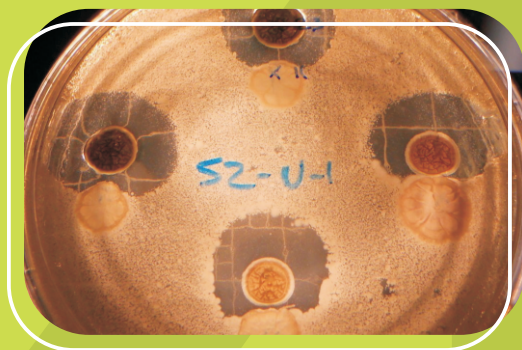




UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



4^o Taller de Agentes Microbianos de Control Biológico



Viernes 31 de Octubre de 2014
MONTEVIDEO - URUGUAY

IV Taller de Agentes Microbianos de Control Biológico

RESÚMENES DE PRESENTACIONES

31 de octubre de 2014
Montevideo



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Título: IV Taller de Agentes Microbianos de Control Biológico

Compiladores: Ing.Agr.,Dr. Eduardo Abreo *
Ing. Agr., M.Sc., PhD. Nora Altier *
*INIA Las Brujas, Sección Bioinsumos

© 2014, INIA

ISBN: 978-9974-38-363-0

Editado por la Unidad de Comunicación y Transferencia de Tecnología del INIA
Andes 1365, Piso 12. Montevideo, Uruguay.
<http://www.inia.uy>

Quedan reservados todos los derechos de la presente edición. Esta publicación no se podrá reproducir total o parcialmente sin expreso consentimiento del INIA.

COMITÉ ORGANIZADOR

Eduardo Abreo (INIA Las Brujas)

Nora Altier (INIA Las Brujas)

Alicia Arias (IIBCE)

Natalia Bajsa (IIBCE)

Enrique Castiglioni (CURE, UDELAR)

Lyliam Loperena (Facultad de Ingeniería, UDELAR)

Sandra Lupo (Facultad de Ciencias, UDELAR)

Silvia Pereyra (INIA La Estanzuela)

Federico Rivas (INIA Las Brujas)

Patricia Vaz (INIA Las Brujas)

Silvana Vero (Facultad de Química, UDELAR)

María Lis Yanes (IIBCE)

AUSPICIOS

Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA)

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE)

Universidad de la República (UDELAR)

Proyecto Cooperativo para el Desarrollo Tecnológico Agroalimentario y

Agroindustrial del Cono Sur (PROCISUR) - Plataforma de Recursos Genéticos (REGENSUR)

Sociedad Uruguaya de Fitopatología (SUFIT)

Calister S.A.

Lage y Cía. S.A.

Lafoner S.A.

PRÓLOGO

El Primer Taller Uruguayo de Agentes Microbianos de Control Biológico (AMCB), realizado en Colonia los días 21 y 22 de marzo de 2006, permitió sentar las bases de la situación actual de Uruguay en la temática, así como evidenciar las necesidades para que el control biológico pueda posicionarse como área estratégica en el manejo de las principales enfermedades y plagas agrícolas en el país.

El Segundo Taller de AMCB, realizado en Colonia los días 4 y 5 de setiembre de 2008, se focalizó en analizar y discutir los avances logrados en la prospección, evaluación y eficiencia de control de agentes microbianos para el control de enfermedades e insectos, con énfasis en los aspectos de formulación, escalado y producción. Asimismo, se desarrolló una discusión sobre “Marco Normativo y Comercialización”, con la participación de destacados investigadores de la región (Brasil, Argentina, Chile) y de países con modelos exitosos (Colombia, Cuba, Israel, Nueva Zelanda), cuyas conclusiones señalaron la relevancia de fomentar la integración regional/internacional de los grupos trabajando en el tema de control biológico.

El Tercer Taller de AMCB se realizó en Piriápolis en setiembre de 2011, junto a la XXV Reunión Latinoamericana de Rizobiología (RELAR), lo que resultó una ocasión inmejorable para reunir investigadores de la región y sumar capacidades en el área de los RRGG microbianos. Tuvo como objetivo abordar la temática “Uso y perspectivas de los AMCB en sistemas de producción sustentables”, discutiéndose sobre la relevancia económica y ambiental para la sociedad y el comercio exterior. Se destacó la necesidad de desarrollar políticas públicas que promuevan el uso de bioinsumos para valorizar productos y procesos en las cadenas productivas, y la importancia de la gestión de las colecciones de cultivos microbianos para la conservación y uso sustentable del recurso.

Esta cuarta edición del evento tiene como objetivo abordar la temática “Limitantes, oportunidades y desafíos en el uso de los AMCB en la Agricultura” y contará con la presencia de destacados expositores nacionales e internacionales vinculados a la academia, al gobierno y a las empresas. La jornada integrará temas científicos y tecnológicos con aspectos que hacen a la investigación, al desarrollo comercial, a la protección de la Propiedad Intelectual, y al registro de productos basados en agentes microbianos para la protección vegetal. Se presentarán experiencias exitosas de la región, el ejemplo de los endófitos como estrategia de biocontrol y la importancia de las colecciones microbianas. En suma, constituirá una excelente oportunidad para la difusión de las actividades académicas y productivas vinculadas al control biológico en Uruguay y la región.

La organización del taller ha sido responsabilidad del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), y la Universidad de la República (UDELAR), contando con el apoyo del Proyecto Cooperativo para el Desarrollo Tecnológico Agroalimentario y Agroindustrial del Cono Sur (PROCISUR), a través de la Plataforma de Recursos Genéticos (REGENSUR), y de la Sociedad Uruguaya de Fitopatología (SUFIT).

Comité Organizador

Agenda IV Taller de Agentes Microbianos de Control Biológico - limitantes - oportunidades - desafíos -

- 8:00 – 8:30 **Registro**
- 8:30 – 8:45 **Apertura y bienvenida.**
Dra. Nora Altier – Comité Organizador
- 8:45 – 9:30 **Conferencia:** Control biológico de insectos plaga, estado del arte y perspectivas.
Dr. Daniel Sosa Gómez. Embrapa (Soja), Brasil.
- 9:30 – 10:15 **Conferencia:** Diversidad y uso potencial de hongos del género Trichoderma para la innovación tecnológica en la agricultura.
Dra. Sueli Correa Marques de Mello. Embrapa (Recursos Genéticos y Biotecnología), Brasil.
- 10:15 – 10:30 Café
- 10:30 – 11:15 **Conferencia:** Uso de endófitos como estrategia de biocontrol.
Dr. Trevor Jackson AgResearch, Nueva Zelandia.
- 11:15 – 12:00 **Conferencia:** Control biológico en Chile: INIA y la experiencia como Autoridad de Depósito Internacional para microorganismos de uso agronómico (Banco de Recursos Genéticos Microbianos).
Dr. Andrés France INIA Quilamapu, Chile.
- 12:00 – 13:30 **Presentación de posters**
Almuerzo
- 13:30 – 14:50 **Módulos**
- 13:30 – 13:50 Situación actual de las colecciones microbianas en Uruguay.
Dra. Lylia Loperena, UdelaR
- 13:50 – 14:10 Marco Normativo y Registro de productos biológicos.
Lic. Bioq. Karina Punschke, DGSSAA/MGAP
- 14:10 – 14:30 Estrategias de protección de la Propiedad Intelectual.
Dra. Andrea Barrios, Fac. Química UdelaR
- 14:30 – 14:50 Desarrollo comercial de productos de control biológico.
Ing. Agr. Claudine Folch, Lage y Cía.
- 14:50 – 15:10 Café
- 15:10 – 16:30 **Discusión** plenaria de módulos
- 16:30 – 17:30 **Presentación del libro** “Control Biológico de enfermedades de plantas en América Latina y el Caribe”.
Dr. Pedro Mondino.

Entrega de premios

Cierre de la jornada

Tabla de Contenido

PRESENTACIONES ORALES

Control biológico de insectos plaga, estado del arte y perspectivas	3
Daniel R. Sosa-Gómez	
Diversidad y uso potencial de hongos del género <i>Trichoderma</i> para la innovación tecnológica en la agricultura	4
Sueli Corrêa Marques de Mello	
Uso de endófitos como estrategia de biocontrol	5
Trevor Jackson y Federico Rivas	
Control biológico en Chile: INIA y la experiencia como Autoridad de Depósito Internacional para microorganismos de uso agronómico (Banco de Recursos Genéticos Microbianos)	6
Andrés France	
Situación de las colecciones de Microorganismos en Uruguay	7
Lyliam Loperena	
Marco normativo y registro de productos para biocontrol de enfermedades y plagas agrícolas en Uruguay	8
Karina Punschke	
Estrategias de protección del conocimiento: Propiedad Intelectual	9
Andrea Barrios	
Desarrollo comercial de productos de control biológico	10
El ejemplo del LECAFOL	10
Claudine Folch	

TRABAJOS ORIGINALES

Caracterización de bacterias y hongos entomopatógenos aislados de tucuras (Orthoptera) en Uruguay	13
Abreo E., Rivas F., Zerbino S., Altier N.	
Compatibilidad de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium</i> sp. con hormiguicidas comerciales.....	14
Corallo B., Lupo S., Tiscornia S., Galvalisi U., Ruiz R., Bettucci L.	
Aislamiento y caracterización de cepas nativas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	15
García Pintos A., Scioscia N., Sanguinetti C., Betancor L., Cabezas A.	
Bacterias asociadas a plantas nativas antárticas: caracterización de su actividad promotora del crecimiento vegetal	16
Lagurara P., Tuja S., Fernández Garello P., Braga L., Senatore D., Zabaleta M., Yanes M.L., Vaz P., Azziz G., Bajsa N.	
Desarrollo de bioinsecticidas (hongos entomopatógenos) para el control de la chinche del eucalipto <i>Thaumastocoris peregrinus</i> Proyecto INIA FO18, Plan Estratégico Institucional 2011-2015.....	17
Simeto S., Lupo S., Bettucci L., Corallo B., Gómez D., González P., Torres D., Martínez G., Abreo E., Rivas F., Altier N.	
Efecto de la inoculación de la cepa <i>Pseudomonas fluorescens</i> C119 en el rendimiento de la alfalfa y en la estructura de la comunidad bacteriana de la rizósfera	18
Yanes M.L., Braga L., Altier N., Arias A.	

TRABAJOS YA PRESENTADOS

Virulence of fungal spores produced in liquid and solid state media on nymphs of <i>Trialeurodes vaporariorum</i>	21
Abreo E., Altier N.	
Aislamiento y caracterización de cepas nativas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	22
Giannone N., Federici M. T.*, Rivas F.	
Evaluación de crecimiento, sanidad y resistencia a heladas de tres híbridos de <i>Eucalyptus grandis</i> con aplicación de bio estimulantes, <i>Trichoderma harzianum</i> (Trichosoil®) y Quitosano (Biorend®), en plantación	23
Romero G., Rodríguez D., Olivera Costa V.	
Cropping history effects on pathogen-suppressive activity of indigenous soilborne <i>Streptomyces</i> communities	24
Vaz P., Altier N., Pérez C.A., Kinkel L.L.	
Impacts of crop rotation on disease-suppressive <i>Trichoderma</i> and <i>Streptomyces</i> densities. ...	25
Villar H.A., Vaz P., Kinkel L., Perez C.A., Altier N.A.	

PRESENTACIONES ORALES

Control biológico de insectos plaga, estado del arte y perspectivas

Daniel R. Sosa-Gómez

Embrapa Soja, Cx.P. 231, Londrina, CEP 86001-970, PR, Brasil.
daniel.sosa-gomez@embrapa.br

Los agentes de control biológico representan alternativas importantes en los programas de manejo integrado de plagas. Plagas que presentan elevada plasticidad, alta tolerancia a insecticidas y que evolucionan para resultar en fenotipos resistentes a estos productos, pueden ser manejadas con éxito utilizando agentes microbianos. Por ejemplo, actualmente, poblaciones de *Helicoverpa armigera* que alcanzan niveles de control en regiones productoras de bajas latitudes, son controladas mediante la aplicación de virus de poliedrosis nuclear y formulaciones de *Bacillus thuringiensis*. Estos agentes son alternativas interesantes para retardar la evolución de poblaciones resistentes a amidas, fosforados, carbamatos, piretroides y plantas transgénicas. Entretanto, algunas plagas de importancia agrícola, hasta el presente no cuentan con agentes microbianos eficientes para su control, como es el caso de la oruga falsa medidora, *Chrysodeixis includens*, cuyas cepas de virus no poseen elevada virulencia y de la misma manera, no existen cepas comerciales de *B. thuringiensis* con actividad biológica elevada contra esta especie. Entre los programas de control microbiano aplicados en América Latina, actuales y de éxito, constan el control de la oruga del álamo, *Condylorrhiza vestigialis*, el control de la oruga del viejo mundo, *H. armigera*, el control del gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda*. El programa de control de la oruga de las leguminosas con AgMNPV, ampliamente utilizado en Brasil hasta 2005, actualmente está restringido a un área menor de 150.000 ha, debido a la prevalencia generalizada de *C. includens* y al ingreso en el mercado de soja que expresa la proteína Cry1Ac, con elevada actividad contra *A. gemmatalis*. Entre los entomopatógenos modificados genéticamente, los que presentan mayor potencial para ser utilizados en plagas comunes a los países de América del Sur son: (1) el virus AgMNPV, en el que el gen *egt* fue retirado (denominado vAgEGT D-lacZ) para aumentar su virulencia, (2) virus en los que fue insertado el gen de la toxina del escorpión *Androctonus australis*, como es el caso del virus de *H. armigera* (HaSNPV-AaIT), y (3) virus en los que fueron insertados genes de catepsina y quitinasa, como es el caso del virus de la oruga de la soja (denominado vAgp2100Cf.chiA/v-cath). En el caso de hongos entomopatógenos, las transformaciones han sido focalizadas en el realce de la tolerancia a funguicidas, termotolerancia y aumento de la virulencia, si bien todas estas líneas de investigación han sido desarrolladas en países ajenos a América del Sur. Los avances obtenidos en el campo de la transformación genética de microorganismos entomopatógenos no han sido acompañados por la aplicación práctica de estos agentes a campo. Principalmente, por la dificultad de su registro y retención de los órganos reguladores para su liberación. Por lo tanto, las perspectivas futuras de aplicación de estos agentes dependen de los estudios de bioseguridad, de impacto ambiental y registro.

Diversidad y uso potencial de hongos del género *Trichoderma* para la innovación tecnológica en la agricultura

Sueli Corrêa Marques de Mello

Embrapa Recursos Genéticos y Biotecnología – CENARGEN, Brasil. sueli.mello@embrapa.br

El aumento significativo de la producción agrícola en las últimas décadas, junto con el uso intensivo de pesticidas para el control de diversas enfermedades, plagas y malezas de los cultivos ha causado una creciente preocupación social por los daños causados por este tipo de productos pesticidas al medio ambiente, sobre todo ante la evidencia de contaminación de los productos agrícolas. La principal ventaja del control biológico es, precisamente, por evitar la interrupción del equilibrio ecológico, la protección de la salud de los agricultores, los trabajadores y sus familias. Búsquedas recientes en sitios web dan cuenta de más de 130 productos a base de microorganismos en el mercado global. Entre estos microorganismos se pueden citar: *Ampelomyces quisqualis*, *Aspergillus flavus*, *Arthrobotrys* sp., *Clonostachys rosea*, *Gliocladium* spp., *Conyothyrium minitans*, *Hasfordia pulvianta*, *Paecilomyces* spp., *Pochonia*, *Trichoderma* spp., *Pythium oligandrum*, *Agrobacterium radiobacter* y *Bacillus* spp., entre otras bacterias y levaduras. Los hongos del género *Trichoderma* se encuentran entre los agentes de biocontrol más estudiados y pueden ser aplicados a las semillas, el suelo, sustrato o mediante la fumigación aérea. Varias especies de este género poseen características peculiares que son fundamentales no sólo para la actividad de control biológico en condiciones naturales, sino también por la multifuncionalidad ejercida principalmente en el suelo. Vale la pena mencionar que muchas cepas de *Trichoderma* son naturalmente tolerantes a los pesticidas, gracias a la capacidad de degradar estos productos, lo que hace que estos hongos cuando son liberados en masa en el medio ambiente, también actúan como biorremediadores, contribuyendo a la recuperación de suelos contaminados. Con el arsenal de técnicas modernas disponibles en la actualidad, la integración de las características moleculares, proteómicas y fisiológicas basadas en pruebas realizadas in vitro e in vivo, es una forma segura para caracterizar y seleccionar cepas de *Trichoderma* potencialmente útiles. La valoración de cepas de *Trichoderma* spp. mantenidas en colecciones de cultivos, y la determinación de sus características para orientar la utilización potencial en el control biológico, en la promoción del crecimiento vegetal y en otras aplicaciones, son el tema que se abordará en esta conferencia.

Uso de endófitos como estrategia de biocontrol

Trevor Jackson ¹ y Federico Rivas ²

¹ AgResearch, Lincoln, New Zealand (trevor.jackson@agresearch.co.nz)

² BioProtection Research Centre, Lincoln University, New Zealand; INIA, Las Brujas, Uruguay

Los microorganismos endófitos son hongos y bacterias que se encuentran y desarrollan en los tejidos vegetales. Estos pueden brindar efectos benéficos a la planta sin generar una respuesta de defensa en la misma. Varios endófitos se destacan por su capacidad de controlar plagas vegetales y fitopatógenos; sin embargo, el desafío es cómo usar esta asociación planta-microorganismo para la protección vegetal. El género *Neotyphodium* es uno de los hongos endófitos de pasturas mejor caracterizado y tiene capacidad de otorgar resistencia contra insectos. Las hifas de este hongo crecen por el tejido vascular produciendo a la vez varios tipos de alcaloides que afectan negativamente a animales herbívoros. Sin embargo, mediante una adecuada selección de endófitos, la producción de toxinas que afectan a los mamíferos puede ser reducida, mientras que las toxinas que afectan a los insectos maximizadas. Las hifas de *Neotyphodium* se extienden por el tallo, desde el cuello de la planta hasta los tejidos aéreos, colonizando las flores en desarrollo y por tanto garantizando su propagación a través de las semillas (transmisión vertical). Esta peculiar característica permite que los beneficios de la asociación hongo-planta sea fácilmente accesible a los productores por la multiplicación y comercialización de semillas obtenidas a partir de gramíneas forrajeras que portan estos endófitos. Por el contrario, para aquellos endófitos que ingresan a la planta atravesando los tejidos vegetales desde el ambiente externo (transmisión horizontal) se han desarrollado estrategias diferentes. En estos casos, suspensiones acuosas microbianas pueden ser absorbidas sobre la semilla, colonizando luego la planta al momento de la germinación. El empleo de coberturas para semilla en gel, arcilla o en sustratos orgánicos que contienen microorganismos benéficos es otra alternativa que asegura la colonización de las raíces en desarrollo. De hecho, esta práctica es comúnmente empleada para la inoculación de leguminosas con bacterias simbióticas del tipo rizobios, o también para la aplicación de endófitos para el control de enfermedades y plagas vegetales. Otra ventaja es que las semillas tratadas con microorganismos benéficos pueden ser sembradas con la maquinaria convencional que dispone el productor y por tanto se reducen los problemas asociados con su aplicación a campo. En otros casos, como con las micorrizas arbusculares, los microorganismos son formulados en gránulos que posteriormente son aplicados en la proximidad de las raíces. A su vez, varios tipos de hortalizas, árboles frutales y forestales en viveros son tratados eficientemente con altas concentraciones de microorganismos endofíticos con capacidad biocontroladora. Esta estrategia permite la colonización endofítica temprana de las plantas previo a su trasplante al campo. Por ejemplo, el tratamiento de explantes de banana con *Trichoderma* redujo la incidencia del marchitamiento provocado por *Fusarium* en este cultivo. *Trichoderma* también es usada para colonizar la madera de tarugos que luego son introducidos en árboles en pie para controlar fitopatógenos. Por último, algunos microorganismos pueden ser incluso aplicados como suspensiones foliares lográndose la colonización endofítica y la resistencia contra insectos herbívoros, enfermedades e incluso estrés abiótico. Los endófitos son una herramienta importante para la protección vegetal, pero su uso depende de los tipos de transmisión, vertical u horizontal, su habilidad para diseminarse y persistir en los tejidos vegetales, así como de ejercer la actividad antagonista apropiada. Por estos motivos, diferentes estrategias son necesarias para efectivizar la asociación planta-endófito y reducir los problemas asociados con la aplicación de estos microorganismos benéficos para la protección de las plantas en la agricultura.

Control biológico en Chile: INIA y la experiencia como Autoridad de Depósito Internacional para microorganismos de uso agronómico (Banco de Recursos Genéticos Microbianos)

Andrés France

Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA, Chile. afrance@inia.cl

El control biológico en Chile se inicia en 1903 con la introducción del insecto *Rodolia cardinalis* para el control de la conchuela del olivo. El uso de microorganismos de control biológico es más reciente y data del año 1956, cuando se produce la introducción de un nemátodo entomopatógeno para el control de larvas de coleópteros en siembras de trigo. En 1980 se introduce una especie de roya para el control de zarzamora, marcando el primer uso de microorganismos para el control biológico de malezas. En 1996 se inicia el Programa de Patología de Insectos en INIA, la que define el uso de la microflora nativa para la búsqueda de organismos de control biológico de plagas agrícolas. Chile posee una geografía particular, cubriendo 4.500 km de longitud, lo que permite tener la mayoría de los tipos de climas y una gran biodiversidad asociada, lo que también se traduce en los recursos genéticos microbianos. En consecuencia, se vuelve fundamental la colecta, identificación, estudio y conservación de los microorganismos, actividades que se han desarrollado a través del banco microbiano denominado: Colección Chilena de Recursos Genéticos Microbianos (CChRGM), y cuyas funciones son: conservar, caracterizar e identificar los microorganismos, sus genes y productos del metabolismo; disminuir la pérdida acelerada de especies; facilitar el intercambio de cepas con otros bancos microbianos o centros de investigación; ser un reservorio de cepas con estándares internacionales de conservación, y evitar las pérdidas o cambios genéticos que experimentan las cepas cuando no se conservan en forma apropiada. Este banco de recursos microbianos público, adquiere el 2012 el reconocimiento por parte de la Organización Internacional de la propiedad Intelectual (WIPO) de Autoridad Internacional de Depósito (IDA), con lo cual se adhiere a los acuerdos de las normas del Tratado de Budapest, permitiendo el depósito de microorganismos para fines de procedimiento de patentes y que deben conservarse por al menos 30 años. Desde 1996, la CChRGM ha aportado microorganismos para el control biológico de más de 20 plagas de insectos y 15 enfermedades de importancia agrícola, todos provenientes de la microflora nativa, generando una colección que protege el recurso genético microbiano para futuras investigaciones y entregando un aporte a la agricultura Chilena en el tema de insumos biotecnológicos.

Situación de las colecciones de Microorganismos en Uruguay

Lyliam Loperena

Departamento de Bioingeniería, Instituto de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Julio Herrera y Reissig 565, Montevideo, 11300, Uruguay. e-mail: lillianl@fing.edu.uy

Las colecciones de cultivos son servicios dedicados a apoyar una amplia variedad de trabajos microbiológicos y pueden tener carácter privado o personal, institucional o de referencia y ser nacionales o comerciales. Aunque existen notables diferencias en cuanto a los recursos materiales y humanos de que disponen, todas coinciden en el hecho de implementar esquemas de calidad que les permitan operar bajo un estándar que acredite su gestión acorde a normativas de seguridad y calidad. Ellas operan como bibliotecas que protegen material viviente, requieren de una plataforma estable y segura a largo plazo con vistas a proveer un servicio sostenible. Dentro de sus principales funciones están las de: actuar como depositarios de microorganismos con importancia potencial; custodiar y proveer las herramientas vivientes que se emplean en la docencia, en la investigación, en la biotecnología, en los esquemas de certificaciones de calidad y proveer servicios de depósitos y de patentes seguros y confidenciales.

A lo largo de décadas instituciones científicas de todo el mundo han logrado construir y mantener valiosas colecciones de cultivo que representan un recurso genético de incalculable valor para diferentes campos de la actividad científica y sus aplicaciones: en salud animal y vegetal, en la producción de alimentos y medicamentos, así como en la conservación del medio ambiente. Ejemplo de ello es la Federación Internacional de Colecciones de Cultivo, red global para la preservación ex situ de la diversidad microbiana que cuenta con 661 colecciones miembros y conserva 2.399.496 microorganismos. En la región, la Federación Latinoamericana de Colecciones de Cultivos se ha ocupado de promover la organización de colecciones públicas y privadas de países de la región, contando con 51 colecciones miembros que mantienen más de 53722 cultivos.

En Uruguay existen un número significativo de colecciones de bacterias, hongos, virus y líneas celulares de interés científico, productivo y de servicio, que conservan más de 10000 cepas (al año 2010). El estado de desarrollo de las colecciones es variado, desde colecciones que se inician hasta colecciones con 40 y más años de existencia. Entre ellas se encuentran colecciones institucionales de larga data que brindan servicios y decenas de colecciones mantenidas en centros de investigación y unidades académicas. La mayoría de estas colecciones son mantenidas y administradas en forma individual por laboratorios y grupos de investigación y no existe a nivel país un conocimiento sistematizado sobre el número de ellas, su ubicación, el tipo de organismos que reúnen, sus objetivos, su potencial, así como sobre los recursos humanos y económicos con que cuentan. Por lo cual surge la necesidad de realizar un relevamiento y documentación de las colecciones existentes en el país y de impulsar acciones de coordinación para compartir experiencias, conocimientos y esfuerzos que conduzcan a mejorar la infraestructura y gestión de las mismas así como a la formación y capacitación continua de sus recursos humanos.

Marco normativo y registro de productos para biocontrol de enfermedades y plagas agrícolas en Uruguay

Karina Punschke

Departamento de Agentes Biológicos. División Control de Insumos. Dirección General de Servicios Agrícolas (DGSSAA)-MGAP-Uruguay. kpunschke@mgap.gub.uy

La mayor parte de los problemas fitosanitarios son causados por organismos (virus, hongos, insectos o bacterias) que colonizan la planta, provocando la disminución de la calidad del producto hasta la pérdida total de la planta. La incorporación de bioplaguicidas a los sistemas de producción implica reducir el uso de plaguicidas químicos y ofrecer alimentos seguros. Baker y Cook (1974) definen al control biológico (CB) como: “reducción de la densidad del inóculo o de las actividades productoras de enfermedad de un patógeno o parásito, en su estado activo o durmiente, mediante uno o a más organismos, lograda de manera natural o a través de la manipulación del ambiente del hospedador o del antagonista o por la introducción masiva de uno o más antagonistas”. Más recientemente, Pal y McSpadden (2006) lo definen como la “utilización de organismos residentes o introducidos en un patosistema para suprimir las actividades o las poblaciones de patógenos”. Si bien el CB presenta ventajas (ubicuidad, seguridad ecológica, preservación del equilibrio natural, compatibilidad con la agricultura), es necesario evaluar los riesgos potenciales debidos a la introducción de un enemigo natural y que utilice huéspedes alternativos no-blanco. Además, a pesar de que el CB se basa en el uso de organismos considerados inocuos, es necesario tomar medidas de seguridad y protección al momento de su formulación y aplicación. La DGSSAA realiza el registro de los productos formulados a base de microorganismos y entomófagos para el control de plagas y enfermedades agrícolas, autorizando la fabricación, formulación, liberación, comercialización y utilización de dicho producto, previo análisis de riesgo y evaluación de datos científicos que demuestren que es eficaz para el fin que se destina y no entraña riesgos indebidos para la salud humana, animal o vegetal y/o el medio ambiente. El marco normativo vigente para el registro de agentes controladores biológicos de uso agrícola abarca:

- Decreto 170/007
- Resolución 688/2013. Registro y control de productos formulados con Agentes de Control Biológico Microbianos para uso agrícola.
- Resolución 220/2014. Registro de productos que incluyan ENTOMÓFAGOS utilizados como ACB para plagas agrícolas.

La DGSSAA autoriza el registro de productos extranjeros procedentes de países que los tienen registrados y autorizados para su uso interno, y el Departamento de Cuarentena Vegetal emite una autorización fitosanitaria de ingreso (AFIDI) que acompaña a la solicitud de registro. Las evaluaciones nacionales de eficiencia agronómica en invernáculo y campo para productos sin antecedente de uso en el país, deberán verificar lo declarado y estarán sujetas a supervisión oficial. El protocolo de ensayos incluirá: descripción del diseño experimental, tratamientos, localidades, zafas agrícolas y parámetros a evaluar. Para productos con antecedentes de uso en el país, la DGSSAA validará la información de resultados con valor estadístico.

Estrategias de protección del conocimiento: Propiedad Intelectual

Andrea Barrios

Universidad de la República – Facultad de Química
Derecho Farmacéutico y Propiedad Intelectual
abarrios@fq.edu.uy

En el mundo actual, la competitividad de las empresas en cualquier mercado depende en una gran medida de su capacidad de innovar. Por innovación entendemos no solo la capacidad de introducir productos y/o servicios nuevos al mercado sino de modificar los existentes, así como de generar nuevas necesidades en los consumidores.

En cualquier estrategia de competitividad que elija una empresa, el cambio tecnológico requiere que ésta deba introducir conocimiento en su producción de bienes o servicios, ya sea adquiriéndolo de terceros, imitando aquél que esté disponible, o generándolo. Y en este sentido todos los mecanismos de transferencia de tecnología –sean éstos formales o informales- juegan un rol importante en este proceso de incorporación de conocimiento a los procesos productivos.

Tan importante como el proceso de incorporación de conocimiento, es la necesidad de las empresas de diferenciarse de sus competidores y fidelizar su clientela. Tanto el conocimiento como los signos distintivos desarrollados que forman parte de la estrategia de competitividad de una empresa son creaciones intelectuales.

Todas estas creaciones intelectuales presentan las mismas características que tradicionalmente han identificado a los bienes públicos, esto es, son bienes no excluyentes mediante el precio y de consumo no rival. Esto significa que el uso de estas creaciones intelectuales por su titular- no priva a los terceros de su uso en forma simultánea.

Los Derechos de Propiedad Intelectual surgen como una solución del sistema jurídico a la falta de rivalidad del conocimiento como un bien, en tanto confieren al titular el derecho de exclusión de los terceros en el uso de estos bienes intangibles. Esto implica la constitución de una especie de monopolio temporal y territorial en relación a esas creaciones intelectuales.

Sin embargo, la relación entre la innovación y el patentamiento no es lineal ni determinista ya que las patentes no son el único mecanismo de apropiabilidad de las rentas derivadas de la innovación. De acuerdo a las características del proceso de innovación y de la estructura del mercado las empresas utilizan diferentes combinaciones de los mecanismos de apropiabilidad.

En general la Propiedad Intelectual, en particular las marcas es uno de los instrumentos más utilizado entre las pymes en los países de la región, en tanto las patentes y las medidas tecnológicas desempeñan un papel más importante en las empresas de mayor tamaño. Sin embargo, el secreto industrial y las ventajas temporales siguen siendo los mecanismos de apropiabilidad más utilizados. Y en general, las estrategias de protección de los activos intangibles de una empresa resultan de la combinación de varios de los instrumentos disponibles entre ellos –la Propiedad Intelectual-.

Desarrollo comercial de productos de control biológico El ejemplo del LECAFOL

Claudine Folch

Lage y Cía S.A. E-mail: cfolch@lageycia.com

En el desarrollo de un producto comercial con un agente microbiano de control biológico se transitan varias etapas. Partiendo de un microorganismo bien caracterizado morfológica y molecularmente, hay que determinar las condiciones óptimas de crecimiento, qué organismos controla, cómo ejerce el control y qué condiciones necesita para que ese control se exprese en el campo. Debe ser un microorganismo que se pueda multiplicar con facilidad y hay que encontrar una forma de producción a gran escala que sea económicamente viable. Por último, para considerar que el agente en cuestión puede transformarse en un producto comercial, hay que desarrollar una formulación que lo proteja del ambiente, aumente su vida útil para permitir la comercialización y facilite la aplicación en el campo. Se deben establecer las mejores condiciones de almacenamiento y los controles de calidad a realizar durante todo el proceso de producción, desde el microorganismo al formulado. Con la formulación hay que hacer ensayos de campo para determinar la forma y momento de aplicación y cómo se puede incluir en un sistema de manejo integrado. También hay que determinar la compatibilidad con otros productos que se usen en el cultivo. Finalmente se llega a la etapa de registro ante las autoridades competentes. La comercialización de un producto biológico debe considerarse parte del desarrollo dadas las particularidades que presenta para el distribuidor y el usuario final. El ejemplo del LECAFOL: El microorganismo, el hongo entomopatógeno *Lecanicillium lecanii*, fue aislado durante la ejecución de una Tesis de Doctorado en el marco de un FPTA de INIA. En ese trabajo de tesis se estudió su patogenicidad frente a la mosca blanca (*Trialeurodes vaporariorum*), las condiciones de crecimiento y la factibilidad de aplicarlo en campo. Al ver el potencial del entomopatógeno se firmó un Convenio de Vinculación entre INIA y la empresa Lage y Cía S.A. para el desarrollo de un producto comercial. Durante este convenio se realizó el escalado de la producción, se implementaron ensayos de campo en cultivo de tomate protegido para determinar las condiciones en las que se obtienen los mejores resultados e implementar una alternativa de manejo integrado incorporando el agente de control biológico a las medidas de control que realiza el productor. También se desarrolló una formulación en polvo mojable, se validó la eficacia del formulado en el campo y se estudió su compatibilidad con otros productos que puedan utilizarse en el cultivo. En 2012, ya con una normativa vigente, se presentó ante la Dirección General de Servicios Agrícolas del MGAP, el producto LECAFOL para solicitar la obtención de un co-registro de INIA y Lage y Cía. Fue aprobado en 2013 con el N°4209. Actualmente se busca introducir el producto en el mercado brindando apoyo permanente al usuario final.

TRABAJOS ORIGINALES

Caracterización de bacterias y hongos entomopatógenos aislados de tucuras (Orthoptera) en Uruguay

Abreo E., Rivas F., Zerbino S., Altier N.

Laboratorio de Bioproducción, Plataforma de Bioinsumos, INIA Las Brujas. eabreo@inia.org.uy

Se obtuvieron aislamientos de bacterias y hongos a partir de tucuras colectadas en 2011 y 2012 en distintas zonas agrícolas de Uruguay. Los aislamientos fueron inicialmente caracterizados fenotípicamente y luego genéticamente para identificar géneros de conocida actividad como entomopatógenos. Entre las bacterias, se buscó aislar e identificar bacterias Gram + con producción de endosporas (*Bacillus thuringiensis* y otras especies relacionadas) y también bacterias Gram – de los géneros *Serratia*, *Yersinia* y *Enterobacter*. Entre las especies fúngicas la búsqueda se orientó a la identificación de especies de *Beauveria*, *Metarhizium*, *Lecanicillium* e *Isaria*.

La caracterización fenotípica permitió identificar *Serratia marcescens*, *S. ureilytica*, *Bacillus cereus* sensu lato, *Enterobacter cloacae*, *Beauveria* sp. y *Talaromyces* sp. El análisis filogenético de bacterias basado en las secuencias del gen 16S del ADNr y del gen GyrB permitió confirmar la identificación de las especies *B. thuringiensis*, *B. aryabhatai*, *B. pumilus* y *Lysinibacillus sinduriensis*. El análisis filogenético de los hongos basado en la región ITS incluyendo la subunidad 5.8S del ADNr y el gen que codifica el factor de elongación 1 alfa permitió la identificación de *Beauveria bassiana* y *Talaromyces pinophilus*. La caracterización de la virulencia de los aislamientos completará la información necesaria para valorizar la colección obtenida.

Compatibilidad de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium* sp. con hormiguicidas comerciales

Corallo B., Lupo S., Tiscornia S., Galvalisi U., Ruiz R., Bettucci L.

Laboratorio de Micología, Facultad de Ciencias/Facultad de Ingeniería, Universidad de la República, Uruguay. bettucci@fing.edu.uy

La utilización de productos químicos en el ámbito agroindustrial tiene efectos negativos desde el punto de vista ecológico-ambiental, a la vez que posee un elevado costo. En los últimos años se ha promovido la utilización de agentes de control biológico como una alternativa viable. En Uruguay las hormigas cortadoras, pertenecientes al género *Acromyrmex*, generan grandes daños en la producción hortícola-frutícola y forestal. Los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* han sido eficientemente utilizados como agentes de control biológico de varios insectos, incluyendo las hormigas cortadoras. El objetivo del trabajo fue evaluar el uso combinado de insecticidas (fipronil y sulfuramida) y hongos entomopatógenos para el control de hormigas cortadoras. Se evaluó el efecto de los insecticidas sobre la capacidad de germinación de las esporas de *Metarhizium* sp. y *Beauveria bassiana*. El efecto del fipronil se evaluó mediante la incorporación al medio de cultivo agar-malta de distintas concentraciones de fipronil (50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 1000 ppm). El efecto de sulfuramida se evaluó mediante la incorporación al medio agar-malta de 90, 180, 360, 720 y 1500 ppm del principio activo disuelto en acetona. En cada caso se plaqueó una suspensión de esporas (105 esporas/mL) de cada entomopatógeno y a las 24 hs se determinó el porcentaje de esporas germinadas. Se realizaron 5 réplicas y el control sin producto. También se evaluó la germinación de las esporas expuestas a distintas concentraciones de una solución de agua y fipronil. Para ello se suspendieron esporas en 300 ml de agua con fipronil a las distintas concentraciones. Luego de transcurridos 1, 7 y 15 días se plaqueó un mL de cada suspensión y se calculó el porcentaje de esporas germinadas a las 24 hs. Las distintas concentraciones de fipronil incluídas en el medio de cultivo agar-malta (2%) no afectaron esencialmente la germinación de los conidios aún a concentraciones superiores a las presentes en el cebo comercial. En el caso de la sulfuramida, las distintas concentraciones afectaron la germinación de los conidios en forma diferencial siendo *Metarhizium* sensible y *Beauveria* resistente al compuesto. En agua/fipronil no se redujo la germinación de los conidios de ninguno de los dos hongos. Estos resultados muestran que podría aplicarse un hormiguicida junto con agentes de control biológico con la finalidad de reducir la cantidad de hormiguicida aplicado. Las evaluaciones a campo de la aplicación combinada se están procesando.

Aislamiento y caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*

García Pintos A.^{1,2}, Scioscia N.¹, Sanguinetti C.¹, Betancor L.¹, Cabezas A.¹

¹ Departamento de Biotecnología, Universidad ORT Uruguay, Montevideo, Uruguay

² Lage y Cía. S.A. agarciapintos@lageycia.com

En la última década el sector agropecuario de nuestro país ha experimentado un crecimiento exponencial con un concomitante incremento en la utilización de insecticidas químicos para el control de plagas. El uso no racional de éstos ha causado serios problemas, tanto ambientales como en la salud humana. Por lo tanto, la necesidad de contar con alternativas que permitan el control de plagas y sean amigables con el medio ambiente es de gran importancia. *Bacillus thuringiensis* (Bt) es una de las principales bacterias utilizadas como alternativas al uso de insecticidas químicos, especialmente por su capacidad de producir cristales proteicos entomopatogénicos. La identificación de Bt utilizando el gen que codifica para el ARNr 16S no es posible debido a la alta similitud de dicha secuencia con las de otras especies pertenecientes al grupo de *Bacillus cereus sensu lato*. En el presente trabajo desarrollamos un método de screening rápido para la identificación de Bt basado en la amplificación con tres sets de *primers* descritos previamente (Noguera e Ibarra, 2010), los cuales detectan el 100% de los genes *cry* conocidos hasta el momento. Los aislamientos con resultados positivos se caracterizaron a partir de los perfiles REP (Repetitive Extragenic Palindromic Sequence), contenido en genes *cry* y finalmente por su perfil proteico. *Colony* PCR fue llevada a cabo para 30 aislamientos con los tres sets de *primers*. Ocho de éstos amplificaron con al menos unos de los sets de *primers*. Luego del estudio de la secuencia del gen de ARNr 16S, tres fueron descartados como miembros del grupo de *Bacillus cereus sensu lato*, indicando la presencia de resultados falsos positivos con la utilización del set de *primers* 3. REP-PCR fue realizada para cinco aislamientos y dos controles positivos, *Bacillus thuringiensis serovar israelensis* (Bti) y *Bacillus thuringiensis serovar kurstaki* (Btk). Se observaron tres perfiles diferentes entre los aislamientos estudiados. Los genes *cry* 1, 2, 3, 9 y 11 no estaban presentes en nuestros aislamientos y por lo tanto se está evaluando la presencia de otros genes *cry*. El análisis de proteínas solubles mostró patrones únicos para los aislamientos, donde dos de ellos presentaron igual perfil, el cual difiere del mostrado por Bti y Btk. Las principales bandas observadas en los perfiles de las cepas de referencia mostraron correspondencia con los reportados previamente. Nuestros resultados demostraron que el perfil proteico cambia antes y después de la esporulación. Análisis en microscopio óptico de contraste de fases mostraron que los dos aislamientos nativos contenían cristales proteicos esféricos. En conclusión, fuimos capaces de identificar dos cepas de *Bacillus thuringiensis* mediante un método rápido de *screening*, las cuales no contienen genes *cry* 1, 2, 4, 9 y 11.

Bacterias asociadas a plantas nativas antárticas: caracterización de su actividad promotora del crecimiento vegetal

Lagurara P.^{1*}, Tuja S.¹, Fernández Garelo P.¹, Braga L.¹, Senatore D.¹, Zabaleta M.², Yanes M.L.¹, Vaz P.¹, Azziz G.², Bajsa N.¹

¹ Laboratorio de Ecología Microbiana - Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE).

² Plataforma Verde - IIBCE.

³ Laboratorio de Microbiología, Facultad de Agronomía - UDELAR. plagurara@iibce.edu.uy

La Antártida posee uno de los ambientes terrestres más severos, caracterizado por bajas temperaturas y falta de agua líquida, que limita la abundancia y actividad de organismos terrestres. La vegetación terrestre nativa de la Antártida marítima incluye dos especies de plantas vasculares: *Colobanthus quitensis* (clavel antártico) y *Deschampsia antarctica* (pasto antártico). Dadas las condiciones ambientales adversas, es probable que estas plantas presenten asociaciones con microorganismos que favorezcan su crecimiento. El objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar bacterias promotoras del crecimiento vegetal a partir de rizósfera de clavel y pasto antárticos, así como también mantener bajo condiciones controladas algunos ejemplares de estas plantas.

Se colectaron plantas en varios sitios de la Isla Rey Jorge (Archipiélago Shetland del Sur) en los veranos de 2012 y 2013. A partir de raíces, utilizando medios semiselectivos e incubando a 4°C y 25°C, se aislaron *Pseudomonas* fluorescentes (King's B), actinobacterias (almidón-caseína), bacterias heterótrofas (tripticasa-soja) y hongos filamentosos (agar malta). Se evaluó su capacidad celulolítica (carboximetil celulosa), proteolítica (medio con leche descremada), de producción de sideróforos (CAS), solubilización de fosfato (NBRIP), producción de biosurfactantes (ensayo de la gota) y producción de ácido indolacético (AIA).

De 24 muestras de pasto y 25 de clavel se obtuvieron 847 aislamientos de heterótrofos, 803 de *Pseudomonas* fluorescentes, 146 de actinobacterias y 15 de hongos filamentosos. El grupo de actinobacterias fue el que presentó mayor cantidad de aislamientos con actividad celulolítica (59%), productores de AIA (52%) y antagonistas (46%); menos del 10% fue capaz de producir sideróforos o solubilizar fosfato, y sólo el 20% produjo surfactantes. El 39% de las bacterias heterótrofas presentaron actividad proteolítica, 37% solubilizadora de fosfato y un 44% de productora de sideróforos. En el grupo de las *Pseudomonas* fluorescentes se obtuvo la mayor cantidad de aislamientos positivos para las actividades ensayadas (100% sideróforos, 73% proteasas y 70% de solubilización de fosfato), pero hubo baja producción de AIA. Considerando los aislamientos evaluados hasta el momento, no se observaron diferencias en los resultados considerando la temperatura utilizada para el aislamiento (25°C o 4°C). Se encontró un mayor porcentaje de actinobacterias y heterótrofos productores de sideróforos aislados de clavel, mientras que los heterótrofos productores de proteasas fueron más abundantes en pasto. Aquellos aislamientos que resulten de interés serán identificados filogenéticamente y se evaluará su actividad in vivo. Actualmente se cuenta con ejemplares vivos de pasto y clavel, que se mantienen bajo condiciones controladas utilizando suelo antártico como sustrato. También se están estudiando las mejores condiciones para germinar semillas de pasto que fueron obtenidas de flores presentes en las muestras vegetales.

Financiación: Instituto Antártico Uruguayo (IAU), Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII).

Desarrollo de bioinsecticidas (hongos entomopatógenos) para el control de la chinche del eucalipto *Thaumastocoris peregrinus* Proyecto INIA FO18, Plan Estratégico Institucional 2011-2015.

Simeto S.¹, Lupo S.³, Bettucci L.³, Corallo B.³, Gómez D.¹, González P.¹, Torres D.¹, Martínez G.¹, Abreo E.², Rivas F.², Altier N.² ssimeto@inia.org.uy

- ¹. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Programa de Producción Forestal, E.E. del Norte, Tacuarembó.
- ². Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Programa de Sustentabilidad Ambiental, Sección Bioinsumos, E.E. Wilson Ferreira Aldunate, Las Brujas, Canelones.
- ³. Facultad de Ciencias/Ingeniería, Laboratorio de Micología, Universidad de la República, Montevideo.

La chinche del eucalipto, *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero y Dellappé 2006 (Heteroptera: Thaumastocoridae), es una de las plagas emergentes más importantes para las plantaciones de eucaliptos debido a su gran capacidad invasora y a la ausencia de enemigos naturales. Se alimenta por succión provocando amarillamiento del follaje, defoliación y en casos muy severos, muerte de árboles. En Uruguay fue detectada en 2008 y está presente en las principales especies de eucaliptos plantadas comercialmente. En el manejo de plagas forestales, el control químico es escasamente aplicado debido a sus desventajas tanto ambientales como económicas. A su vez, en plantaciones certificadas por FSC (Forest Stewardship Council) existen grandes restricciones a la utilización de determinados productos químicos. Como alternativa, el control biológico con enemigos naturales o patógenos ha sido exitoso en el manejo de algunas plagas en el sector forestal. Los hongos entomopatógenos están presentes naturalmente en el ambiente y son responsables del control poblacional de muchos insectos. Su utilización, dentro de programas de Manejo Integrado de Plagas, se presenta como una alternativa real al control químico en la forestación. En plantaciones de *Eucalyptus* en nuestro país, se han observado epizootias en *T. peregrinus* debidas a hongos entomopatógenos, lo cual evidencia el potencial de éstos para reducir las poblaciones del insecto. A su vez, equipos de investigación del INIA y la Universidad de la República cuentan con cepas de hongos entomopatógenos aisladas de plagas agrícolas y otras plagas forestales, las cuales podrían aportar al manejo de esta plaga. El objetivo del presente proyecto, ejecutado en conjunto con la UdelaR, es el desarrollo de bioinsecticidas a partir de la búsqueda, evaluación y bioproducción de hongos entomopatógenos para el control de la chinche del eucalipto. La metodología comprende varias etapas: i) colecta de *T. peregrinus*, aislamiento e identificación de hongos entomopatógenos; ii) ensayos de inoculación sobre *T. peregrinus in vitro*, selección de cepas según su virulencia y caracterización de las cepas seleccionadas; iii) actividades de bioproducción, selección de 2 cepas finales; iv) ensayos de inoculación de *T. peregrinus* con cepas formuladas y productos comerciales *in vitro* y en invernáculo. A partir de las prospecciones a campo fue posible aislar cepas pertenecientes a los géneros de hongos entomopatógenos *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Verticillium* y *Lecanicillium*. El protocolo de inoculación desarrollado y las condiciones de temperatura y humedad seleccionadas fueron adecuados para promover el desarrollo de los hongos entomopatógenos. La mayoría de las cepas de colección evaluadas fueron patogénicas para *T. peregrinus*, con diferente grado de virulencia en base al cual se realizó una categorización preliminar de las mismas. En general, el porcentaje de recuperación de inóculo fue muy alto y la mortalidad de los testigos se encuentra dentro de niveles aceptables.

Efecto de la inoculación de la cepa *Pseudomonas fluorescens* C119 en el rendimiento de la alfalfa y en la estructura de la comunidad bacteriana de la rizósfera

Yanes M.L.¹, Braga L.¹, Altier N.², Arias A.¹

¹ Laboratorio de Ecología Microbiana, IIBCE, Montevideo, Uruguay lisyanes@gmail.com

² Protección Vegetal, INIA Las Brujas. Canelones, Uruguay.

La utilización de bacterias nativas promotoras del crecimiento vegetal para mejorar el rendimiento de cultivos de interés agronómico es una estrategia ambientalmente amigable que apunta a promover prácticas de producción sustentable y disminuir la carga de agroquímicos agregados al suelo. La alfalfa (*Medicago sativa* L.) se destaca por su valor nutricional, su persistencia y su excelente rendimiento. Una implantación exitosa del cultivo es fundamental para obtener los beneficios que brinda esta forrajera. La cepa nativa *Pseudomonas fluorescens* C119, aislada de rizósfera de alfalfa presenta un gran potencial como agente de biocontrol de las enfermedades de implantación de la alfalfa. El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto promotor del crecimiento de la alfalfa y el impacto en la diversidad de la comunidad microbiana asociada a la raíz debido a la inoculación con la cepa *P. fluorescens* C119. Para ello se analizó la capacidad de la cepa 119 de colonizar plantas de alfalfa y promover su crecimiento en condiciones de campo. La cepa se introdujo junto a *Sinorhizobium meliloti* mediante la inoculación de las semillas. El efecto sobre la implantación y el rendimiento de la alfalfa se comparó con un control inoculado únicamente con el rizobio. El número de plantas sanas en el tratamiento control disminuyó significativamente durante el ensayo mientras que el número de plantas del tratamiento con C119 se mantuvo estable. El rendimiento del cultivo se vio aumentado en un 40% cuando se inoculó con la cepa de *Pseudomonas*. También se analizó el impacto de la presencia de la cepa C119 sobre la estructura de la comunidad bacteriana de la rizósfera de alfalfa, a lo largo de todo el ensayo. Se pudo observar que la cepa C119 era capaz de colonizar eficientemente y mantenerse en altos recuentos en las raíces de alfalfa. Esto afectó transitoriamente la estructura de la comunidad bacteriana en las primeras etapas del desarrollo de la planta, luego de lo cual no se percibieron diferencias con el control. La cepa C119 no se identificó en plantas de los tratamientos control.

TRABAJOS YA PRESENTADOS

Virulence of fungal spores produced in liquid and solid state media on nymphs of *Trialeurodes vaporariorum*

Abreo E., Altier N.

Bioproduction Lab, INIA Las Brujas. Ruta 48 Km 10, Canelones, URUGUAY.
Address for Correspondence: eabreo@inia.org.uy

Quality of spores of five fungal entomopathogens, produced in liquid and on solid media, was assessed on nymphs of whitefly *Trialeurodes vaporariorum*. Isolates of *Lecanicillium attenuatum*, *L. muscarium*, *L. longisporum* and an unidentified *Isaria* sp. were first passed through larvae of *Tenebrio molitor* to enhance virulence. Three-times subcultured pure colonies were used to inoculate liquid or solid media to produce submerged and aerial spores. The liquid medium production system consisted of 250 mL Erlenmeyer flasks containing a mineral solution with a C/N ratio of 10/1 supplemented with yeast extract, placed in an orbital shaker at 180 rpm and 25°C. The solid medium production system consisted of Petri dishes containing PDA, placed in an incubator at 25°C. Spores were collected and suspensions of 1x10⁶ germinable spores were prepared. Five tomato leaves, infected with *T. vaporariorum* nymphs at 2nd-3rd instars, were submerged for one minute in the spore suspensions of each isolate, and maintained in 200 mL water-agar glasses in a growth chamber during ten days. The number of dead nymphs was evaluated six and ten days after inoculation. Control treatments consisted of ten leaves infected with the whitefly nymphs and treated with sterile water. Aerial spores of the *Lecanicillium* spp. isolates caused higher mortality than submerged spores. *L. longisporum* was the least affected by the production system. Contrary to *Lecanicillium*, submerged spores of the *Isaria* isolate killed more nymphs than aerial spores six days after inoculation. The production system should be considered at the selection process for application of microbial control agents.

Aislamiento y caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*.

Giannone N.¹, Federici M. T.*², Rivas F.²

¹UDELAR, Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay.

²Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Estación Experimental INIA Las Brujas, Canelones, Uruguay. *mfederici@lb.inia.org.uy

El impacto ambiental generado por el uso de agroquímicos en el control de plagas ha llevado a la búsqueda y utilización de métodos alternativos más seguros y eficientes. Una de estas estrategias consiste en la utilización de microorganismos como agentes de control biológico, siendo *Bacillus thuringiensis* la bacteria más estudiada para este propósito. Esta bacteria se ha aislado de fuentes muy diversas tales como insectos muertos, plantas, suelos y ambientes marinos. El objetivo de este trabajo fue la prospección y caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* a partir de distintas muestras: suelo agrícola, suelo con vegetación natural, rizósfera de maíz e insectos ortópteros (tucuras), para su posible utilización en programas de control biológico de plagas agrícolas en Uruguay. Las muestras de suelo y rizósfera provienen de un ensayo a campo con maíz transgénico instalado en la Estación Experimental INIA Las Brujas y las muestras de tucuras provienen de los departamentos de Florida y Durazno donde en la sequía del 2008-2009 hubo un crecimiento desmedido en sus poblaciones. Se procesaron 12 muestras de tucuras y 14 muestras de suelo, de las cuales se obtuvieron un total de 100 aislamientos bacterianos. Las colonias aisladas fueron comparadas morfológicamente con las cepas de referencia *Bacillus thuringiensis* serovar kurstaki (HD-1) y *Bacillus thuringiensis* serovar aizawai (HD-133) otorgadas por el "Bacillus Genetic Stock Center" (BGSC), USA. Se determinó la movilidad de las bacterias y se les realizó dos pruebas bioquímicas (catalasa y tinción de Gram). A partir de los resultados obtenidos se seleccionaron 16 cepas con potencial de pertenecer a *Bacillus thuringiensis*: 11 provenientes de muestras de rizósfera, una de suelo y cuatro de tucuras. Para confirmar la pertenencia de estas cepas a *Bacillus thuringiensis* se extrajo el ADN con el kit de extracción "DNeasy Blood & Tissue" (QIAGEN) y se amplificó por PCR utilizando cebadores universales del gen cry1 (especificidad: Lepidópteros y Dípteros), descritos por Bravo et al. (1998). Se analizaron junto a estas cepas, cuatro cepas de referencia que poseen variantes del gen cry1 y el gen cry7. De las 16 cepas candidatas, en seis se detectó la presencia del gen cry1, obteniéndose un fragmento del tamaño esperado. Posteriormente se secuenciará el gen ribosomal 16S para su confirmación a nivel de especie y se analizará la presencia de otros grupos de genes cry: cry2 (Lepidópteros y Dípteros), cry3 (Coleópteros), cry4 (Dípteros), cry7 y cry8 (Coleópteros). Finalmente, se realizarán bioensayos con los insectos plaga de mayor incidencia, para evaluar su potencial uso en programas de control biológico.

Evaluación de crecimiento, sanidad y resistencia a heladas de tres híbridos de *Eucalyptus grandis* con aplicación de bio estimulantes, *Trichoderma harzianum* (Trichosoil®) y Quitosano (Biorend®), en plantación

Romero G., Rodríguez D., Olivera Costa V.

Facultad de Agronomía. Universidad de la República. (deynafb@hotmail.com).

Existe evidencia científica que reporta las propiedades de *Trichoderma harzianum* como agente biocontrolador y estimulador del crecimiento y al quitosano como agente estimulador del crecimiento. Es por esto que el objetivo de este trabajo es evaluar crecimiento, sanidad y resistencia a heladas (probabilidad de sobrevivencia) de tres híbridos de *E. grandis* con aplicación conjunta de *Trichoderma harzianum* (Trichosoil®) y Quitosano (Biorend®), en plantación, considerando la aplicación en dos tamaños de plantas. Se instaló un ensayo de campo en el Establecimiento Buena Vista I propiedad de Weyerhaeuser S.A, en el Departamento de Rivera. Se realizó un DBCA con arreglo factorial, donde los factores evaluados fueron: genotipos (GU8, GT529, GC514), dos tamaños (intermedios y grandes), y aplicación de Trichosoil® más Biorend® (testigo, una y dos dosis extra), resultando en 18 tratamientos por bloque, con 3 repeticiones. Cada parcela contó con 30 plantines (UE), a una densidad de 540 plantas/ha. La aplicación de *Trichoderma harzianum* más quitosano en los diferentes genotipos tuvo un efecto diferencial en la sanidad de los individuos, donde en la totalidad de las plantas no se visualizaron síntomas de enfermedades. Para el caso del efecto de *Trichoderma harzianum* más quitosano sobre los genotipos y el tamaño, para la variable altura, diámetro y sobrevivencia se observó que el genotipo GC514 tamaño intermedio y una aplicación presentó un crecimiento en altura promedio de 0.13 m superior con respecto al testigo y dos aplicaciones, en lo que se refiere al diámetro el crecimiento promedio fue de 0.42 cm y 0.37 cm, superior al testigo y dos aplicaciones respectivamente. La probabilidad de sobrevivencia fue de 0.77. Para el genotipo GT529 tamaño grande y una aplicación, el crecimiento en altura promedio fue de 0.24 m superior al testigo y 0.16 m superior a los individuos que recibieron la segunda aplicación extra. El crecimiento en diámetro fue de 0.25 cm y 0.26 cm superior al testigo y dos aplicaciones respectivamente. La probabilidad de sobrevivencia fue de 0.86. Para el genotipo GU8 tamaño grande y dos aplicaciones, el crecimiento en altura que presentaron los individuos en promedio fue de 0.23 m con respecto al testigo y una aplicación. El crecimiento en diámetro fue de 0.42 cm con respecto al testigo y una aplicación. La probabilidad de sobrevivencia fue de 0.95. Los resultados obtenidos muestran que hay una respuesta diferencial frente a la aplicación conjunta de *Trichoderma harzianum* más quitosano, sobre el crecimiento (altura y diámetro), probabilidad de sobrevivencia, daños por heladas y sanidad, la cual depende de la combinación con el genotipo y el tamaño.

Cropping history effects on pathogen-suppressive activity of indigenous soilborne *Streptomyces* communities

Vaz P.^{1,2}, Altier N.¹, Pérez C.A.³, Kinkel L.L.²

¹. Laboratorio de Microbiología del Suelo, INIA-Las Brujas. Canelones, Uruguay.

². Department of Plant Pathology, University of Minnesota, USA.

³. Departamento de Protección Vegetal, Facultad de Agronomía, EEMAC, UDELAR, Uruguay. pativaz@inia.org.uy

Soil diseases remain a yield-limiting factor for most agricultural crops. Indigenous soil microbes have significant potential to protect plants from soil-borne pathogens, yet our understanding of the factors that determine the dynamics of antagonistic populations, including antibiotic-producing *Streptomyces*, remains limited. This work explored the relationships between crop rotation sequence, soil edaphic characteristics, and pathogen-suppressive activities of soil *Streptomyces* populations in two non-cropped soils and a long-term rotation experiment. The experiment was established in 1999 and includes 10 treatments in a randomized block design with 3 blocks. Crops are grown year-round, allowing two crops annually. All treatments included soybean immediately following wheat, but the 10 cropping systems varied in the length of the rotation (number of years between wheat planting) and in the diversity of the crops grown in the sequence. Soils from longer rotations had higher plant diversity over time, with 3- and 4- year rotations having 6 plant species over a 4-year period, while 1 and 2 year rotations had only 2 and 4 plant species over the same 4-year period, respectively. Samples were collected on March 2012, when summer crops were at the end of the growing season. Densities of bacteria, *Streptomyces*, and inhibitors were measured for every plot. In addition, the mean inhibitory activity of *Streptomyces* isolates against target organisms was determined. Briefly, soil suspensions were plated on Starch Casein Agar and incubated for 3 days at 28°C, when total bacteria and *Streptomyces* were counted. Subsequently, plates were overlaid with one of two target microbes in order to characterize the antagonistic activity of the soil *Streptomyces*. Finally, soil edaphic characteristics (nitrate content, organic matter, P, K, pH) were determined for every soil. Soils having different rotation histories had significantly different bacterial, *Streptomyces* and inhibitor densities. Specifically, soils from longer rotations had significantly higher microbial densities than soils from shorter rotations. Soil nitrate, organic matter, soluble potassium and pH were significantly correlated with microbial community characteristics. Our work suggests that agronomic practices that contribute to increasing total bacterial densities are likely to enhance the potential for microbial communities to suppress plant pathogens. In this study, longer rotations and higher plant diversities over time, were most effective in producing high bacterial densities in soil. Further research on the effects of rotations, plant diversity, and initial microbial community are needed to increase our understanding of the potential for crop management to consistently enhance pathogen-suppressive capacities of indigenous soil microbial communities.

Impacts of crop rotation on disease-suppressive *Trichoderma* and *Streptomyces* densities

Villar H.A.¹, Vaz P.^{2,3}, Kinkel L.³, Perez C.A.¹, Altier N.A.²

¹. Departamento Protección Vegetal, EEMAC, Facultad Agronomía, Universidad de la Republica, Uruguay.

². Laboratorio de Microbiología del Suelo, INIA Las Brujas, Canelones, Uruguay.

³. Department of Plant Pathology, University of Minnesota, USA. naltier@inia.org.uy

Agriculture in Uruguay has undergone a process of structural change which has led to a predominance of no-till adoption in almost 100% cultivated land. Consequently, plant diseases caused by necrotrophic pathogens, particularly those capable of surviving in crop residues have become prevalent, making soil-borne and stubble-borne pathogens a primary limitation in no-till cropping. It has been widely documented that indigenous microbial communities can naturally reduce pathogen inoculum density of plant pathogens. In addition, several studies have shown that crop sequence has a significant effect on the composition of the soil microbial community and thus, the choice of crops could help to increase the population of antagonistic microorganisms with potential to reduce pathogen populations both on the crop debris and in soil. Among others, microorganisms of the genera *Trichoderma* and *Streptomyces* are ubiquitous in soil and have shown great antagonistic capacity against diverse plant pathogens. Nonetheless, systematic information regarding the effects of field crops and rotation sequences on native populations of *Trichoderma* spp. and *Streptomyces* spp. is scarce. The objective of our work was to evaluate the impact of different crop sequences on native *Trichoderma* spp. and *Streptomyces* spp., as potentially pathogen-suppressive organisms. Samples were collected from a field experiment with crop rotations 1- to 4-years long, established in 1999 in Paysandú, Uruguay. *Streptomyces* and *Trichoderma* densities were quantified in soil samples collected from all plots and *Trichoderma* density was also quantified on stubble. Both *Trichoderma* and *Streptomyces* densities were significantly affected by the cropping history. Interestingly, higher soil densities of both groups of microorganisms were found in the rotations with greater diversity of crops. In addition, barley debris showed the highest *Trichoderma* density. Our results give insight into how crop rotation influences microbial populations and suggest the importance of crop rotations designed to enhance disease suppressiveness.

Impreso en Octubre de 2014
en PRONTOGRÁFICA
Cerro Largo 850 - Tel.: 2902 3172
Montevideo Uruguay
E-mail: pgrafica@adinet.com.uy
Dep. Legal 000.000