad del grano se reduzca a un 12 o 10% (Agroclimatología del Maní).

En la provincia de Córdoba, los episodios de sequía ocurren en los meses de enero y febrero, en coincidencia con el desarrollo reproductivo del maní y se caracterizan por ser de duración variable (10 a 20 días) y, por una disminución progresiva del contenido de agua útil del suelo en el perfil enraizado, pudiendo llegar hasta su consumo total. Aproximadamente, a la mitad de un período de sequía de 15 o 20 días de duración, las hojas y tallos pierden la condición de turgencia durante el día, aunque por la noche esos

síntomas desaparecen. Sin embargo, hacia el final de cada período de déficit hídrico, cuando la intensidad se hace máxima, las plantas no se recuperan durante la noche (Cerioni, 2003; Angelini y col., 2017). En respuesta a éste, algunas de las modificaciones morfofisiológicas y bioquímicas que se producen en la planta son: disminución del contenido relativo de agua, la tasa fotosintética y el crecimiento; acumulación de osmolitos compatibles como prolina y disminución de la FBN (Furlan y col., 2012, 2017a) con impactos en el rendimiento del cultivo (Cerioni, 2003). Así, en la última campaña el sector productivo sufrió las consecuencias de la mayor sequía en 50 años que, sumada al exceso de humedad del otoño, provocó un desplome en el rendimiento de la cosecha de alrededor de un 40 % en caja y 48 % en grano (Agrovoz, 2018).

Fijación biológica del nitrógeno y tecnología de la inoculación en maní

El maní es una planta leguminosa que tiene capacidad para fijar el nitrógeno (N) del aire a través de bacterias que forman nódulos en sus raíces. La ausencia de bacterias específicas, la sequía, el anegamiento o el encostramiento que limite la aireación del suelo, perjudican la efectividad en la fijación del N. Las bacterias capaces de infectar y nodular las raíces de la planta de maní han sido clasificadas como *Bradyrhizobium* sp., no habiéndose aún definido las especies. De acuerdo a los datos oficiales de MAGyP (2011), la zona de producción de maní se extendió a San Luis y La Pampa, con algunas siembras marginales en Salta, Jujuy y Santa Fe (Bongiovanni y col., 2012). Es por esto, que en los lotes donde nunca se ha sembrado maní previamente o donde hace muchos años que no se cultiva, es recomendable aplicar inoculantes que favorezcan la nodulación y la consecuente fijación de N (Bongiovanni, 2012). Teniendo en cuenta este aspecto es que la industria de los inoculantes invierte en el desarrollo de productos de segunda generación, como por ejemplo inoculantes en base a cultivos rizobianos crecidos en medio de cultivo suplementados con algún inductor (Deaker y col., 2004; Nápoles y col., 2011). Otro de los aspectos en los que se trabaja en el sector privado es en el desarrollo de potenciadores de germinación, los cuales, por adición de sustancias con efecto beneficioso, extienden la persistencia de los rizobios aplicados sobre las semillas y/o benefician la nutrición nitrogenada y el crecimiento de las plantas tratadas. No obstante, es de destacar que para el cultivo de maní la oferta de este tipo de productos es escasa (Bionet y BP Agroservicios). Es por ello que en este plan de trabajo se propone analizar el efecto protector de metabolitos aplicados en semilla en interacción con inoculantes de maní, para determinar si son capaces de disminuir la adversidad de los efectos del déficit hídrico en las plantas de maní.

Efectos del déficit hídrico y la rehidratación sobre la fisiología y bioquímica de las plantas y rol de la prolina en la estrategia de defensa al déficit hídrico

El déficit hídrico es considerado uno de los factores abióticos más importantes y limitantes del crecimiento y desarrollo vegetal. En estas condiciones disminuye la fotosíntesis y el crecimiento de las plantas, se acumulan osmolitos compatibles (prolina, glicina-betaína y azúcares) y ácido abscísico (ABA), incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), se activa el sistema antioxidante y disminuye la FBN en leguminosas. Particularmente, las EROs son productos del metabolismo aeróbico normal de las células y se encuentran en equilibrio con el sistema antioxidante. Sin embargo, cuando este equilibrio se rompe por una disminución de la capacidad antioxidante celular o por un exceso en la producción de EROs, se genera el estrés oxidativo. De esta forma se induce daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos y en este estado de estrés las plantas disminuyen su crecimiento por alteración en el metabolismo celular, el

cual tratándose de cultivos de interés agronómico se traduce finalmente a pérdidas de rendimiento. En este plan de trabajo es de destacar que se considera tanto el mantenimiento del estado hídrico de la planta y de sus funciones metabólicas en condiciones de estrés, como la recuperación de las mismas cuando éste finaliza. En este sentido, Oono y col. (2003) proponen dos pasos fundamentales en el proceso de recuperación posterior al déficit hídrico: a) liberación del estrés por parte de las células y, b) crecimiento y restitución de la actividad fotosintética. A partir de estas consideraciones, el proceso de rehidratación cobra suma importancia, aunque son escasos los estudios que analicen este aspecto.

Ante la creciente sucesión de eventos ambientales que ocasionan pérdidas en el rendimiento de los cultivos, la comunidad científica y el sector productivo evalúan estrategias para contrarrestar los efectos adversos sobre los mismos. Una de estas estrategias es la aplicación de la técnica de priming. El priming puede definirse como una activación de un metabolismo "pre-germinativo" que dará como resultado una mejora en la calidad de la semilla al aumentar el porcentaje y la tasa de germinación, y por lo tanto también el crecimiento de las plántulas (Chen y col., 2010). Dicha técnica también mejora las respuestas fisiológicas de las semillas bajo estrés ambiental y aumenta la resistencia al estrés de las plantas en estadios avanzados (Demirkaya y col., 2006).

La prolina es un aminoácido que se acumula en respuesta a múltiples condiciones de estrés abiótico. En las plantas, se sintetiza en los cloroplastos y el citosol principalmente a partir de glutamato por acción secuencial de las enzimas pirrolina-5-carboxilato sintetasa (P5CS) y P5C reductasa (P5CR). El catabolismo de prolina se produce en las mitocondrias a través de la acción secuencial de la prolina deshidrogenasa (PDH) y P5C deshidrogenasa (P5CDH). Como vía alternativa, la prolina se puede sintetizar a partir de la ornitina (Szabados y Savouré, 2009). Diversos antecedentes muestran una regulación del metabolismo de la prolina por el estrés abiótico, especialmente a nivel de la transcripción, y se ha establecido que la acumulación de prolina inducida por el estrés es una respuesta adaptativa. A su vez, es de destacar que la rápida disminución de los niveles de prolina después de finalizado el estrés puede ser un factor en la reanudación del crecimiento, el cual también es un determinante importante de la tolerancia al estrés (Hayano-Kanashiro y col., 2009; Verslues y Sharma, 2010). Durante mucho tiempo, se consideró a la prolina como un osmolito compatible responsable solamente de la protección de las estructuras subcelulares y macromoléculas bajo estrés osmótico (Kavi Kishor y col., 2005). Actualmente, se conoce que puede influir en la tolerancia al estrés en múltiples formas. Así, se ha demostrado que la prolina funciona como una chaperona molecular capaz de proteger la integridad de las proteínas y mejorar las actividades de diferentes enzimas, incluidas las enzimas antioxidantes. También se le atribuye una función antioxidante directa en la detoxificación de EROs, específicamente del radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) (Signorelli y col., 2014). Por otro lado, una mayor tasa de biosíntesis de prolina en los cloroplastos durante el estrés mantiene baja la relación NADPH/NADP⁺ contribuyendo a sostener el flujo de electrones entre los centros fotosintéticos de excitación, estabilizar el equilibrio redox y reducir la foto-inhibición y daño del aparato fotosintético. En la recuperación del estrés, por ejemplo, en la condición de rehidratación, también posee un rol importante ya que, en las mitocondrias, es fuente de potencial reductor a través de su oxidación por actividad de PDH y P5CDH proporcionando electrones a la cadena respiratoria para el suministro de energía asociado a la reanudación del crecimiento (Szabados y Savouré, 2009).

Un aspecto muy importante es que la acumulación del aminoácido se correlaciona positivamente con el nivel de tolerancia diferencial de cultivares de *Atriplex halimus* L., algodón y papa (Ben Hassine y col., 2008; Parida y col., 2008; Evers y col., 2010). Por

esto, la aplicación de prolina exógena para mejorar la tolerancia de las plantas al estrés se ha utilizado exitosamente en varias especies (Ashraf y Foolad, 2007, Hayat y col., 2012, Ardabili y col., 2013). Sin embargo, hay que tener en cuenta que la información disponible de diferentes estudios sugiere que las concentraciones óptimas de prolina pueden ser especie o genotipo- dependientes, ya que concentraciones elevadas pueden tener efectos tóxicos en las plantas (Ashraf y Foolad, 2007). Otra de las estrategias usadas para aumentar la tolerancia al déficit hídrico es la alteración de las vías metabólicas que llevan a la síntesis de prolina, o de sus precursores, la cual ha confirmado el papel esencial de esta molécula en la respuesta de las plantas al estrés (Verslues y Sharma, 2010). En base a los antecedentes, el uso de cultivares de maní con niveles de tolerancia diferencial al déficit hídrico, la correlación con los niveles endógenos de prolina y la aplicación de prolina exógena permitirán poner de manifiesto el rol del aminoácido en la estrategia de defensa de las plantas en un cultivo de importancia regional.

ii. Estado de desarrollo alcanzado por el grupo en el tema.

Nuestro grupo de investigación se encuentra abocado al estudio de los microorganismos de suelo y su interacción con leguminosas frente a diferentes condiciones de estreses ambientales (acidez, salinidad, sequía y metales pesados/metaloides). En particular, en todos estos estreses abióticos se ha estudiado la participación del sistema antioxidante como estrategia de defensa de las plantas y microorganismos a la condición adversa. En una de las líneas de investigación se estudió el estrés producido por la acidez considerando que los valores de pH del suelo de la región manisera presentan una tendencia a la acidificación. Los estudios realizados mostraron que la inoculación de raíces de maní con la cepa *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 (inoculante recomendado para maní) mejoró el crecimiento de las plantas en suelos de acidez moderada (pH 5,5). En base a estos resultados se resaltó la contribución de la FBN para el mantenimiento del metabolismo nitrogenado de la planta bajo las condiciones de estrés ambiental producido por la acidez del suelo (Terzo y col., 2005). El efecto del estrés por acidez sobre la asimilación de amonio en *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 mostró un incremento de las enzimas GS/GOGAT favoreciendo la síntesis del aminoácido glutamato como una estrategia de adaptación del microsimbionte al pH ácido (Natera y col., 2006). Bajo estas condiciones de pH bajo, se demostró que el glutatión (GSH) juega un rol importante en la respuesta al estrés en *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 (simbionte de maní) (Ponsone y col., 2004). Con el propósito de determinar el rol de GSH en esta cepa se obtuvo una mutante defectiva en la síntesis de GSH (*Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144-S7Z) por disrupción del gen *gshA* que codifica para la enzima γ -glutamilcisteína sintetasa (γ -EC). Esta mutante fue incapaz de crecer bajo diferentes condiciones de estrés (acidez, salino y oxidativo) así como en presencia del compuesto electrofílico metilglioxal. Los ensayos de interacción simbiótica maní-rizobio, demostraron que esta mutante presentó un comportamiento simbiótico similar a la cepa salvaje (Sobrevals y col., 2006; Bianucci y col., 2008a). Con el objeto de investigar el rol del GSH de la planta en la asociación simbiótica se usó el compuesto L-Butionina sulfoximina (BSO), un inhibidor específico de la enzima γ -EC en plantas. Los resultados obtenidos mostraron una reducción en el número y en el peso de nódulos en las raíces de maní inoculadas con las cepas salvaje y mutante de *Bradyrhizobium* indicando que el GSH de la planta es esencial en el proceso de nodulación (Bianucci y col., 2008b). El análisis del efecto del metal pesado cadmio sobre la planta reveló que la inoculación del maní con cepas tolerantes resulta en un mejor establecimiento simbiótico (Bianucci y col., 2013).

En los últimos años, la investigación se enfocó a conocer los efectos del déficit hídrico

sobre la asociación simbiótica maní-rizobios. Así, se demostró la participación del sistema de defensa antioxidante como una estrategia de defensa en la asociación simbiótica de maní-*Bradyrhizobium* sp. Los resultados revelaron que la acumulación de ácido abscísico (ABA) inducida por déficit hídrico aumentó la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) (Furlan y col. 2013). Aunque mecanismos independientes de ABA también contribuyeron al aumento de la producción de EROs y la fotosíntesis se vio afectada negativamente. Además, las plantas mostraron daño oxidativo en la parte aérea y un aumento de la relación raíz/parte aérea (Furlan y col. 2012). En la condición de estrés, se indujo la actividad del sistema antioxidante, pero no fue suficiente para evitar el daño oxidativo; sin embargo, podría explicar la rápida disminución de EROs, la ausencia de daño oxidativo y la restauración en la fotosíntesis durante la rehidratación (Furlan y col. 2016). En los nódulos, el déficit hídrico indujo la acumulación de EROs y el estrés oxidativo. Además, la FBN se redujo, lo que resultó en una disminución en el contenido de nitrógeno por planta. También, en este órgano, se indujo la expresión y la actividad del sistema de defensa antioxidante durante el período de estrés y se restauró el metabolismo normal en un corto período de rehidratación. Adicionalmente, la actividad de la nitrogenasa, esencial para el proceso de FBN, se recuperó parcialmente a las 72 h post-rehidratación, demostrando que los nódulos eran todavía efectivos (Furlan y col. 2014). Nuestros resultados demostraron que en nódulos de maní las EROs se acumularon y la FBN disminuyó, en coincidencia con uno de los mecanismos de inhibición de la actividad de la enzima nitrogenasa descriptos. Sin embargo, la respuesta del metabolismo de C y N (mecanismos propuestos como responsables de cambios en la actividad de la enzima nitrogenasa) en el déficit hídrico y posterior rehidratación no había sido analizada. Los resultados revelaron que en los nódulos del cultivar Granoleico el metabolismo de las amidas se vio gravemente afectado, de acuerdo al bajo contenido de asparagina y glutamina en la condición de estrés. El menor contenido de estos compuestos nitrogenados se asoció con la disminución de FBN, la baja actividad de la nitrogenasa y el bajo contenido de leghemoglobina en el cultivar Granoleico (Furlan y col., 2014). Este cultivar no fue capaz de restablecer un metabolismo similar a las plantas regadas a capacidad de campo en respuesta a la rehidratación. Así, algunos metabolitos alcanzaron niveles más altos que los de las plantas control mientras que los niveles de transcriptos y actividades específicas de las enzimas sacarosa sintasa y glutamina sintetasa se mantuvieron por debajo de los valores de las plantas control. Por otro lado, los nódulos del cultivar tolerante EC-98 acumularon trehalosa, prolina y GABA, que son metabolitos con funciones conocidas en la protección contra el déficit hídrico. Esta notable respuesta, combinada con la restauración completa tras la rehidratación, junto con cambios sutiles en los niveles de los metabolitos frente al déficit hídrico en los nódulos, se propusieron como rasgos que contribuyen a la eficiente FBN en condiciones de déficit hídrico en el cultivar de maní tolerante EC-98 (Furlan y col., 2017a). Los últimos resultados del grupo de investigación mostraron que el cultivar tolerante, EC-98, no mostró alteraciones en el crecimiento y la nodulación aun cuando tuvo un menor contenido relativo de agua, menor fotosíntesis y mostró evidencias de estrés oxidativo. Dadas estas diferencias se propone que el cultivar EC-98 posee una respuesta metabólica distintiva que subyace a la menor sensibilidad al déficit hídrico mostrada. Uno de los metabolitos que podría participar en esta respuesta es el aminoácido prolina que tuvo un nivel endógeno mayor en este cultivar y que posee función antioxidante en las plantas de maní (Furlan y col., 2017b).

Handwritten signature

Handwritten signature

iii. Bibliografía.

- Agrovoz, 2018. <http://agrovoz.lavoz.com.ar/agricultura/el-clima-derrumbo-48-la-produccion-de-mani-en-cordoba-la-mas-baja-en-una-decada>.
- Angelini J, Taurian T, Ibáñez F, Tonelli ML, Bianucci E, Anzuay MS; Valetti L, Furlán AL, Muñoz V, Luduena L, Carlier E, Castro S, Fabra A. 2017. En: "El cultivo del maní en Córdoba" Fernandez, E.M y Giayetto, O (Eds.). Uni Rio.144 pp.
- Ardabili AA, Sadeghipour O, Asl AR. 2013. The Effect of Proline Application on Drought Tolerance of Cowpea (*Vigna unguiculata* L.). *Adv Environ Biol* 7(14): 4689-4696
- Ashraf M, Foolad MR. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ Exp Bot* 59: 206-216
- Barberis, M.A., Bongiovanni, R., Giletta, M., 2015. INTA. Estación Experimental Agropecuaria Manfredi. ISSN On line 1851-7994.
- Bates LS, Waldren RP, Teare ID. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39: 205-207
- Ben Hassine A, Ghanem ME, Bouzid S, Lutts S. 2008. An inland and a coastal population of the Mediterranean xero-halophyte species *Atriplex halimus* L. differ in their ability to accumulate proline and glycinebetaine in response to salinity and water stress. *J Exp Bot* 59, 1315-1326
- Bianucci E, Fabra A, Castro S. 2008a. Growth of *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 in response to methylglyoxal: role of glutathione. *Curr Microbiol* 56:371-375
- Bianucci E, Tordable MC, Fabra A, Castro S. 2008b. Importance of glutathione in the nodulation process of peanut (*Arachis hypogaea*). *Physiol Plant* 134: 342-347
- Bianucci E, Furlan A, Rivadeneira J, Sobrino-Plata J, Carpena-Ruiz RO, Tordable MC, Fabra A, Hernández LE, Castro S. 2013. Influence of cadmium on the symbiotic interaction established between peanut (*Arachis hypogaea* L.) and sensitive or tolerant bradyrhizobial strains. *J Environ Manag.* 130: 126-134
- Bolsa de cereales de Córdoba, 2017a. Informe agronómico N° 106, Julio 2017. <http://www.bccba.com.ar>
- Bolsa de cereales de Córdoba, 2017b. Informe agronómico N° 104, Junio 2017. <http://www.bccba.com.ar>
- Bongiovanni R (Ed.). 2012. Buenas prácticas agrícolas para la producción de maní. Manfredi, Córdoba (AR): Ediciones INTA. Estación Experimental Agropecuaria Manfredi. 73 p
- Bongiovanni R, Morandi J, Troilo L. (Eds.). 2012. Competitividad y calidad de los cultivos industriales: caña de azúcar, mandioca, maní, tabaco, té y yerba mate. 1era Ed. Manfredi, Córdoba (AR): Ediciones INTA. Estación Experimental Agropecuaria Manfredi. 212 p
- Boote K. 1992. Growth stages of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Peanut Sci* 9: 35- 40
- Bragachini M, Sanchez F, Urrets Zavalía G, Boretto D. 2016. Eficiencia en la cosecha de maní con valor agregado en origen. Actualización técnica N°93. INTA-Ministerio de Agroindustria.
- Cerioni, G.A. 2003. Tesis MSc. FAV - UNRC.Río Cuarto - Cba. 95 p.
- Chen, Y.P., Rekha, P.D., Arun, A.B., Shen, F.T., Lai, W.A., Young, C.C. 2006. *Appl. Soil Ecology.* 34: 33-41.
- Deaker R, Roughley RJ, Kennedy IR. 2004. Legume seed inoculation technology-a review. *Soil Biol Biochem* 36: 1275-1288
- Demirkaya KM, Gamze O, Atak M, Cikili Y, Kolsarici O. 2006. Seed treatment to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.) *European J Agron* 24:291-5
- Doorenbos J, Kassam AH. 1979. Efecto del agua sobre el rendimiento de los cultivos.

FAO/Riego y Drenaje.

Roma, Italia. 104-106 pp.

- Evers D, Lefevre I, Legay S, Lamoureux D, Hausman JF, Gutierrez Rosales RO, Tincopa Marca TR, Hoffmann L, Bonierbale M, Schaffleitner R. 2010. Identification of drought-responsive compounds in potato through a combined transcriptomic and targeted metabolite approach. *J Exp Bot* 61, 2327-2343
- Fernandez, E.M., Giayetto, O. 2017. Fernandez, E.M y Giayetto, O (Eds.). *Uni Rio*.144 pp.
- Furlan A, Llanes A, Luna V, Castro S. 2012. Physiological and biochemical responses to drought stress and subsequent rehydration in the symbiotic association peanut-*Bradyrhizobium* sp. *ISRN Agron DOI:10.5402/2012/318083*
- Furlan A, Llanes A, Luna V, Castro S. 2013. Abscisic acid mediation in hydrogen peroxide production in peanut under water stress. *Biol Plant* 57: 555-558
- Furlan A, Bianucci E, Tordable MC, Castro S, Dietz KJ. 2014. Antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in peanut nodules during a drought and rehydration cycle. *Funct Plant Biol* 41: 704– 713
- Furlan A, Bianucci E, Tordable MC, Kleinert A, Valentine A, Castro S. 2016. Dynamic responses of photosynthesis and antioxidant system during a drought and rehydration cycle in peanut plants. *Funct Plant Biol* 43(4) 337-345
- Furlan A, Bianucci E, Castro S, Dietz KJ. 2017a. Metabolic features involved in drought stress tolerance mechanisms in peanut nodules and their contribution to biological nitrogen fixation. *Plant Sci* 263: 12-22
- Furlan A, Bianucci E, Sequeira M, Giordano W, Castro S. 2017b. Strategy to improve peanut development by application of biostimulant and inoculant under drought stress. III Conferencia Iberoamericana de Interacciones Beneficiosas Planta – Microorganismo – Medio Ambiente (IBEMPA). XXVIII Reunión Latinoamericana de Rizobiología (RELAR). XVI Reunión de la Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN)
- Gillier P, Silvestre P. 1970. Técnicas agrícolas y producción vegetal. El cacahuete o maní. Traducción Esteban Riambau. Editorial Blume. Barcelona, España. 47-63 pp.
- Hayano-Kanashiro C, Calderon-Vazquez C, Ibarra-Laclette E, Herrera-Estrella L, Simpson J. 2009. Analysis of gene expression and physiological responses in three Mexican maize landraces under drought stress and recovery irrigation. *PLoS ONE* 4, e7531
- Hayat S, Hayat Q, Alyemeni MN, Wani AS, Pichtel, J, Ahmad A. 2012. Role of proline under changing environments: a review. *Plant Signal Behav* 7: 1456–1466
- Hoagland D, Arnon D. 1950. The water culture method for growing plants without soil. *Calif Agric Exp St* 347: 1-39
- Kavi Kishor PB, Sangam S, Amrutha RN, y col. 2005. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Curr Sci* 88: 424– 438
- Ministerio de Agroindustria, Presidencia de la Nación. 2017-2018. Mercado de maní. <http://www.agroindustria.gob.ar>
- Mortimer PE, Perez-Fernandez MA, Valentine AJ. 2008. Photosynthetic and respiratory C costs of N and P nutrition in the dual symbiosis of a mycorrhizal legume. *Soil Biol Biochem* 40: 1091-1027
- Mortimer PE, Perez-Fernandez MA, Valentine AJ. 2009. NH₄⁺ nutrition affects the photosynthetic and respiratory C sinks in the dual symbiosis of a mycorrhizal legume. *Soil Biol Biochem* 41: 2115–2121
- Nápoles MC, Gómez G, Costales D, Freixas JA, Guevara E, Meira S, González-Anta G, Ferreira A. 2011. Signals in Soybean's Inoculants, *Soybean-Biochemistry, Chemistry and*

- Physiology, Tzi-Bun NG (Ed.), ISBN: 978- 953-307-219-7, InTech.
<http://www.intechopen.com/books/soybean-biochemistry-chemistry-and-physiology/signals-in-soybean-sinoculants>
- Natera V, Sobrevals L, Fabra A, Castro S. 2006. Glutamate is involved in acid stress response in *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 (*Arachis hypogaea* L.) microsymbiont. *Curr Microbiol* 53:479-482
- Nelson D, Sommers L. 1973. Determination of total nitrogen in plant material. *Agron J* 65: 109-112
- Oono Y, Seki M, Nanjo T, y col. 2003. Monitoring expression profiles of Arabidopsis gene expression during rehydration process after dehydration using ca. 7000 full-length cDNA microarray. *Plant J* 34: 868-887
- Parida AK, Dagaonkar VS, Phalak MS, Aurangabadkar LP. 2008. Differential responses of the enzymes involved in proline bio- synthesis and degradation in drought tolerant and sensitive cotton genotypes during drought stress and recovery. *Acta Phys Plant* 30, 619-627
- Ponsone L, Fabra A, Castro S. 2004. Interactive effects of acidity and aluminium on the growth, lipopolysaccharide and glutathione contents in two nodulating peanut rhizobia. *Symbiosis* 36: 193-204.
- Scholander PF, Hammel HT, Hemmingsen EA, Bradstreet ED. 1964. Hydrostatic pressure and osmotic potential in leaves of mangroves and some other plants. *PNAS* 52: 119-125
- Shearer G, Kohl DH. 1986. N₂-fixation in field settings: estimations based on natural ¹⁵N abundance. *Aust J Plant Physiol* 13: 699-756
- Signorelli S, Coitiño E, Borsani O, Monza J. 2014. Molecular mechanisms for the reaction between •OH radicals and proline: insights on the role as reactive oxygen species scavenger in plant stress. *J Phys Chem B* 118: 37-47
- Sobrevals L, Müller P, Fabra A, Castro S (2006) Role of glutathione in growth of *Bradyrhizobium* sp. (peanut microsymbiont) under different environmental stresses and in symbiosis with the host plant. *Can J Microbiol* 52: 609-616
- Somasegaran P, Hoben H. 1994. Handbook for Rhizobia: methods in legume-Rhizobium technology. Springer- Verlag. New York. Inc. Sección III. pp. 382
- Szabados L, Savoure, A. 2009. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci* 15: 89-97
- Terzo E, Natera V, Isola MC, Fabra A, Franzoni L, Castro S. 2005. Effect of low pH on the enzyme activities of the ammonium assimilation pathways in the symbiotic association *Bradyrhizobium* sp. peanut (*Arachis hypogaea* L.) *Symbiosis* 40, 1-6
- USDA (United States department of Agriculture), Foreign Agricultural Service, 2017. <https://www.fas.usda.gov/>
- Verslues PE, Sharma S. 2010. Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction. *Arabidopsis Book* 8, e0140
- Vincent J. 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. En: *IBP Handbook* N° 15, Blackwell Scientific Publication, Oxford

2. Hipótesis y Objetivos

i. Hipótesis de trabajo.

Los antecedentes del grupo de investigación, que desde hace años se encuentra trabajando en la interacción planta-microorganismo expuesta a diferentes estreses abióticos

(acidez, salinidad, metales pesados, metaloides y sequía), han revelado que el sistema antioxidante cumple un rol importante en la respuesta de las plantas al estrés. En busca de nuevos metabolitos que puedan ser aplicados a la asociación simbiótica y que mejoren la tolerancia al estrés, la utilización de prolina resulta atractiva por ser un aminoácido que se acumula en condiciones de estrés abiótico y que posee múltiples efectos beneficiosos para las plantas, entre los cuales se destaca su rol de molécula antioxidante. En base a todo lo expuesto es que, en este proyecto se propone utilizar el aminoácido prolina en el tratamiento de semillas de maní, previo a su siembra, para contribuir al balance redox celular de las plantas expuestas a este estrés ambiental y por lo tanto al crecimiento y rendimiento de los cultivos. Así, nuestra hipótesis general de trabajo es:

La aplicación de prolina en la semilla de maní optimiza el desarrollo de la leguminosa expuesta a déficit hídrico, contribuyendo a mejorar el rendimiento de los cultivos.

ii. Objetivo general

En este plan de trabajo se analizará el efecto protector de metabolitos aplicados en semilla en interacción con inoculantes de maní, para determinar si son capaces de disminuir la adversidad de los efectos del déficit hídrico en la leguminosa. El metabolito que se propone estudiar en este plan de trabajo es prolina, un aminoácido que se acumula en respuesta a múltiples condiciones de estrés abiótico. Durante mucho tiempo, se lo consideró como un osmolito compatible inerte responsable de la protección de las estructuras subcelulares y macromoléculas bajo estrés osmótico (Kavi Kishor y col., 2005) pero actualmente, se conoce que puede influir en la tolerancia al estrés en múltiples formas (Szabados y Saviouré, 2009; Signorelli y col., 2014). Por ello, la aplicación de prolina exógena para mejorar la tolerancia de las plantas al estrés se ha utilizado exitosamente en varias especies vegetales (Hayat y col., 2012). Uno de los efectos beneficiosos que se le atribuye a la prolina es de molécula antioxidante y considerando nuestros antecedentes que indican que el sistema antioxidante cumple un rol importante en los mecanismos de defensa de las plantas de maní al estrés abiótico (Furlan y col., 2014, 2016), en este proyecto se propone estudiar la contribución del aminoácido prolina (implicado en el metabolismo antioxidante de las plantas de maní expuestas a sequía), al rendimiento de cultivares de maní con tolerancia diferencial al estrés hídrico. Sobre esta base se plantea como objetivo general:

Dilucidar el impacto de la adición de prolina sobre el crecimiento, la nodulación y el rendimiento de cultivares de maní con tolerancia diferencial al déficit hídrico.

iii. Objetivos específicos.

Las plantas de maní, en condiciones de estrés incrementan la producción de EROs y activan su sistema de defensa antioxidante (Furlan y col., 2014, 2016). Además, las plantas acumulan solutos compatibles de modo de realizar el ajuste osmótico de las células y evitar la pérdida o favorecer el ingreso de agua. Entre los osmolitos que se acumulan, el aminoácido prolina es uno de los más importantes y en los últimos años se ha destacado no sólo su papel en el mantenimiento del estado hídrico celular sino su participación como molécula antioxidante (Szabados y Saviouré, 2009). La asociación simbiótica entre las leguminosas y las bacterias fijadoras de nitrógeno constituye una alternativa ecoamigable frente al uso de fertilizantes nitrogenados contribuyendo al desarrollo de una agricultura sustentable. Es por esto que se han dedicado muchos esfuerzos a la fabricación de inoculantes en base a microorganismos crecidos en medios de germinación, es decir, productos que aplicados a las semillas benefician la nutrición nitrogenada y el crecimiento de las plántulas (Deaker y col., 2004; Nápoles y col., 2011). No obstante, es de destacar que para

el cultivo de maní la oferta de este tipo de productos es escasa (Bionet y BP Agroservicios). Particularmente, en este plan de trabajo se propone evaluar el efecto protector de prolina aplicado en semilla en interacción con inoculantes de maní en plantas expuestas a déficit hídrico y posterior rehidratación. La selección de este aminoácido se fundamenta en que la aplicación de prolina exógena se ha utilizado exitosamente en varias especies vegetales para mejorar la tolerancia de las plantas al estrés (Ashraf y Foolad, 2007; Hayat y col., 2012; Ardabili y col., 2013) y que, resultados previos de nuestro grupo de investigación sugieren fuertemente que existe una asociación entre la tolerancia de los cultivares y la acumulación del aminoácido, y que dicho aminoácido es un compuesto antioxidante en las plantas de maní. Así, se proponen los siguientes objetivos específicos:

1. **Estudiar el efecto de la aplicación de prolina en semillas de maní sobre el crecimiento de plantas en interacción con *Bradyrhizobium* sp. en condiciones de déficit hídrico y posterior rehidratación.**
2. **Evaluar el rendimiento de cultivos de maní provenientes de semillas tratadas con prolina e inoculantes en ensayos a campo.**

3. Plan de actividades

i. Metodología.

En todos los ensayos se utilizarán como inoculantes las cepas simbiotes fijadoras de nitrógeno recomendadas para el cultivo. La metodología de investigación a ser utilizada para comprobar la hipótesis comprende: el uso de plantas de maní con diferentes niveles de tolerancia al déficit hídrico para evaluar si la aplicación exógena de prolina promueve el desarrollo de la leguminosa frente a la condición adversa de crecimiento. En la planta, se determinará el efecto protector del agregado de prolina en la semilla en plantas expuestas a un ciclo de déficit hídrico-rehidratación evaluando variables de crecimiento y nodulación para luego determinar el impacto de la aplicación del aminoácido en ensayos a campo. El plan de trabajo propuesto se apoya en desarrollos anteriores de nuestro grupo, cuya metodología se encuentra puesta a punto y ha sido utilizada de manera exitosa en todos los trabajos mencionados previamente.

Cultivares de maní: se emplearán el cultivar comercial de referencia GRANOLEICO, de amplio uso en la zona manisera de Córdoba y el cultivar EC-98, tolerante al déficit hídrico, obtenidos por el Programa de Mejoramiento del Criadero "El Carmen" (General Cabrera, Córdoba).

Cepas de *Bradyrhizobium* sp.: se usarán los bradirizobios recomendados como inoculantes para maní SEMIA6144 (Microbiological Resource Center, MIRCEN, Porto Alegre, Brasil) y C-145 (INTA-Castelar).

Para la preparación de las cepas de *Bradyrhizobium* sp. como inoculantes se utilizará el medio de cultivo YEM (extracto de levadura-manitol) según la técnica de Vincent (1970) y se determinará el número de células viables utilizando la técnica de la microgota (Somasegaran y Hoben, 1994).

Ensayo de interacción maní-*Bradyrhizobium* sp.: las semillas de maní se desinfectarán según la técnica de Vincent (1970) y serán inoculadas con la cepa de *Bradyrhizobium* sp. (10^8 ufc/ml), luego serán transferidas a macetas conteniendo arena:perlita (2:1) estéril y se mantendrán en cámara de cultivo con condiciones controladas (intensidad de la luz: $200 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 16 hs día/8 hs noche, 28°C y humedad relativa del 50%). Las macetas serán regadas dos veces por semana alternando con agua estéril y con la solución nutritiva de Hoagland libre de nitrógeno (Hoagland y Arnon, 1950). El periodo de cultivo llegará hasta la etapa fenológica R1 (floración, aproximadamente 40 días), de acuerdo a la clave fenológica

del maní descrita por Boote (1992), y el tratamiento de déficit hídrico consistirá en la suspensión del riego cuando la simbiosis esté establecida, es decir, los nódulos visibles y formados. Al cabo de ese tiempo, las macetas se distribuirán al azar en tres grupos:

Control: se continuará con el riego normal.

Déficit hídrico: se suspenderá el riego hasta alcanzar síntomas de marchitez.

Rehidratación: se reiniciará el riego en plantas sometidas al tratamiento de déficit hídrico para su recuperación.

Para establecer el estado hídrico de las plantas se analizará el potencial agua, Ψ_a (Scholander y col., 1964) durante el crecimiento. Además, se determinará la conductancia estomática mediante un porómetro de hoja (Decagon Devices). Una vez establecida la condición hídrica de las plantas, las mismas serán cosechadas al final del período de estrés y de rehidratación con sus respectivos controles para realizar los objetivos específicos planteados.

Plan de trabajo para el alcance del objetivo específico 1: Estudiar el efecto de la aplicación de prolina en semillas de maní sobre el crecimiento de plantas en interacción con *Bradyrhizobium* sp. en condiciones de déficit hídrico y posterior rehidratación.

Para estudiar el efecto de la imbibición de las semillas con prolina y su rol en la tolerancia de las plantas de maní expuestas a un ciclo de déficit hídrico-rehidratación se procederá de la siguiente manera:

Para la preparación de las cepas de *Bradyrhizobium* sp. como inoculantes se utilizará el medio de cultivo YEM (extracto de levadura-manitol) según la técnica de Vincent (1970) y se probará la adición de diferentes concentraciones de prolina (Pro) al medio de cultivo (0-50 mM). Se determinará el número de células viables en cultivos en fase exponencial (96 hs) utilizando la técnica de la microgota (Somasegaran y Hoben, 1994). Las semillas serán embebidas con el inoculante conteniendo las diferentes dosis de prolina, se secarán por 10 minutos y se colocarán en placas de Petri con algodón y papel de filtro humedecido con agua destilada en esterilidad. Las semillas se incubarán a 28°C durante 72 hs en la oscuridad y se determinará el efecto de la prolina sobre la germinación, la longitud y el peso de las plántulas de maní. Se considerará que ha ocurrido la germinación cuando emerja la radícula. Con este ensayo se pretende determinar la concentración óptima para el crecimiento y la germinación de las semillas teniendo en cuenta que niveles elevados del aminoácido pueden tener un efecto tóxico.

Una vez seleccionada la concentración de prolina aplicada en el inoculante para semillas, se realizará el ensayo de crecimiento de las plantas de acuerdo a lo descrito en el apartado "Ensayo de interacción maní- *Bradyrhizobium* sp.". Las plantas serán cosechadas al final del período de déficit hídrico y de rehidratación con sus respectivos controles. Las muestras (nódulos, raíces y parte aérea) se conservarán a -80°C hasta su uso. En cada uno de los muestreos se realizarán las determinaciones para evaluar el crecimiento y nodulación de acuerdo a las siguientes técnicas:

- Contenido de clorofila:** se realizará mediante la utilización de un medidor de clorofila.
- Crecimiento y nodulación:** se determinará el peso seco de raíz, nódulos y parte aérea por secado de las muestras en estufa a 70°C hasta peso constante. Se contará el número de nódulos por planta.
- Fijación biológica del nitrógeno:** Se determinará el contenido de nitrógeno total en la parte aérea por el método de Kjeldahl modificado (Nelson y Sommers, 1973). El porcentaje de nitrógeno derivado de la atmósfera (%NDA) se calculará según Shearer y Kohl (1986) basado a la composición isotópica de nitrógeno $\delta^{15}\text{N}$ (Mortimer y col., 2008, 2009), dichas determinaciones se realizarán en la Universidad de Stellenbosch (Sudáfrica).

d) **Concentración de prolina:** Se realizará siguiendo el método de Bates y col. (1973) que consiste en la determinación colorimétrica del aminoácido después de la reacción con ninhidrina ácida en tolueno. La curva de calibración se realizará usando L-prolina 1mM (Sigma).

Plan de trabajo para el alcance del objetivo específico 2: Evaluar el rendimiento de cultivos de maní provenientes de semillas tratadas con prolina e inoculantes en ensayos a campo.

Los ensayos se realizarán en condiciones de secano en sitios con distintas condiciones edafoclimáticas, localizados al oeste de la provincia de Córdoba. En esta región los suelos tienen baja capacidad de almacenamiento de agua, por lo que son vulnerables a la ocurrencia de episodios de déficit hídrico. La siembra se realizará en forma manual a principios de noviembre con una densidad de 14 semillas m^{-1} en hileras separadas a 0,70 m entre sí y una profundidad de 3 a 4 cm. Se realizarán controles sanitarios con el fin de reducir el efecto adverso de malezas, plagas y enfermedades. El diseño experimental utilizado será de bloques completos aleatorios, siendo los factores: el cultivar (Granoleico y EC-98); el tratamiento con prolina (con y sin prolina) y las cepas recomendadas para maní (*Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 o *Bradyrhizobium* sp. C-145). Se realizarán determinaciones en la etapa fenológica R1 y en la cosecha (R8). Durante el ciclo del cultivo se llevará un registro diario de variables meteorológicas (temperatura, precipitaciones y evapotranspiración) a través de las Estaciones Agrometeorológicas instaladas más cerca de las áreas experimentales. Previo a la siembra se tomarán submuestras de suelo de los primeros 20 cm de profundidad utilizando transectas para analizar las propiedades físico-químicas del suelo midiendo los siguientes parámetros: pH (1:2,5 suelo/agua); Materia orgánica; Calcio intercambiable; Fósforo; N- NO_3^- y Bases-CIC. También se determinará el número de rizobios por gramo de suelo mediante la técnica del Número Más Probable.

Las plantas obtenidas en la etapa fenológica R1 (floración, aproximadamente 40 días después de la siembra (DDS)) se usarán para determinar variables de crecimiento y fijación de nitrógeno en los cultivares de maní:

- a) Contenido de clorofila: se realizará mediante la utilización de un medidor de clorofila durante el ciclo del cultivo.
- b) Peso seco de raíz y de parte aérea: las muestras serán secadas en estufa a 70 °C hasta peso constante.
- c) Número y peso seco de nódulos: los nódulos se secarán en estufa a 70 °C hasta peso constante.
- d) Contenido de nitrógeno: se determinará en la parte aérea por el método de Kjeldahl modificado (Nelson y Sommers, 1973).

En la etapa fenológica R8 (madurez de arrancado) se realizarán cosechas de plantas por tratamiento y repetición (muestras de 1,43 m de surco). Sobre ellas se evaluará el rendimiento final del cultivo y sus componentes numéricos principales: número de frutos maduros y granos y peso individual de los mismos. También se evaluará producción de materia seca por superficie y partición de biomasa (índice de cosecha). Y calidad comercial de maní: porcentaje de maní apto para selección tipo confitería, relación grano/caja y categorías granométricas.

Análisis estadístico

Los experimentos se llevarán a cabo en un diseño completamente al azar y serán repetidos tres veces. Los datos se analizarán usando ANOVA y prueba de Duncan a $P < 0,05$. Antes de la prueba de significancia, se verificarán la normalidad y homogeneidad de varianza

utilizando las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. Si alguno de los supuestos no se cumple, los datos se transformarán usando funciones apropiadas.

ii. Plan y cronograma de actividades.

Actividades	Meses												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Evaluación de la germinación de semillas de maní de cultivares con tolerancia diferencial al déficit tratados con diferentes dosis de prolina-	■	■											
Ensayo de interacción maní- <i>Bradyrhizobium</i> sp. con semillas tratadas con prolina y expuestas a un ciclo de déficit hídrico y rehidratación.			■	■	■								
Ensayos a campo						■	■	■	■	■	■		
Análisis estadístico y difusión de los resultados											■	■	

iii. Justificación de recursos humanos necesarios (justificación de la conformación del equipo de investigación; grupo responsable y grupo colaborador, etc.)

La investigadora a cargo de la dirección es la Dra. Stella Castro y la coordinadora del proyecto es la Dra. Ana Furlan. Como grupo colaborador se encuentran la Dra. Eliana Bianucci, la Dra. Carla Bruno, el Microbiólogo Diego Perrig, el Lic. en Biotecnología, Juan Manuel Peralta y los estudiantes de las carreras de Microbiología, Francisco Villa y Agustina Chiesa y la estudiante de Ingeniería Agronómica, Noelia Fassano, los cuales se encuentran realizando su trabajo final como becario y colaboradores de investigación de SECyT-UNRC. El grupo posee una amplia experticia en el estudio de las interacciones leguminosa-rizobios a diferentes estreses ambientales. En particular, la Dra. Furlan en el impacto del déficit hídrico en la interacción maní- *Bradyrhizobium* sp. Así, el alcance del objetivo 1 será llevado a cabo por la Dra. Ana Furlan con la colaboración del estudiante Francisco Villa, Becario de Grado en el tema "Rol de prolina en el metabolismo redox de los microsimbiontes de maní en condiciones de estreses abióticos". También participarán en la realización de los ensayos en invernáculo la Dra. Bianucci, el Lic. Peralta y la estudiante Agustina Chiesa. El objetivo 2 será llevado a cabo por la Dra. Bruno, docente de la cátedra de Microbiología Agrícola de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la UNRC con la colaboración de la estudiante Noelia Fassano. El Microbiólogo Diego Perrig, que actualmente se desempeña en el sector privado, posee amplia trayectoria en el estudio de la formulación de inoculantes para leguminosas, y contribuirá al desarrollo de la formulación

del inoculante con el agregado del aminoácido en la semilla. Todas las actividades serán supervisadas por la Dra. Stella Castro quien aportará toda su experiencia en bioquímica, fisiología vegetal e interacciones leguminosas-rizobios. La coordinadora y el grupo de investigadores ejecutarán todas las actividades propuestas con una dedicación de 20 hs semanales mientras que los estudiantes dedicarán 8 hs semanales.

4. Impacto previsto del proyecto

i. Contribución al avance del conocimiento científico (aporte original).

El déficit hídrico es una de las limitaciones ambientales más grandes de la productividad de los cultivos agrícolas. En este sentido es que el estudio de la respuesta de las plantas al estrés resulta fundamental de modo de aumentar la producción en zonas afectadas o extender la frontera a zonas no aprovechadas en la actualidad. En estas condiciones, una de las respuestas de las plantas es la acumulación de solutos compatibles, dentro de los cuales la prolina es de los más importantes. Así, la acumulación del aminoácido se correlaciona positivamente con el nivel de tolerancia al estrés de diferentes cultivares en especies tales como *Atriplex halimus* L., algodón y papa (Ben Hassine y col., 2008; Parida y col., 2008; Evers y col., 2010). Es por ello que, la aplicación de prolina exógena para mejorar la tolerancia de las plantas al estrés se ha utilizado exitosamente en varias especies (Ashraf y Foolad, 2007, Hayat y col., 2012, Ardabili y col., 2013), no habiéndose estudiado esta estrategia en las plantas de maní. La originalidad de la propuesta también radica en la obtención de formulaciones de inoculantes con componentes osmoprotectores que induzcan en la planta la activación de un metabolismo pre-germinativo que contribuya a incrementar el vigor inicial de la semilla, un mejor desarrollo del cultivo y la tolerancia a episodios de déficit hídrico. Así en este trabajo se plantea el uso de cultivares de maní con niveles de tolerancia diferencial al déficit hídrico y la aplicación de prolina exógena que permitirán poner de manifiesto el rol del aminoácido en la estrategia de defensa de las plantas en un cultivo de importancia regional.

ii. Contribución a la formación de recursos humanos (becarios, tesistas, alumnos, etc). Identificar los recursos humanos en proceso de formación, de grado o de posgrado.

Este proyecto redundará en el desarrollo de nuevas capacidades institucionales en nuestra universidad. El mismo será llevado a cabo por la Dra. Ana Furlan, Investigadora Asistente de CONICET y Docente (Ayudante de Primera, dedicación simple) en la Facultad de Ciencias Exactas de la UNRC, quien además de realizar las actividades detalladas en el plan, colaborará en el diseño y la realización de los experimentos incluidos en el proyecto, dada su experticia en el tema de déficit hídrico en maní. Además, cuenta con la colaboración de la Dra. Eliana Bianucci, Investigadora Asistente de CONICET, y Docente (Ayudante de Primera, dedicación simple) en la Facultad de Ciencias Exactas de la UNRC quien posee una vasta trayectoria en el estudio de la interacción maní-rizobios expuestos a condiciones ambientales adversas. La Dra. Carla Bruno, Ingeniera Agrónoma Docente de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la UNRC en la cátedra de Microbiología Agrícola es un eslabón fundamental para el desarrollo del presente proyecto dada su formación académica de grado y posgrado para llevar a cabo los ensayos a campo. El grupo colaborador está integrado por un Microbiólogo, Diego Perrig, que actualmente se desempeña en el sector privado, con amplia trayectoria en el estudio de la formulación de inoculantes para leguminosas. Así, contribuirá al desarrollo de la formulación del inoculante con el agregado del aminoácido en la semilla. También integran el grupo colaborador un Becario Doctoral de CONICET, inscripto en el Doctorado en Ciencias Biológicas de la

UNRC, dos estudiantes avanzados de la carrera de Microbiología y una estudiante avanzada de la carrera de Ingeniería Agronómica, todos Becarios de Investigación de SECYT-UNRC en temas relacionados al del presente proyecto. La participación del grupo colaborador en el desarrollo de las actividades propuestas contribuirá a su formación académica de posgrado y grado, respectivamente. La Dra. Stella Castro aportará todos sus conocimientos adquiridos en su amplia experiencia de los estudios de bioquímica, fisiología vegetal e interacciones leguminosa-rizobio. Esta propuesta está diseñada de modo que se dispone de la infraestructura necesaria para llevar a cabo los ensayos, aprovechando y optimizando los recursos previamente disponibles. Además, el otorgamiento del subsidio permitirá adquirir los insumos para llevar a cabo el plan presentado y la compra de un medidor de clorofila resulta indispensable para evaluar el estado nutricional nitrogenado del cultivo. También se prevé la difusión de los resultados a través de publicaciones en congresos y revistas científicas internacionales con referato, entre otros.

iii. Contribución a la respuesta de las necesidades del clúster manisero.

El déficit hídrico es uno de los factores ambientales más importantes que afectan la productividad y calidad del cultivo de maní. Aun cuando se siembran más hectáreas, estas restricciones hídricas afectan el rendimiento del cultivo poniendo de manifiesto la gravedad de la situación para la economía regional. El impacto negativo de las mermas en el rendimiento del cultivo cobra importancia considerando que más del 90% de la producción nacional se concentra en la provincia de Córdoba. Esta actividad genera más de 10.000 puestos de trabajo directo en 30 localidades del centro-sur de la provincia. A su vez, el mercado de maní en Argentina se caracteriza por estar destinado en un 90% a la exportación, principalmente a Europa, donde goza de una muy buena posición respecto a sus competidores. Es así que nuestro país está posicionado como el primer exportador y séptimo productor mundial. El maní establece asociaciones simbióticas con bacterias fijadoras de nitrógeno constituyendo una alternativa sustentable frente a la utilización de agroquímicos. Es por esto que la industria de los inoculantes es otra de las actividades económicas relacionadas al cultivo de maní que reviste importancia para la economía regional. En los últimos años se trabaja en el desarrollo de inoculantes preparados a base de inóculos crecidos en medios de cultivo inducidos, los cuales no sólo aumentan la nodulación y FBN, sino que también ayudan en condiciones de déficit hídrico. Además, existen en el mercado potenciadores de germinación que extienden la persistencia de los rizobios aplicados sobre las semillas, benefician la nutrición nitrogenada y el crecimiento de las plantas tratadas por adición de hormonas o sustancias con efecto hormonal, enzimas, vitaminas o microelementos. No obstante, es de destacar que estos productos se han desarrollado principalmente para soja, mientras que para el cultivo de maní la oferta es escasa. Es por ello, que en este plan de trabajo se analizará el efecto protector del metabolito prolina aplicado en semilla en interacción con inoculantes de maní, para determinar si son capaces de disminuir la adversidad de los efectos del déficit hídrico en las plantas de maní. El alcance de este objetivo impactaría positivamente en la economía regional tanto por contribuir al desarrollo de una agricultura sustentable como por la posibilidad de una transferencia de los resultados a empresas.



Dra. MARCELA MORESSI
Sub Secretarí­a Técnica
ECEQ-N



Dra. MARISA ROVERA



ANEXO II

Título del proyecto	HERRAMIENTA BIOTECNOLÓGICA PARA EL MEJORAMIENTO DEL CULTIVO DE MANÍ EXPUESTO A DÉFICIT HÍDRICO	Duración (días)	TOTAL
Objetivos del Proyecto	<i>Dilucidar el impacto de la adición de prolina sobre el crecimiento, la nodulación y el rendimiento de cultivares de maní con tolerancia diferencial al déficit hídrico.</i>	ARS 45	\$ 11.000,00
Institución	Universidad Nacional de Río Cuarto		
Responsable proyecto	Stella Castro		
Actividades (definir las actividades necesarias para completar el proyecto de un mínimo de 3 a un max de 12)			
<u>1</u>	Determinación del efecto de diferentes dosis de prolina en la germinación de semillas de maní	ARS 55	\$ 5.000,00
<u>2</u>	Ensayo de invernáculo para determinar el efecto de la adición de prolina sobre el crecimiento y la nodulación de plantas de maní expuestas a un ciclo de déficit hídrico y rehidratación	ARS 30	\$ 5.000,00
<u>3</u>	Cosecha, procesamiento de las plantas y determinación de las variables de crecimiento vegetal	ARS 20	\$ 5.000,00
<u>4</u>	Procesamiento de las plantas y determinación de las variables de nodulación	ARS 30	\$ 42.000,00
<u>5</u>	Determinación de la concentración de clorofilas y prolina	ARS 180	\$ 20.000,00
<u>6</u>	Ensayos a campo en sitios con diferentes condiciones edafoclimáticas	ARS 5	\$ 12.000,00
<u>7</u>	Divulgación de los resultados en Congresos y Jornadas Científicas	ARS 365	\$ 100.000,00



ORIENTACIONAL CUBIC

Universidad Nacional de Río Cuarto
Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales

2019 - Año de la Exportación

Actividad 2

Ensayo de invernáculo para determinar el efecto de la adición de prolina sobre el crecimiento y la nodulación de plantas de maní expuestas a un ciclo de déficit hídrico y rehidratación

Costo total
ARS 5.000

Elegir la categoría de gasto utilizando el desplegable y llenar los campos relevantes

Costo: elemento 1	Material de consumo	Macetas y sustrato	Costo tot.	2.000
Costo: elemento 3	Material de consumo	Solución nutritiva para plantas	Costo tot.	3.000



ORGANISMO

Universidad Nacional de Río Cuarto
Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales

2019 - Año de la Exportación

Actividad 3

Cosecha, procesamiento de las plantas y determinación de las variables de crecimiento vegetal

Costo total

ARS 5.000

Elegir la categoría de gasto utilizando el desplegable y llenar los campos relevantes

Costo: elemento 1	Otros gastos	Describir el gasto	Sobres, hilos, bolsas	Costo tot. 1.000
Costo: elemento 2	Material de consumo	Material	Nitrógeno líquido para conservación de muestras	Costo tot. 4.000



Actividad 4

Procesamiento de las plantas y determinación de las variables de nodulación

Costo total

ARS 5.000

Elegir la categoría de gasto utilizando el desplegable y llenar los campos relevantes

Costo: elemento 1 Servicios	Tipo de servicio	Servicios de terceros para la determinación de N	Costo tot.	3.000
Costo: elemento 2 Otros gastos	Describir el gasto	Envío de muestras para la determinación del porcentaje de N derivado de la atmósfera a Universidad de Stellenbosch (Sudáfrica)	Costo tot.	2.000



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
CENEL-CENAL-CENOR

Universidad Nacional de Río Cuarto
Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales

2019 - Año de la Exportación -

Actividad 5

Determinación de la concentración de clorofilas y prolina

ARS 42.000

Costo total

Elegir la categoría de gasto utilizando el desplegable y llenar los campos relevantes

Costo: elemento 1	Material de consumo	Material	Tolueno, ninhidrina, ácido acético	Costo tot.	2.000
Costo: elemento 2	Equipamiento/Bienes capitales	Equipamiento	Medidor de clorofila para evaluar el estado nutricional de las plantas	Compra/Alquiler	Costo tot. 40.000



CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES

Universidad Nacional de Río Cuarto
Instituto de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales

2019 - Año de la Exportación

Actividad 6

Ensayos a campo en sitios con diferentes condiciones edafoclimáticas

Costo total

ARS 20.000

Definir la categoría de gasto utilizando el código de gastos y llenar los campos relevantes

Costo: elemento 1	Servicios	Tipo de servicio	Determinación de las variables físico-químicas del suelo	Costo tot.	1.000
Costo: elemento 2	Material de consumo		Agroquímicos	Costo tot.	2.000
Costo: elemento 4	Movilidad		Combustible	Costo tot.	10.000
Costo: elemento 5	Otros gastos		Bolsas, hilos, sobres para plantas	Costo tot.	2.000
Costo: elemento 7	Servicios	Tipo de servicio	Contenido de N	Costo tot.	5.000

308



Actividad 7

**Vulgarización de los resultados en
 Congresos y Jornadas Científicas**

Costo total ARS 12.000

seleccionar la categoría de gasto utilizando
 desplegable y llenar los campos
 correspondientes

Costo: elemento 1	Movilidad	Costo tot.	5.000
Costo: elemento 2	Otros gastos	Inscripciones a Congresos-Jornadas-Talleres	7.000
		-	

[Handwritten signature]



ANEXO III

CRONOGRAMA DE TAREAS

HERRAMIENTA BIOTECNOLÓGICA PARA EL MEJORAMIENTO DEL CULTIVO DE MANÍ EXPUESTO A DÉFICIT HÍDRICO

Dra. Stella Castro

Actividades	Meses												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Evaluación de la germinación de semillas de maní de cultivares con tolerancia diferencial al déficit hídrico tratados con diferentes dosis de prolina													
Ensayo de interacción maní-Bradyrhizobium sp. con semillas tratadas con prolina y expuestas a un ciclo de déficit hídrico y rehidratación													
Ensayos a campo DE LA MORESSI Metodología Técnica EFQyN													
Análisis estadístico y difusión de los resultados													