



VNIVERSIDAD
DSALAMANCA

Memoria de actividades del proyecto de innovación docente

iPLANT III: Cuaderno de prácticas virtual de Fitopatología Molecular de Plantas.

Ref. ID2012/167

Realizado por:

Profesor responsable: Oscar Lorenzo Sánchez

Miembros del equipo: Luis Sanz Andreu

Pablo Albertos Arranz

Salamanca, 28 de Junio de 2013

Departamento de Fisiología Vegetal-CIALE
Universidad de Salamanca

Resumen:

Este proyecto docente ha servido para la creación de un cuaderno de prácticas virtual de fisiología y patología molecular de plantas orientado al aprendizaje y aplicación de los protocolos fisiológicos y moleculares utilizados en vegetales, que comprenden: técnicas de laboratorio con plantas modelo, protocolos de transformación estable y transitoria de plantas, infección y análisis fenotípicos en mutantes y plantas transgénicas, análisis de genes reportadores, y finalmente manejo de los microorganismos adecuados. Además se han seleccionado, digitalizado e integrado en una base de datos, imágenes de plantas modelo de experimentación como *Arabidopsis* en distintas etapas del desarrollo vegetal, imágenes de microscopía óptica y confocal descritas acorde con los objetivos de las distintas asignaturas a las que está orientado el cuaderno virtual.

Parte de este material básico, junto con una selección de documentos externos (páginas web, revistas electrónicas, animaciones, videos técnicos y conferencias) se ha utilizado en el presente curso en las distintas asignaturas del Grado en Biotecnología y Máster en Agrobiotecnología. El conjunto de los recursos está siendo adaptado a formatos de aprendizaje secuencial tutelado y evaluable que se ha integrado en la plataforma **Studium** de la Universidad de Salamanca y ha estará plenamente operativo en el segundo cuatrimestre del curso académico 2012-2013. Del mismo modo, parte del material generado ha sido empleado en la construcción de las páginas web del Máster en Agrobiotecnología y del Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE), así como en los folletos divulgativos del citado Máster.

Introducción:

Los análisis fisiológicos y moleculares en plantas son herramientas imprescindibles para el conocimiento y la comprensión de la función de los vegetales y forman parte de los recursos básicos de todo docente del área de Fisiología Vegetal. Los sistemas docentes tradicionales permiten al alumno un somero conocimiento teórico de las técnicas fisiológicas y moleculares básicas y un manejo práctico de las mismas casi testimonial, mientras que el acceso a unas prácticas actualizadas donde se tengan en cuenta los últimos avances en este campo (mutantes, transgénicas, genes reportadores...) en la programación docente, es muy limitado. Por otra parte, las limitaciones temporales de los estudiantes para poder observar un proceso de crecimiento y desarrollo vegetal o de respuesta a estrés en su totalidad a lo largo del ciclo de vida de la planta, dificultan el aprendizaje del proceder fisiológico.

La buena acogida entre los estudiantes de la innovación práctica llevada a cabo recientemente en las asignaturas de Fisiología Vegetal y Fitopatología Molecular guiadas y generadas por ordenador y empleadas por miembros de este equipo y sus excelentes resultados en el aprendizaje, nos llevaron a plantear la necesidad de diseñar un cuaderno virtual de fisiología y patología molecular de plantas, donde nuestros estudiantes puedan aprender a plasmar los resultados una vez hayan obtenido y procesado adecuadamente material vegetal, elegido la(s) técnica(s) más adecuada(s) para un objetivo concreto y aplicado de forma correcta el protocolo correspondiente, para ejercitarse en el diagnóstico fisiológico y molecular, comparando éste con material vegetal

virtual propio con enlaces a reconocidas bases de datos de diversas fuentes (Universidades, Instituciones...).

Objetivo del proyecto:

El objetivo general de este proyecto consiste en consolidar una herramienta informática que, al tiempo que cumple las funciones de simulador de procesos fisiológicos y moleculares, (desde la obtención de mutantes y plantas transgénicas hasta herramientas moleculares y protocolos genéticos, genómicos y proteómicos), cumpla también funciones de referencia virtual y guía de diagnóstico fisiológico y molecular. El diseño de la aplicación está asociado a la autoevaluación de cada parte del proceso y exige la demostración de conocimientos y destrezas mínimos para avanzar en la aplicación. Este cuaderno virtual de fisiología y patología molecular de plantas está facilitando el aprendizaje y la comprensión de los procesos de crecimiento y desarrollo vegetal o de respuesta a estrés, tanto biótico como abiótico, al tiempo que permite al profesorado un seguimiento pormenorizado de los progresos o dificultades en el aprendizaje de cada estudiante y de cada grupo o curso en conjunto.

Justificación:

Cada año, el profesor que redacta esta memoria atiende a más de 100 alumnos, de 2º y 3º ciclo, en asignaturas en las que el estudio de los aspectos fisiológicos y moleculares del vegetal son esenciales, así como una parte importante de los contenidos prácticos.

Las restricciones temporales de los estudiantes para la experimentación vegetal limitan su participación en la obtención de muestras a la de meros espectadores pasivos; en cuanto a los procesos fisiológicos y moleculares, si bien el conjunto de prácticas de las distintas asignaturas cubren las necesidades conceptuales mínimas, el obligatoriamente corto acceso a los laboratorios y el ciclo de vida del vegetal (aunque en la mayoría de nuestros proyectos de investigación se utilizan especies modelo como *Arabidopsis thaliana*, el tiempo estimado desde la germinación de una semilla hasta la obtención de frutos supera los dos meses), limita la experiencia práctica de nuestros estudiantes y no asegura la adecuada comprensión ni la correcta utilización de las diferentes metodologías. En cuanto al análisis fisiológico y molecular, las prácticas de observación y experimentación programadas sólo permiten un somero atisbo de los principales procesos de crecimiento y desarrollo del vegetal y son del todo insuficientes para asentar los conceptos indispensables y la experiencia de observación mínima para interpretar adecuadamente un proceso de desarrollo vegetal o evaluar las respuestas de las plantas a un estrés determinado, tanto de tipo abiótico (sequía, salinidad, frío...) como biótico (ataque por patógenos, insectos, heridas...). Este aspecto se solventa parcialmente mediante recursos informáticos propios que incluyen enlaces con imágenes de plantas online; pero carecen de tutela académica, de control del rendimiento y no son evaluables directamente.

Por otra parte, el coste económico para la realización de cualquiera de estas prácticas por parte de cada alumno, supera ampliamente la dotación disponible para tal fin, especialmente en asignaturas optativas, en las que no

se contempla una dotación especial para las prácticas de laboratorio.

El diseño de la aplicación ha de estar asociado a la demostración de conocimientos y destrezas que permitan al profesorado un seguimiento pormenorizado de los progresos y de las dificultades en el aprendizaje de cada estudiante y de cada grupo o curso en conjunto.

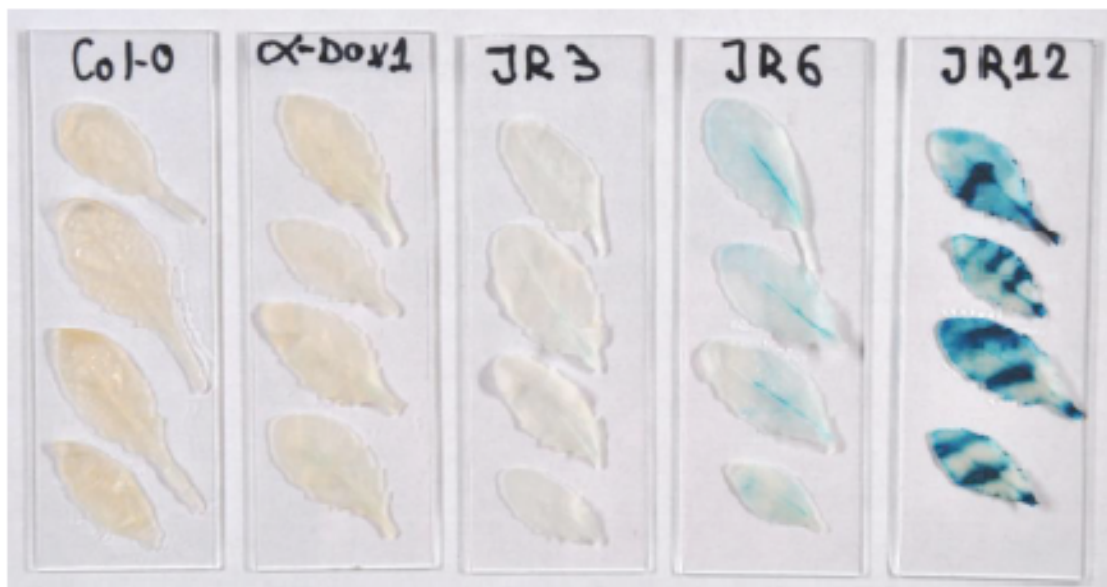
Actividades realizadas:

Las actividades desarrolladas en relación a este proyecto, así como los resultados obtenidos se considerarán en distintos apartados:

- 1) Realización y documentación digital de los resultados obtenidos en prácticas de laboratorio con plantas modelo de experimentación (*Arabidopsis*).
- 2) Digitalización de imágenes con plantas modelo de experimentación.
- 3) Selección de material externo.
- 4) Ensayos docentes en la plataforma *Studium* e integración en páginas web.
- 5) Montaje del cuaderno virtual.

1) Realización y documentación digital de los resultados obtenidos en prácticas de laboratorio con plantas modelo de experimentación (*Arabidopsis*).

Hemos realizado grabaciones en vídeo digital y fotografías de los protocolos habituales en nuestro laboratorio, así como de los resultados obtenidos en cada procedimiento experimental y hasta el momento disponemos de varios videos y figuras editados como el ejemplo que se muestra en la Figura 1.



Dpto. Fisiología Vegetal-CIALE

Figura 1.- Ejemplo de documentación digital de protocolos de respuesta a herida en hojas de plantas modelo como *Arabidopsis*, utilizando ensayos histológicos de actividad β -glucuronidasa.

2) Digitalización de imágenes con plantas modelo de experimentación.

Del mismo modo, se han realizado imágenes digitales de diversas plantas modelo habituales en nuestro laboratorio, como los ejemplos que se muestran en la Figura 2.



Figura 2.- Ejemplo de documentación digital de técnicas de laboratorio con plantas modelo de experimentación (Arabidopsis, izda. y señalización de heridas en plantas de patata, drcha.).

3) Selección de material externo.

Si bien la base de la herramienta didáctica que estamos construyendo ha de ser material propio, creemos necesario utilizar material complementario externo procedente de diversas fuentes con objetivos comunes a los de este proyecto. En este sentido, hemos realizado una primera selección de material externo que será utilizado como material complementario como el que destacamos en la Figura 3:

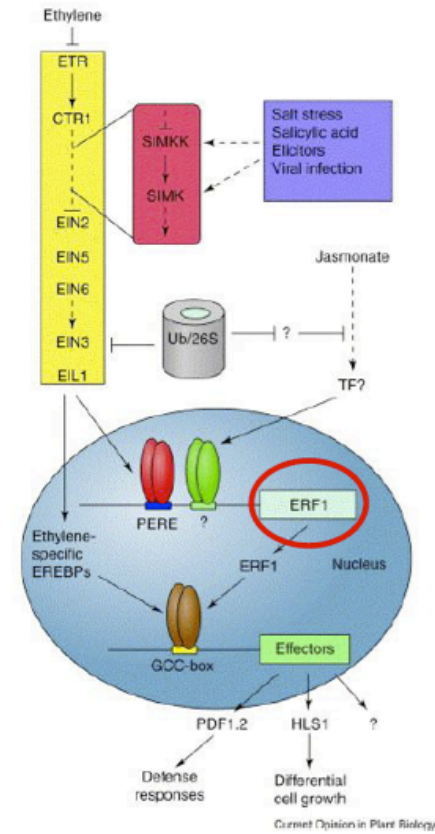
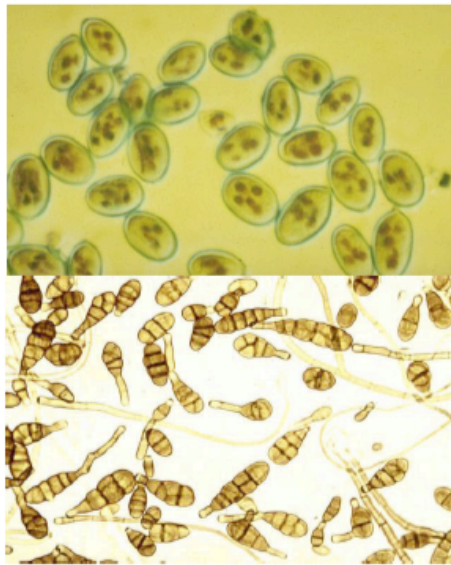


Figura 3.- Ejemplos de selección y digitalización de imágenes de fuentes bibliográficas y de bases de datos de acceso libre. (Esporas de *Botrytis* y *Alternaria*, izda. y ryta de señalización de etileno en plantas, drcha.).

4) Ensayos docentes en la plataforma *Studium* e integración en páginas web

Durante el curso académico que ahora concluye hemos utilizado la plataforma Studium en las asignaturas Fitopatología Molecular (Grado en Biotecnología, <https://moodle.usal.es/course/view.php?id=1578> Figura 4), para la puesta a punto de los materiales que íbamos elaborando.

Utilizamos la actualización de ambas páginas como medio para testar la potencialidad didáctica de imágenes y esquemas básicos.

Del mismo modo, parte del material generado ha sido empleado en la construcción de las páginas web del Máster en Agrobiotecnología (<http://agrobiotecnologia.usal.es>) y del Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE, <http://ciale.usal.es>), así como en los folletos divulgativos del citado Máster.

The screenshot shows the Studium virtual campus interface. At the top, it displays the Studium logo and the user's name, ÓSCAR LORENZO SÁNCHEZ. The main content area is titled 'Facultad de Biología' and 'FITOPATOLOGÍA MOLECULAR'. A list of 11 topics is shown, each with a checkbox and associated documents (fotocopias). The topics are:

- Tema 1.- Introducción al estudio de las interacciones moleculares entre planta-patógeno.** (Fotocopias Tema 1)
- Tema 2.- Arabidopsis como sistema modelo. Aproximaciones experimentales.** (Fotocopias Tema 2)
- Tema 3.- Mecanismos de ataque por agentes fitopatógenos: virus (y viroides), bacterias, hongos y nematodos.** (Fotocopias Tema 3-4 BacteriasI, Fotocopias Tema 3-4 Virus y Viroides)
- Tema 4.- Reconocimiento específico planta-patógeno. Inmunidad innata: "host" y "non-host".** (Fotocopias Tema 3-4 BacteriasII, Presentación Efectores Tipo III, Fotocopias Tema 3-4 Oomicetos, Fotocopias Tema 3-4 Hongos)
- Tema 5.- Mecanismos generales de defensa de las plantas frente a patógenos.**
- Tema 6.- Síntesis de las moléculas señalizadoras: ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y etileno (ET).** (Fotocopias Tema 6-7 JAs, Fotocopias Tema 6-7 ET)
- Tema 7.- Rutas de transducción de señales en la respuesta de defensa de la planta.** (Fotocopias Tema 6-7 SA, Fotocopias Tema 6-7 ABA)
- Tema 8.- Interacciones entre rutas de transducción de señales (crosstalk positivo y negativo).** (Fotocopias Tema 8 ERF1)
- Tema 9.- Función de los productos finales en la relación planta-patógeno.**
- Tema 10.- Aplicación de la Biotecnología Vegetal y mejora clásica de la resistencia a enfermedades.**
- Seminarios** (Producción de vacunas en plantas, Interacción planta-nematodo, Plantas transgénicas, Fitoplasmas, Plantas parásitas, Trichoderma: agente de biocontrol, Patógenos de interés agrícola y/o biotecnológico)

The interface also includes a sidebar with navigation options like 'Personas', 'Actividades', 'Administración', and 'Novedades'. The footer shows the Universidad de Salamanca logo and the Moodle logo.

Figura 4.- Integración en la plataforma Studium de los contenidos correspondientes a la asignatura de Fitopatología Molecular (Grado en Biotecnología) y Respuesta de la planta a las condiciones adversas del medio: Estréses Bióticos (Máster Universitario en Agrobiotecnología).

5) Montaje del cuaderno de prácticas virtual.

Las pruebas con parte del material elaborado demuestran que incluso en herramientas no específicas para su uso, como la simple integración de documentos aislados, simplifica y mejora notablemente el aprendizaje de los alumnos en todos y cada uno de los niveles y asignaturas. Esto sugiere que la programada integración en una herramienta única puede ser muy eficiente para la docencia y más *amigable* para el aprendizaje. Con este objetivo, desde enero de este año, estamos montando un programa específico, que será el resultado final de este proyecto, que, aún integrado en un servidor externo

(Facultad de Biología) será accesible y estará integrado en la plataforma **Studium**.

Como ejemplo de **cuaderno virtual** de recopilación de supuestos prácticos basados en el material obtenido en los apartados anteriores y elaboración de los test de evaluación adecuados a cada supuesto práctico en su conjunto y a cada una de las etapas básicas del mismo mostramos el integrado en la asignatura de Fitopatología Molecular.

PRÁCTICA 2: ESTUDIO DEL PROCESO DE INFECCIÓN DE PATÓGENOS NECROTROFOS

1. Objetivo

Cultivo de hongos necrotrofos y posteriormente infección de plantas de *Arabidopsis* con distintos fondos genéticos para poder estudiar el proceso de infección fúngico.

2. Fundamento teórico

Las plantas son organismos sésiles (viven ancladas por el sistema radicular al suelo) y esto les obliga al desarrollo de mecanismos de defensa para hacer frente a las condiciones ambientales hostiles (tanto bióticas como abióticas) en las que viven.

Una planta sana es aquella que puede desarrollar todas sus funciones fisiológicas hasta el límite máximo que le permita su potencial genético, mientras que una planta enferma es aquella que presenta un malfuncionamiento celular o tisular como resultado de la acción continua de un agente patógeno o factor ambiental.

Entre los agentes patógenos causantes de enfermedad en vegetales encontramos a los hongos necrotrofos, patógenos que se alimentan de los metabolitos contenidos en las células del tejido muerto y para ello producen la muerte de las células desde las primeras etapas de la infección.

Todos los organismos vegetales pueden ser atacados en un determinado momento de su ciclo de vida por un hongo, de manera que los daños ocasionados van desde leves hasta la completa destrucción y muerte de los tejidos invadidos. Dado que económicamente esto implica pérdidas millonarias, la importancia de estudiar la interacción hongo-planta y del desarrollo de estrategias de control es indiscutible.

3. Materiales

➤ **Reactivos:**

- Plantas de *Arabidopsis* de fondo genético silvestre (Col-0), insensibles a JA (coi1-16), ABA (abi1-1), ET (ein2) y de respuesta constitutiva a ET.
- Hongos necrotrofos: *Alternaria* y *Botrytis*.
- Placas de medio PDA (Patata Dextrosa Agarosa).

➤ **Equipos:**

- Cámara de flujo laminar.
- Microscopio óptico.

➤ **Material fungible:**

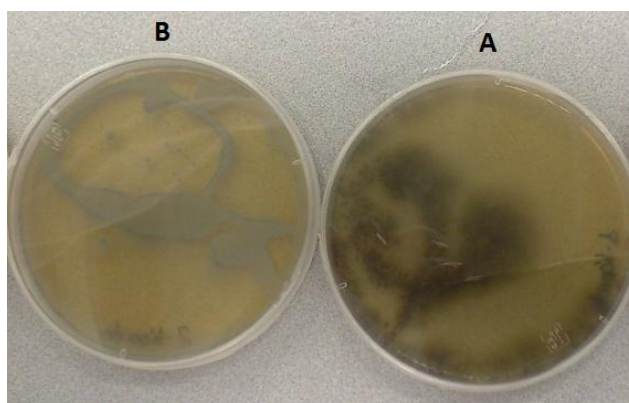
- Placas Petri de vidrio estériles.
- Pipetas de precisión.
- Rotulador de vidrio.
- Parafilm.
- Portaobjetos.

4. Procedimiento experimental y resultados

1. **Cultivo de dos hongos necrotrofos.** El cultivo de los hongos se va a llevar a cabo en una cámara de flujo laminar de dos formas:
 - a) Coger una pequeña porción de micelio de una placa donde se tiene el hongo creciendo con ayuda de una punta de pipeta estéril y colocarla en una placa de PDA.
 - b) Coger 150 µl de esporas y micelio de un hongo que se encuentra creciendo en una suspensión líquida y depositarlos en una placa de PDA.

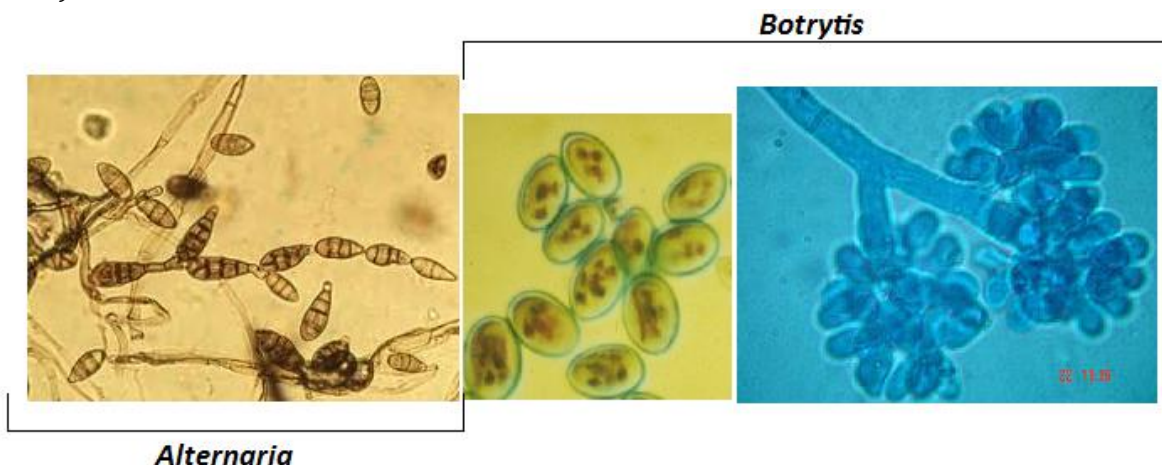
Las dos placas obtenidas se sellan con parafilm y se llevan a la cámara de crecimiento.

2. **Observación morfológica de las esporas** de los dos hongos necrotrofos con los que se trabajó en el punto 1, con la finalidad de determinar el género al que pertenecen. A simple vista, tras una semana de crecimiento, se observan ciertas diferencias entre los dos organismos: uno de ellos (A) presenta coloración negrusca, un aspecto más filamentososo y algodonoso y micelio más aéreo y, por el contrario, el otro (B) presenta una coloración azul grisacea, un aspecto más polvoriento y un micelio menos aéreo (crecimiento hacia el medio).



Otro dato importante para diferenciar entre los dos hongos es la morfología de sus esporas, para su estudio se depositan micelio y esporas de ambos en un portaobjetos y se visualizan en el microscopio. El hongo A presenta esporas alargadas con septos transversales, mientras que el género B tiene esporas redondeadas y organizadas en forma de racimos.

En base a esto se determina que el hongo A pertenece al género *Alternaria* y el hongo B al género *Botrytis*.

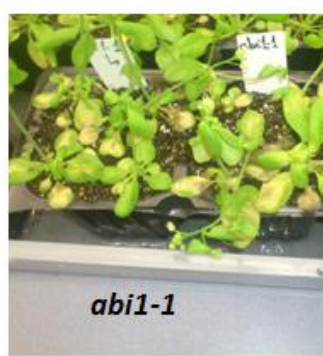


3. **Infección de plantas en tierra con *Botrytis*.** Se van a infectar plántulas de *Arabidopsis* de fondo genético silvestre, insensibles a JA, ABA y ET y de respuesta constitutiva a ET. Para ello se depositan 5 µl de una solución de esporas del hongo en hojas alternas de la roseta basal y se marcan los peciolos de las hojas que han sido infectadas para facilitar la posterior determinación de daño local o sistémico. Finalmente, se tapa la bandeja con las difentes plantas en tierra para que el crecimiento ocurra con un 100% de humedad y se sella con esparadrapo, de manera que se permite el paso de la luz.



4. **Observación fenotípica de la infección con esporas de *Botrytis*:** los resultados fenotípicos obtenidos trascurridos 8 días de la infección con el hongo necrotrofo son:

- Plántulas de *Arabidopsis* de fondo genético silvestre (Col-0): sobrevive a la infección aunque no de forma tan eficaz como los mutantes resistentes a la infección (se observan ciertas hojas amarillentas).
- Plántulas de *Arabidopsis* insensibles a JA (Coi1-16): son sensibles a la infección.
- Plántulas de *Arabidopsis* insensibles a ABA (Abi1-1): son sensibles a la infección.
- Plántulas de *Arabidopsis* insensibles a ET (Ein2-1): son sensibles a la infección.
- Plántulas de *Arabidopsis* de respuesta constitutiva a ET (Erf12 y Erf40): son plántulas que sobreexpresan de manera constitutiva el factor transcripcional erf, lo que implica una activación continua de la respuesta a etileno y a JA. Estas plántulas son resistentes a la infección aunque presentan un tamaño menor al del tipo silvestre (siendo de menor tamaño los mutantes erf40 por tener una expresión mayor del factor erf), debido a que la activación de erf provoca que estas plantas crean que se encuentran en peligro continuamente y prioriza la defensa al crecimiento.



PRÁCTICAS DE FITOPATOLOGÍA

Práctica 2: estudio del proceso de infección de patógenos necrotrofos

5. Conclusiones

Se ha observado infección generalizada en los mutantes sensibles a JA (Coi1-16), en los insensibles a ABA (Abi1-1) y en los insensibles a ET (Ein2-1). Para colonizar el vegetal, el hongo necrotrofo dispone de una serie de herramientas para sobrepasar las barreras físicas del vegetal, como la secreción de enzimas que actúan sobre la pared celular, que le permiten la penetración y el ablandamiento de los tejidos vegetales. En algunos casos se observa pérdida de turgencia en los tallos debido fundamentalmente a una necrosis a nivel de los haces vasculares.

Destacar que el hecho de que el tipo silvestre sea capaz de contener la infección, pone de manifiesto que la enfermedad es la excepción.

Figura 5.- Ejemplo de cuaderno de prácticas en la asignatura de Fitopatología Molecular.

Principales conclusiones:

Las prácticas fisiológicas y moleculares con organismos vivos, en este caso plantas *reales*, son imprescindibles e insustituibles en la formación de Licenciados o Graduados en Biología, Bioquímica y Biotecnología, titulaciones en las que están implicados los solicitantes de este proyecto. Con este proyecto se aseguran, refuerzan y amplían los conocimientos y la experiencia en la práctica fisiológica y molecular vegetal de manera cómoda para el estudiante, por permitirle gestionar los tiempos de utilización y el ritmo de aprendizaje, al tiempo que le permite seguir, mediante simulación tutelada, aspectos imprescindibles en la formación agrobiotecnológica, pero imposibles de realizar actualmente en nuestra Universidad, además de acceder a herramientas moleculares, hasta ahora infrautilizadas, como a bases de datos de garantía. Y todo ello en un sistema tutelado y sometido a evaluación, tanto por el propio estudiante como por su(s) profesor(es).

Esta herramienta de aprendizaje es supervisada por el profesorado, permitiendo adaptarla a los adecuados niveles conceptuales y destrezas de cada asignatura, estableciendo en cada caso límites mínimos, pero no máximos. Esto permite que el sistema sea único, pero flexible, evaluando en función de los objetivos de cada asignatura, pero permitiendo la práctica, la observación y la adquisición de conocimientos y destrezas en Fitopatología Molecular de Plantas hasta el límite que se marque el propio estudiante. Por todo lo anterior, consideramos que el presente proyecto es un complemento práctico adecuado al Espacio Europeo de la Educación Superior, que mejorará la gestión de recursos temporales y materiales de profesores y alumnos, al tiempo que incrementará sensiblemente la calidad docente y la potencialidad de aprendizaje en las asignaturas para las que está diseñado. También, nos ha permitido desarrollar un nuevo modelo de cuaderno de prácticas basado en la actualización de técnicas y protocolos así como en el manejo de equipos actuales y bases de datos que suplen las posibles carencias detectadas en la formación de los alumnos superando notablemente las expectativas iniciales. Entre las principales aportaciones del proyecto cabe destacar que el cuaderno de prácticas permite al alumno tener una visión real de protocolos técnicos y además los alumnos se inician en el manejo de reactivos y técnicas moleculares cuyo requerimiento en el mercado laboral es elevado.

Respecto al rendimiento académico de los alumnos, el índice de satisfacción observado fue alto. Además, la realización del cuaderno de prácticas les permitió una mejor asimilación del contenido teórico. Por tanto, podemos concluir que existe una relación directa entre los objetivos deseados, la metodología activa que se emplea y la evaluación obtenida.

Consideramos relevante hacer notar que este proyecto de **cuaderno de prácticas virtual de fitopatología molecular de plantas** ha sobrepasado las expectativas iniciales y en la actualidad participan en su elaboración todos los miembros del grupo, incluido PAS y becarios. Por otra parte, recursos no programados inicialmente, como conferencias internas del CIALE y

demostraciones técnicas, estarán disponibles en el producto operativo el curso 2013-2014. Concluimos este informe con el compromiso de consolidar mediante actualización, ampliación y modificación, si fuera necesario, los contenidos del **Cuaderno de Prácticas Virtual de Fitopatología Molecular de Plantas**, en futuras convocatorias de proyectos de innovación docente.

Salamanca, 28 de junio de 2013.