

Proyecto de Innovación Docente

MEMORIA FINAL

ID2023/126

**Desarrollo de una nueva práctica de laboratorio para demostrar las ventajas en
resistencia a patógenos del híbrido agrícola Triticale (*Triticosecale* Wittmack)**

Coordinador del proyecto:

José María Díaz Mínguez

Miembros del equipo de trabajo:

Virginia Casado del Castillo

Departamento de Microbiología y Genética

INTRODUCCIÓN

El objetivo general de este Proyecto de Innovación Docente era implementar una práctica de laboratorio novedosa para mejorar el aprendizaje de los logros de la mejora genética vegetal y su repercusión en la agricultura en el Grado de Ingeniería Agrícola y en el Máster de Agrobiotecnología. Por un lado, el proyecto permitía estudiar la mejora en la resistencia a patógenos conseguida en el híbrido Triticale, y por otro, contribuiría a la formación investigadora de los estudiantes a través de la aplicación de técnicas de laboratorio actualizadas. Con el fin de abordar este objetivo general, nos propusimos una serie de objetivos específicos que se han completado parcialmente en el presente curso académico como se detalla a continuación.

RESULTADOS

Objetivo Específico 1

Nuestro primer objetivo era diseñar un procedimiento experimental para analizar las consecuencias de un evento de cruzamiento entre dos especies vegetales sobre la resistencia de la planta a un patógeno. Como material vegetal se seleccionaron plantas de Triticale (*Triticosecale* Wittmack) y de trigo (*Triticum aestivum*) que son resistentes y susceptibles al patógeno *Zymoseptoria tritici*, respectivamente. Este patógeno es el agente causal de la septoriosis de la hoja y séptimo hongo fitopatógeno más relevante a nivel mundial.

Con el fin de optimizar las condiciones apropiadas para llevar a cabo ensayos de patogenicidad en las plantas que permitieran observar de forma clara la sintomatología de la enfermedad, se llevaron a cabo algunas pruebas previas para establecer un procedimiento experimental adaptado a los recursos y tiempos habituales en las prácticas de laboratorio de las asignaturas de Grado y Máster. Se ensayaron diferentes tiempos de imbibición de las semillas, diferentes tiempos de germinación de las semillas y crecimiento de la plántula, y varias concentraciones de esporas del patógeno como fuente de inóculo, tal y como se refleja en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros ensayados en los ensayos de inoculación del patógeno. En verde se resaltan las condiciones óptimas para obtener los mejores resultados en el tiempo dedicado a la docencia práctica.

Imbibir semillas	Germinar semillas	Crecimiento de plántulas	Concentración de esporas (esporas/mL)
12 horas	12 horas	12 horas	$0,5 \times 10^6$
24 horas	24 horas	24 horas	5×10^6
36 horas	36 horas	36 horas	10×10^6
	48 horas	48 horas	

Se ensayaron combinaciones de los diferentes parámetros recogidos en la Tabla 1 para establecer el protocolo más optimizado de forma que el alumnado pueda observar de forma clara las consecuencias de la inoculación de un patógeno en una especie vegetal resistente y en una susceptible. Se seleccionaron las condiciones resaltadas en color verde en la Tabla 1 por ser las que permitieron observar de forma clara los resultados en el tiempo establecido. Un tiempo de imbibición de las semillas superior a 36 horas provocó la

emergencia del epicotilo en oscuridad, lo que altera las condiciones óptimas establecidas en bibliografía para la inoculación de este patógeno (Jia *et al.*, 2017), por lo que se seleccionó como mejor tiempo el de 24 horas. Por otro lado, en el tiempo de germinación de semillas se busca tener semillas en las que la radícula haya emergido y presente una longitud de entre 3 y 4 mm, situación conseguida tras 24 horas de incubación en oscuridad. En cuanto al periodo necesario para el crecimiento de la plántula, el procedimiento requiere la emergencia del epicotilo hasta alcanzar una longitud aproximada de 8-10 mm, lo que ocurrió en el tiempo de 24 horas, descartando así el resto de tiempos ensayados. Finalmente determinamos que la concentración de $0,5 \times 10^6$ esporas/mL era suficiente para inducir la aparición de síntomas de septoriosis de la hoja, pero en un tiempo de 20-30 días, excesivo para unas prácticas de Grado o Máster; sin embargo, la concentración máxima ensayada, 10×10^6 esporas/mL, permitió observar síntomas característicos de la enfermedad en 7-8 días, un tiempo adecuado para el desarrollo de estas prácticas.

Establecidas las condiciones óptimas para conseguir el objetivo planificado en la práctica, establecimos un protocolo adaptado al alumnado de Grado y Máster. En la Figura 1 se presentan las diferentes etapas en el desarrollo de la práctica con los resultados obtenidos en los ensayos realizados para establecer las condiciones mencionadas.

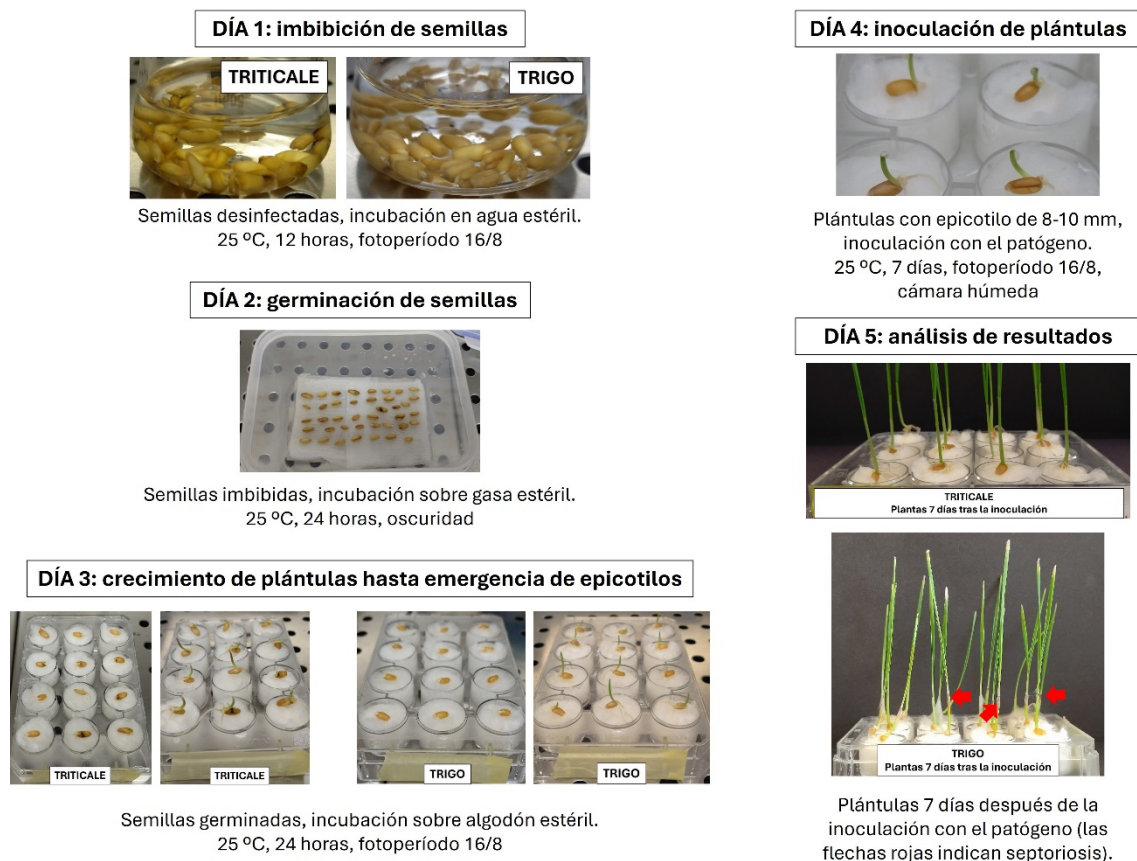


Figura 1. Etapas del desarrollo de la práctica propuesta en el Proyecto de Innovación Docente. Las imágenes representan los resultados obtenidos en las condiciones óptimas establecidas en el Objetivo 1.

Objetivo Específico 2

El segundo objetivo del Proyecto de Innovación Docente propuesto proponía la elaboración de material de apoyo para la realización de las sesiones prácticas que se facilitaría a los estudiantes para el desarrollo de la actividad en el laboratorio.

El trabajo realizado en el Objetivo Específico 1 permitió establecer el procedimiento experimental que permite demostrar cómo la Mejora Genética Vegetal aporta beneficios a los nuevos híbridos conseguidos, en particular en el caso que nos ocupa la resistencia a un patógeno fúngico en el híbrido Triticale. A partir de este procedimiento experimental elaboramos el material de apoyo para que el alumnado pudiese desarrollar la práctica en la experiencia piloto planificada en el Objetivo Específico 3.

Preparamos un protocolo de la práctica titulada “Resistencia a patógenos fúngicos en el híbrido Triticale” (Anexo I). El protocolo se incluirá en el cuaderno de prácticas que se entrega a los estudiantes al inicio de las sesiones de docencia práctica en el laboratorio. El protocolo incluye una serie de apartados que facilitan la comprensión del objetivo de la práctica, así como realización por el alumno en el laboratorio:

- 1.- Introducción teórica**, con la que se ofrece información al alumno para mejorar la comprensión de los conceptos fundamentales que se trabajan en la práctica y que también sirve de apoyo al estudio junto con las explicaciones del profesor o profesora.
- 2.- Materiales**, que incluye los recursos necesarios para llevar a cabo la práctica que deben estar preparados con antelación.
- 3.- Metodología**, apartado en el que se explica de forma detallada y precisa el procedimiento experimental a seguir incluyendo instrucciones concretas de manejo de materiales y equipos que no se encuentran en un protocolo habitual de un laboratorio como, por ejemplo, “indica en cada matraz qué especie vegetal has colocado”.
- 4.- Análisis de resultados**, apartado en el que el profesor o profesora propone diversas cuestiones con el objetivo de ayudar al alumnado a analizar los resultados objetivos de una forma crítica basada en la observación.

Objetivos Específicos 3 y 4

El Proyecto de Innovación Docente propuesto incluía en su Objetivo Específico 3 la realización de una experiencia piloto en la que se impartiría la práctica diseñada a los estudiantes de la asignatura “Mejora Genética Vegetal” del Máster en Agrobiotecnología para evaluarla e identificar posibles puntos de mejora.

Para el desarrollo del Proyecto se solicitaba una inversión económica inicial de 300 € con los que financiar el material de laboratorio necesario para la puesta en marcha de la práctica propuesta en el proyecto. La valoración de la propuesta presentada fue positiva por la comisión, pero no recibió financiación. Esta situación ha imposibilitado la realización del Objetivo Específico 3.

Al pretender buscar puntos de mejora con la experiencia piloto (Objetivo Específico 3) para proponer una práctica de laboratorio novedosa y optimizada en la titulación del Máster en Agrobiotecnología (Objetivo Específico 4), y no haberse podido llevar a cabo

dicha experiencia por falta de financiación, no podemos todavía proponer la implantación de la práctica.

CONCLUSIONES

El desarrollo parcial de los objetivos propuestos en este Proyecto de Innovación Docente ha permitido diseñar una práctica novedosa para mejorar la comprensión de las consecuencias beneficiosas de la Mejora Vegetal Genética. La práctica enfatiza las ventajas de la obtención de un híbrido vegetal ampliamente utilizado en agricultura, Triticale, principalmente en cuanto a resistencia a patógenos fúngicos.

La realización de los objetivos específicos 1 y 2 del proyecto ha permitido desarrollar un protocolo adaptado para la realización de la práctica en un laboratorio de prácticas, que debe ser analizado y validado con una experiencia piloto con alumnos durante un curso académico. Se pretende llevarlo a cabo cuando se consiga financiación para ello dado que consideramos que es muy positiva la puesta en marcha de esta práctica para la formación de los estudiantes de la titulación “Máster en Agrobiotecnología”.

ANEXO I

Guión de la práctica desarrollada en el Proyecto de Innovación Docente.

PRÁCTICA 1: Resistencia a patógenos fúngicos en el híbrido Triticale

Introducción

El triticale (*Triticosecale* Wittmack) es un híbrido entre trigo (*Triticum aestivum*) y centeno (*Secale cereale*) que se obtuvo para aprovechar las mejores características de cada uno, y que dio como resultado una especie más resistente a patógenos como es el caso del hongo *Zymoseptoria tritici*. Este hongo ocasiona la enfermedad conocida como septoriosis de la hoja y es el séptimo hongo fitopatógeno de mayor relevancia en la agricultura a nivel mundial (Dean *et al.*, 2012).

En esta práctica se estudiarán los efectos de este patógeno sobre plántulas de trigo y sobre plántulas del híbrido triticale.

Materiales

- Semillas de trigo
- Semillas de triticale
- Tubos de 10 mL
- Solución de hipoclorito de sodio 2%
- Agua destilada estéril
- Matraces de 125 mL
- Gasas
- Recipientes de plástico
- Papel de aluminio
- Algodón estéril
- Placas Petri multipocillo
- Bandejas
- Pinzas
- Tijeras
- Suspensión de esporas del hongo
- Papel film transparente
- Cinta adhesiva
- Micropipetas automáticas
- Puntas de pipeta

Metodología

1.- Preparación de las plántulas:

Día 1:

- Introducir 40 semillas de cada una de las especies vegetales en un tubo de 10 mL y añadir 5 mL de hipoclorito de sodio al 2% durante 20 minutos.
- Eliminar la solución de hipoclorito de sodio y lavar las semillas con agua destilada estéril durante 2 minutos. Repetir el paso 4 veces.
- Pasar las semillas a un matraz de 125 mL que contenga agua destilada estéril. Colocar una gasa en la boca del matraz y dejar el matraz sobre la mesa toda la noche.
- Recordar identificar cada matraz con el nombre de la especie vegetal.

Día 2:

- Colocar en el fondo del recipiente transparente dos gasas estériles y añadir agua destilada estéril hasta dejar las gasas empapadas (precaución: no añadir agua en exceso).
- Colocar con la ayuda de las pinzas las semillas sobre la gasa.
- Envolver el recipiente con papel de aluminio y colocarlo en la estufa a 25 °C toda la noche.
- Recordar identificar cada recipiente con el nombre de la especie vegetal.

Día 3:

- Colocar con unas pinzas un algodón estéril en cada uno de los pocillos de la placa multipocillo y añadir agua destilada estéril hasta que esté totalmente humedecido.
- Colocar con la ayuda de las pinzas una semilla en cada uno de los pocillos. Escoger sólo semillas que tengan una radícula de 2-4 mm de longitud.
- Colocar las placas en las bandejas blancas que contienen agua en el fondo y tapar la bandeja con papel film transparente. Conservar las bandejas en el incubador a 25 °C toda la noche.
- Recordar identificar cada placa Petri con el nombre de la especie vegetal.

2.- Inoculación del patógeno:

- Cortar el ápice (2 mm) de cada epicotilo vegetal con las tijeras.
- Depositar sobre el corte 1,5 µL de la suspensión de esporas del hongo (agitarla siempre antes de tomar la muestra).
- En las plantas control, depositar sobre el corte 1,5 µL de agua destilada estéril.
- Colocar las placas en las bandejas blancas que contienen agua en el fondo y tapar la bandeja con papel film transparente. Conservar las bandejas en el incubador a 25 °C durante 7 días.

3.- Cuantificación de los síntomas de septoriosis:

- Con una regla medir el tamaño de las lesiones necróticas ocasionadas por el patógeno en la hoja de cada planta.
- Anotar el número de las lesiones y la extensión de cada una de ellas.

Análisis de resultados

1.- ¿Qué efectos has observado en las plantas de cada especie vegetal después de la inoculación con el patógeno?

2.- ¿Hay diferencias en las lesiones necróticas observadas en cada especie vegetal? Si así es, ¿cuál puede ser la causa?

Referencias

- Jia, L., Wang, W. y Tang, W. 2017. *BIO-PROTOCOL* 7 (15). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2439>.
- Dean, R., Van Kan, Jan a. L., Pretorius, Zacharias A., Hammond-Kosack, Kim E., Di Pietro, Antonio, Spanu, Pietro D., Rudd, Jason J., *et al.* 2012. *Molecular Plant Pathology* 13 (4): 414-30. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>.