



Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria
URUGUAY



Programa de Investigación en Producción y Sustentabilidad Ambiental
Serie Actividades de Difusión N° 779
27 de octubre de 2017

Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

Integración de la Junta Directiva

D.M.T.V., Ph.D. José Luis Repetto - Presidente

Ing. Agr., M.Sc., Ph.D. Álvaro Roel - Vicepresidente



Ing. Agr., M.Sc. Diego Payssé Salgado

Ing. Agr. Jorge Peñagaricano



Ing. Agr. Pablo Gorriti

Ing. Agr. Alberto Bozzo



SIMPOSIO

MICROORGANISMOS PARA LA AGRICULTURA

RESÚMENES DE PRESENTACIONES

27 DE OCTUBRE DE 2017

INIA LAS BRUJAS

Compiladores: Dr. Eduardo Abreo

Dra. Nora Altier

PRÓLOGO

Desde 2006, INIA junto a otras instituciones nacionales y regionales han sumado esfuerzos para priorizar la temática del uso de microorganismos para el control biológico de enfermedades y plagas que afectan la producción agrícola. El primer Taller de Agentes Microbianos de Control Biológico fue realizado en 2006 y seguido de otros; en 2008 la actividad se focalizó en el “Marco Normativo y Comercialización”, en 2011 lo hizo en el “Uso y perspectivas de los AMCB en sistemas de producción sustentables”, y en 2014 tuvo como objetivo revisar las “Limitantes, oportunidades y desafíos en el uso de los AMCB en la Agricultura”. Las jornadas integraron 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.

La actividad que nos reúne hoy, el Simposio "Microorganismos para la Agricultura", retoma la temática del Taller de Agentes Microbianos de Control Biológico, y la amplía para considerar la multifuncionalidad de los microorganismos y su rol en la agricultura. Es una oportunidad para congregar expertos y presentar los trabajos de investigadores y estudiantes en cuatro áreas asociadas a la función y utilización de los microorganismos en la agricultura:

1. Ecología microbiana y salud de los sistemas de producción
2. Microorganismos en la nutrición y promoción del crecimiento vegetal
3. Bioproducción de microorganismos para su uso en la protección vegetal
4. Marco normativo, registro y calidad de bioinsumos

El Simposio finaliza con una mesa redonda, cuyo objetivo es realizar una síntesis de la jornada y plantear los principales desafíos y las oportunidades para el uso de productos microbianos para la agricultura en el futuro inmediato.

Comité Organizador

Comité Organizador

Eduardo Abreo

Nora Altier

Elena Beyhaut

Santiago Cayota

Silvia Garaycochea

José Terra

Comité Científico

Dr. Eduardo Abreo, INIA

Dra. Elena Beyhaut, INIA

Dra. Martina Crispo, IPMont

Dra. Ana Fernández, Facultad de Química, UdelaR

Dra. Sandra Lupo, Facultad de Ciencias, UdelaR

Dr. Sebastián Martínez, INIA

Dra. María Morel, IIBCE

Dra. Silvia Pereyra, INIA

Dr. Carlos Pérez, Facultad de Agronomía, UdelaR

Dra. Andrea Rodríguez, Facultad de Agronomía, UdelaR

Dra. María Inés Siri, Facultad de Química, UdelaR

Dra. Patricia Vaz, IIBCE

Equipo de apoyo: Claudia Barlocco, Beatriz Dini, Mariana Mortalena, Natalia Mattos, Sebastián Dini, Victoria Cerecetto, Nadia Martín, Pablo Torres, Lucía Sessa

ÍNDICE

Programa	8
MÓDULO 1	10
O1. Microbioma y salud del suelo.....	11
O2. Regulación microbiana de los ciclos biogeoquímicos involucrados en la emisión de gases de efecto invernadero en suelos agrícolas.....	12
O3. Propiedades de suelos bajo campo natural y su relación con la estructura de las comunidades microbianas	13
O4. Diseño de un índice de salud del suelo para la siembra de soja: armando el rompecabezas	14
O5. Efecto de la aplicación de un activador biológico en cultivos de soja, cebada y cítricos sobre los microorganismos del suelo	15
M1P1. Dinámica poblacional de grupos microbianos anaerobios de relevancia ambiental asociados al cultivo de arroz	16
M1P2. Variables microbiológicas como indicadores de la salud del suelo en suelos agrícolas tratados con aplicación de estiércol tratado aeróbicamente* ..	17
M1P3. Cambios fisicoquímicos y microbiológicos producidos en suelos arroceros en función de la intensificación de su uso*	18
M1P4. Efecto de la inhibición de la metanogénesis en las bacterias fermentadoras de exudados de plantas de arroz*	19
M1P5. Efecto del inhibidor de la nitrificación Diciandiamida (DCD) sobre las emisiones de Óxido nitroso (N₂O) desde suelos en condiciones de pastoreo	20
MÓDULO 2.....	21
O1. Roles de los microorganismos en las transformaciones del fósforo orgánico del suelo	22
O2. Contribución de los microorganismos a la nutrición vegetal nitrogenada....	23
O3. Prospección y caracterización de <i>Bacillus</i> spp. movilizadores de fósforo del suelo, para el desarrollo de inoculantes microbianos	24
O4. Fitasas rizobianas y eficiencia en la utilización de fósforo en la simbiosis <i>Bradyrhizobium elkanii</i>-soja en cultivo hidroaeropónico	25
O5. Selección de cepas de rizobios eficientes en la promoción del crecimiento de leguminosas nativas arbóreas a ser incluidas en sistemas agroforestales ...	26

M2P1. Cambios en la capacidad de aporte de N del suelo dado por el uso de Microgeo® y su influencia sobre el rendimiento en grano y respuesta al agregado de Nitrógeno (N) a V6 en sorgo granífero (<i>Sorghum bicolor</i>).	27
M2P2. Respuesta al uso de un compost líquido continuo a base de Microgeo® sobre el rendimiento en grano del cultivo de trigo (<i>Triticum aestivum</i>), y su relación con la mejora de la capacidad de aporte de N del suelo.	28
M2P3. Aislamiento y caracterización de rizobios endófitos de arroz en distintas rotaciones *	29
M2P4. Impacto del uso de diferentes cebadores en la abundancia y diversidad de comunidades diazótroficas asociadas a plantas de arroz *	30
M2P5. Estrategias para el análisis genómico de cepas microbianas mineralizadoras de fósforo	31
M2P6. Eficiencia simbiótica y capacidad competitiva de cepas de rizobios que nodulan soja en suelos con y sin historia del cultivo	32
M2P7. Generación de un bioinoculante en base a hongos autóctonos solubilizadores de fosfato a nivel de laboratorio	33
M2P8. Herramientas moleculares aplicables a <i>Cupriavidus</i>: β-rizobio promotor del crecimiento vegetal.	34
M2P9. Bradirizobios pre-incubados con flavonoides: una estrategia para mejora del rendimiento en cultivos de soja*	35
M2P10. Descripción de nuevos rizobios adaptados a leguminosas nativas	36
M2P11. Efecto de la co-inoculación de <i>Bacillus</i> promotores del crecimiento vegetal con <i>Bradyrhizobium elkanii</i> sobre la nodulación en plantas de soja	37
MÓDULO 3	38
O1. An overview on the development and use of invertebrate pathogenic fungi in Brazil	39
O2. Harvesting the power of entomopathogenic and beneficial fungi through liquid culture fermentation technology	40
O3. Experience of a global biological company in plant care market.	41
O4. Levaduras en estrategias de control biológico de hongos patógenos.	42
O5. Control biológico de <i>Diaphorina citri</i> con <i>Metarhizium anisopliae</i> y <i>Beauveria bassiana</i>	43
O6. Selección y producción de hongos entomopatógenos para el control de la chinche del eucalipto: resultados y desafíos	44

M3P1. Factores de patogenicidad de <i>Bacillus</i> s.l. y <i>Serratia</i> spp. en <i>Argyrotaenia sphaleropa</i> (Meyrick 1909) (Lepidoptera: Tortricidae): resultados preliminares.	45
M3P2. Uso de endófitos comerciales (AR584) para el control de insectos plaga de festuca en Uruguay	46
M3P3. Implementación de la técnica de PCR para la detección de <i>Cydia pomonella</i> Granulovirus (CpG) en bioinsecticidas comerciales	47
M3P4. Control biológico de <i>Aspergillus flavus</i> en mini silos de sorgo*	48
M3P5. Producción e introducción de <i>Beauveria bassiana</i> para el control de mosca blanca en el tomate bajo invernáculo, una herramienta hacia el manejo integrado de enfermedades y plagas*	49
M3P6. Búsqueda de nuevos antimicrobianos a partir de microorganismos para el control de fitopatógenos	50
M3P7. Coating of maize seeds with entomopathogenic fungi promotes rhizosphere colonization, endophytic ability and provides biocontrol of a pest and pathogen*	51
M3P8. Hongos entomopatógenos para el control de <i>Thaumastocoris peregrinus</i> Carpintero y Dellappé (Heteroptera: Thaumastocoridae)	52
MÓDULO 4	53
M4P1. Inoculantes en Uruguay: modelo de cooperación interinstitucional	54
M4P2. Bioinsumos de uso agrícola en Uruguay: regulación y marco legal	55
M4P3. Identificación, cuantificación y control de los requerimientos microbiológicos de calidad e inocuidad en productos formulados con agentes de control biológico microbianos	56
M4P4. Generación de capacidades nacionales para la realización de ensayos de toxicidad e inocuidad incorporando métodos alternativos al uso de animales de laboratorio	57

*Trabajo presentado previamente en otro evento

Programa

8:00-8:30 Inscripciones

8:30-8:40 Apertura del Simposio

Dra. Nora Altier, Ing. Agr. Santiago Cayota

Módulo 1. Ecología microbiana y salud de los sistemas de producción

Moderador: **Dr. José Terra**

8:40-9:05 Microbioma y salud del suelo. Dra. Carolina Leoni, INIA.

9:05-9:30 Regulación microbiana de los ciclos biogeoquímicos y emisión de gases de efecto invernadero en suelos agrícolas. Dra. Ana Fernández Scavino, FQuím, UdelaR.

9:30-9:45 Propiedades de suelos bajo campo natural y su relación con la estructura de las comunidades microbianas. Lic. (Mag.) Silvia Garaycochea, INIA.

9:45-10:00 Diseño de un índice de salud del suelo para la siembra de soja: armando el rompecabezas. Dra. Patricia Vaz, INIA/IIBCE.

10:00-10:15 Efecto de la aplicación de un activador biológico en cultivos de soja, cebada y cítricos sobre los microorganismos del suelo. Ing. Agr. Nelson Diez, Clínica del Suelo.

10:15-10:30 Café

Módulo 2. Microorganismos en la nutrición y promoción del crecimiento vegetal

Moderador: **Dr. Andrés Quincke**

10:30-10:55 Microorganismos en la nutrición fosfatada. Dra. Elena Beyhaut, INIA.

10:55-11:20 Microorganismos en la nutrición nitrogenada. Dra. Andrea Rodríguez, FAgro, UdelaR

11:20-11:35 Prospección y caracterización de *Bacillus* spp. movilizadores de fósforo del suelo para el desarrollo de inoculantes microbianos. Q. Nadia Martín, INIA.

11:35-11:50 Fitasas rizobianas y eficiencia en la utilización de fósforo en la simbiosis *Bradyrhizobium elkanii*-soja en cultivo hidroaeropónico. Lic. Victoria Cerecetto, INIA.

11:50-12:05 Selección de cepas de rizobios eficientes en la promoción del crecimiento de leguminosas nativas arbóreas a ser incluidas en sistemas agroforestales. Dr. Raúl Platero, IIBCE.

12:05-13:30 Almuerzo y Sesión de Posters

Módulo 3. Bioproducción de microorganismos para la protección vegetal

Moderador: **Dr. Trevor Jackson**

13:30–13:55 An overview on the development and use of invertebrate pathogenic fungi in Brazil. Dr. Rogerio Biaggioni Lopes, Embrapa Cenargen.

13:55–14:20 Harvesting the power of beneficial fungi for crop protection. Dr. Gabriel Moura Mascarin, Embrapa Meio Ambiente.

14:20-14:35 Experience of a global biological company in plant care market. Ing. Agr. Jean Marc Sanchez, Lallemand.

14:35-14:50 Levaduras en estrategias de control biológico de hongos patógenos. Dra. Silvana Vero, FQuím, UdelaR.

14:50-15:05 Control biológico de *Diaphorina citri* con *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*. Lic. (Mag.) Belen Corallo, FCien, UdelaR.

15:05-15:20 Selección y producción de hongos entomopatógenos para el control de la chinche del eucalipto: resultados y desafíos. Dr. Eduardo Abreo, INIA.

15:20-15:35 Café

15:35-16:50 Mesa Redonda – Desafíos y oportunidades

Moderador: **Dra. Silvia Pereyra**

- Marco normativo y registro de productos microbianos. Ing. Agr. Federico Montes, MGAP-DGSA.
- Intervención con bioinsumos en los sistemas de producción hortícola, proyecto FPTA 344. Ing. Agr. Eduardo Campelo, MGAP-DIGEGRA.
- Intervención con bioinsumos en los sistemas de producción forestal. Sociedad de Productores Forestales. Ing. Agr. Jorge Martínez Haedo
- Desafíos para la producción y comercialización de productos microbianos. Ing. Agr. Martín Lage, Lage y Cía., Ing. Gustavo Sundberg, Lafoner S.A., Ing. Agr. Hernán López, Rizobacter.
- Discusión y conclusiones

16:50–17:00 Cierre del Simposio

MÓDULO 1

Ecología microbiana y salud de los sistemas de producción

O1. Microbioma y salud del suelo

Dra. Leoni, C. ¹

¹ Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Programa Nacional de Investigación en Producción y Sustentabilidad Ambiental. Estación Experimental INIA Las Brujas.

cleoni@inia.org.uy

Los microorganismos del suelo son responsables de diversas funciones y servicios ecosistémicos del suelo como el ciclado de nutrientes, la formación de agregados y la promoción del crecimiento y la salud de las plantas. Con el desarrollo de nuevas técnicas y herramientas de análisis (“ómicas”) es posible hoy abrir las “cajas negras” del suelo y entender mejor su funcionamiento. Las técnicas genómicas nos permiten analizar los factores que cambian la composición del microbioma del suelo, entendiendo por microbioma al conjunto de microorganismos y sus genes, lo cual incluye bacterias, archeas, protistas, hongos, virus. La diversidad microbiana es un componente esencial para la salud del suelo, y por ende para sostener la productividad biológica, mantener la calidad ambiental y promover la salud de plantas, animales y personas. Sin embargo, aun es un desafío comprender cómo los diferentes manejos agronómicos cambian el microbioma del suelo y consecuentemente como inciden en la salud de los cultivos por ejemplo favoreciendo la supresión de enfermedades. Los experimentos de largo plazo (ELP) son una plataforma muy valiosa que nos permiten estudiar los efectos a largo plazo de diferentes prácticas agronómicas no sólo en los rendimientos (productividad biológica) y las propiedades fisicoquímicas del suelo, sino también en las comunidades microbianas. A partir de muestras de suelos y rizósfera de ELP establecidos en INIA, mediante análisis genómicos (PCR, secuenciación) y experimentos maceteros, se estudiará cómo el impacto de diferentes intensidades de uso del suelo y manejos con abonos verdes y enmiendas orgánicas inciden sobre las comunidades microbianas. El fin último es contribuir al diseño de sistemas productivos más resilientes.

O2. Regulación microbiana de los ciclos biogeoquímicos involucrados en la emisión de gases de efecto invernadero en suelos agrícolas

Fernández, A.¹; Ferrando, L.¹; Oreggioni, D.¹; Martínez, A.¹; Pereira, L.¹; Ghiazza, C.¹; Illarze, G.²; Tarlera, S.¹; Irisarri, P.²

¹Laboratorio de Ecología Microbiana Medioambiental, Departamento de Biociencias, Facultad de Química, UdelaR. ²Cátedra de Microbiología, Departamento de Fisiología Vegetal, Facultad de Agronomía, UdelaR
afernand@fq.edu.uy

El sistema del cultivo de arroz irrigado es de gran interés para nuestro país por su alta productividad y porque contribuye a la emisión de CH₄ y N₂O, dos de los principales gases de efecto invernadero (GEI). Estos gases se producen principalmente por la actividad microbiana del suelo, donde ocurre una sucesión de etapas óxicas- anóxicas luego de la inundación del cultivo de arroz. En un escenario de creciente intensificación del uso del suelo se han incorporado prácticas de manejo que incluyen el aumento de la frecuencia del cultivo de arroz o la rotación con cultivos más rentables como la soja. En estas condiciones, se presenta el desafío de mantener la sustentabilidad y aumentar la productividad mediante el manejo del cultivo que, a su vez, puede afectar la flora microbiana del suelo. En este proyecto se estudia el efecto de la intensificación del uso del suelo en los procariotas durante un ciclo anual, con énfasis en los microorganismos del suelo involucrados en las transformaciones redox de los compuestos carbonados y nitrogenados, responsables de la emisión y también del consumo de los GEI. Mediante técnicas de secuenciación masiva del gen ARNr 16S se conoció la composición de la comunidad bacteriana y su distribución en los distintos momentos y condiciones de manejo. Se determinó el potencial de los procesos microbianos de metanogénesis, metanotrofia, nitrificación y desnitrificación en esos suelos, se cuantificaron genes específicos de los procariotas de estos grupos funcionales, y se midieron los parámetros fisicoquímicos asociados. Este trabajo vincula la ecología microbiana con la biogeoquímica del suelo para conocer el funcionamiento del ecosistema e incidir en la regulación de la emisión de GEI.

Financiamiento: Proyecto CSIC Grupos 976. Proyecto INNOVAGRO FSA 1244 (ANII). INIA Estación Experimental de Paso de la Laguna, Treinta y Tres, Plataforma de Producción y Sustentabilidad Ambiental.

O3. Propiedades de suelos bajo campo natural y su relación con la estructura de las comunidades microbianas

Garaycochea, S.^{1,2}; Beyhaut, E.¹; Altier, N.¹

¹Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

²Estudiante de Doctorado en Ciencias Agrarias, Facultad de Agronomía, UdelaR
sgaraycochea@inia.org.uy

Los microorganismos del suelo son parte integral del ciclo del fósforo (P), mediando la disponibilidad de este elemento para las plantas. Se prevé que, en dos décadas, las fuentes de P de alta calidad sean un recurso restrictivo. América del Sur importa más de 70% del P necesario para la actividad agrícola; esto justifica el desarrollo de sistemas de producción más eficientes en el uso de P, siendo los microorganismos una estrategia atractiva para tal propósito. Este trabajo tiene como objetivo caracterizar la diversidad estructural de las comunidades microbianas asociadas a la dinámica del P en suelos de Uruguay utilizando tecnología de secuenciación masiva. Para ello se seleccionaron 5 unidades de suelo bajo campo natural; cada sitio fue caracterizado por sus propiedades físicas y químicas. Se observó un amplio rango en el contenido de P total, desde 150 ppm en los suelos más pobres (luvisoles sobre areniscas triásicas) hasta 700 ppm (brunosoles sobre limos terciarios). En el contenido de P disponible, independiente del contenido de P total del suelo, se observó un rango más reducido, de 1 a 40 ppm. El porcentaje en el contenido de P orgánico varió entre 49 - 67% del P total del suelo, indicando la importancia de la fracción de origen orgánico en los suelos seleccionados. El uso de técnicas de secuenciación masiva del fragmento 16S rRNA nos permitió describir las comunidades de microorganismos de cada uno de los sitios. QIIME v 1.9.1 fue utilizado para la obtención de las unidades taxonómicas operativas (OTU), con un 97% de identidad para su anotación taxonómica. Acidobacteria, firmicutes, bacteroidetes y chloroflexi fueron los phyla dominantes en todos los sitios. La comparación de las comunidades microbianas (diversidad beta) fue realizada usando el método de UniFrac basado en filogenia. El agrupamiento obtenido se explica en un 53% por el tipo de suelo de cada sitio (Adonis). Los perfiles obtenidos dan cuenta de una diversidad microbiana influenciada por las características de cada suelo.

²Beca ANII de doctorado

O4. Diseño de un índice de salud del suelo para la siembra de soja: armando el rompecabezas

Vaz, P.^{1,2}; Dini, S.¹; Núñez, L.¹; Bartaburu, V.³; Abreo, E.¹; Beyhaut, E.¹; Pérez, C.³;
Stewart, S.⁴; Zerbino, S.⁴; Martínez, S.⁵; Altier, N.¹

¹Plataforma de Bioinsumos, INIA Las Bujas; ²Departamento de BIOGEM, IIBCE; ³Facultad de Agronomía, UDELAR; ⁴Protección Vegetal, INIA La Estanzuela; ⁵ INIA Treinta y Tres.
pvaz@iibce.edu.uy; naltier@inia.org.uy

El manejo de enfermedades de implantación en soja se realiza mediante el agregado de fungicidas a la semilla. Éstos pueden afectar microorganismos no blanco, entre ellos promotores de la salud y el crecimiento vegetal, tales como los rizobios o antagonistas naturales. Por lo tanto, pautas para racionalizar el uso de fungicidas podrían conllevar un beneficio para la salud de las plantas y el ambiente, además de económico. Nuestro grupo de trabajo se planteó generar un índice de salud del suelo para implementar en la siembra de soja con este fin. Cerca del final del proyecto, se muestran avances sobre los tres años consecutivos de muestreo. Los muestreos se hicieron en suelos sobre los que se iría a plantar soja, con y sin este cultivo como antecesor. En los dos primeros años, se tomaron muestras de suelos del este y litoral oeste del país, y el tercer año en el litoral. Se cuantificaron por dilución en placa las densidades de bacterias y *Streptomyces*, activos antagonistas de hongos fitopatógenos. El antagonismo de las comunidades microbianas se cuantificó sembrando diluciones de suelo en medio SCA (starch-casein-agar) y tras 48 h de incubación se agregaron los patógenos blanco. Se utilizó un índice de patogenicidad, medido a través de ensayos de germinación en toallas de papel. Actualmente, se está en proceso de aunar la información de todos los años de muestreo. Altas correlaciones entre propiedades biológicas y con algunas fisicoquímicas permiten reducir el número de variables a utilizar para el índice. El uso de análisis de componentes principales robusto (rPCA) ha permitido evaluar las variables seleccionadas simultáneamente. Esta información, sumada a lo que resta obtener del tercer año de muestreo, que incluye evaluaciones de campo, permitirá generar un índice integrado de la salud del suelo, en términos de enfermedades de implantación, al momento de siembra.

Financiamiento: ANII

O5. Efecto de la aplicación de un activador biológico en cultivos de soja, cebada y cítricos sobre los microorganismos del suelo

Queirolo, A.¹; Senatore, D.¹; Carro, G.²; Diez, N.³; Bajsa, N.¹

¹Laboratorio de Ecología Microbiana, Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Montevideo, Uruguay.

²Centro Uruguayo de Tecnologías Apropriadas (CEUTA). Montevideo, Uruguay.

³Clínica del Suelo. Paysandú, Uruguay.

nbajsa@iibce.edu.uy

El deterioro de los suelos en Uruguay ha sido producto de la intensificación agrícola, el uso de agroquímicos y la falta de diversificación productiva, entre otros. La búsqueda de alternativas que provean sustentabilidad al sistema agrícola y hortifrutícola es necesaria, apuntando a alimentos de mejor calidad y más sanos. Los microorganismos son un componente clave para el funcionamiento y la sustentabilidad de los suelos, contribuyendo a la nutrición y bienestar de las plantas. La actividad y composición de sus comunidades son ampliamente afectadas por las prácticas agrícolas, incluyendo la aplicación de agroquímicos. Este trabajo apunta a evaluar la aplicación de un producto agrícola que contiene carbohidratos, aminoácidos, micronutrientes quelatados y ácido salicílico (FoliarBlend) que estimula la actividad biológica del suelo mejorando el ciclado de nutrientes. Se establecieron ensayos en cultivos de soja, cebada y naranjos con dos tratamientos y 3 repeticiones: aplicación del activador con reducción de agroquímicos y uso convencional de agroquímicos. En muestras de suelo se determinó la abundancia de poblaciones cultivables de bacterias heterótrofas aerobias, actinobacterias, hongos, levaduras y bacterias amonificantes y la actividad microbiana por respirometría. Se midieron variables químicas: carbono orgánico, nitrógeno total, fósforo disponible, hierro, azufre, zinc, magnesio, bases, pH y CIC y mediante cromatografía de suelos se realizó un análisis integral (estructura, minerales, materia orgánica, actividad y humus). Luego de 6 meses de aplicación no se observaron diferencias en las poblaciones microbianas analizadas ni en el estado de salud del suelo. En algunas réplicas el rendimiento de soja con el activador fue de 9 a 13% superior que el testigo. Se continuarán los análisis luego de la segunda aplicación, ya que los productos biológicos promueven una mejora continua de las propiedades del suelo. Se busca aumentar el rendimiento y sanidad de los cultivos, disminuyendo la carga de insumos químicos y mejorando la calidad nutricional y microbiológica del suelo.

Financiamiento: AgriGro.

M1P1. Dinámica poblacional de grupos microbianos anaerobios de relevancia ambiental asociados al cultivo de arroz

Martínez, A.¹; Pereira, L.¹; Ferrando, L.¹

¹ Laboratorio de Ecología Microbiana Medioambiental, Departamento de Biociencias, Facultad de Química, UdelaR.
amartinez@fq.ed.uy

El sistema irrigado utilizado en nuestro para el cultivo de arroz presenta gran interés ambiental. Debido a sus características redox, es considerado un importante emisor de gases de efecto invernadero (CH₄ y N₂O), productos de procesos microbianos involucrados en los ciclos del C y N. La búsqueda de alternativas de intensificación que permitan aumentar las ganancias ha llevado a la sustitución de las pasturas por otros cultivos como la soja en la rotación con arroz, modificando la disponibilidad de nutrientes y la dinámica de las poblaciones microbianas asociadas al cultivo. Estudios previos realizados por nuestro grupo mostraron que bacterias fijadoras de nitrógeno anaerobias de diversa fisiología se encontraban asociadas a las raíces de arroz en la etapa anegada, predominando reductoras de sulfato y desnitrificantes. En este trabajo se estudió la presencia, abundancia y dinámica de tres grupos microbianos anaerobios de relevancia ambiental en suelos, rizósferas y raíces de arroz (reductores de sulfato, desnitrificantes y metanogénicos) provenientes de tres sistemas productivos, mediante la técnica de qPCR de genes marcadores de estos procesos (*dsrA*, *nirS*, *nirK* y *mcrA*). Los muestreos se realizaron en el ensayo instalado en la Unidad Experimental de Paso de la Laguna en INIA Treinta y Tres. Los tres grupos microbianos estudiados fueron detectados como endófitos de raíces de arroz. Sus abundancias en las raíces de las distintas rotaciones agrícolas no mostraron diferencias. En la etapa seca, la abundancia de desnitrificantes tipo *nirK* fue superior en el suelo proveniente de la rotación con soja respecto a los demás suelos y rizósferas. Luego de la inundación, las tres poblaciones estudiadas en raíz aumentaron significativamente. El análisis multivariado realizado para esta etapa permitió diferenciar las comunidades provenientes de raíces, rizósfera y suelo. Actualmente, se está comenzando el análisis de la estructura de las poblaciones sulfato reductoras y desnitrificantes en las rizósferas.

Financiamiento: Proyecto CSIC Iniciación 2015 y Proyecto CSIC Grupos I +D 2014.

M1P2. Variables microbiológicas como indicadores de la salud del suelo en suelos agrícolas tratados con aplicación de estiércol tratado aeróbicamente*

Montañez, A.¹; Vico, S.¹; Núñez, L.¹; Silva, C.¹; Rigamonti, N.¹

¹Facultad de ciencias (IECA), Laboratorio de Microbiología de Suelos. Montevideo, Uruguay
montanez.massa@gmail.com

Las propiedades-microbianas del suelo relacionadas con la biodiversidad y los ciclos biogeoquímicos son indicadores de la calidad/salud del mismo, pero aún no hay consenso en cuanto a cómo deben interpretarse y utilizarse. En este estudio se evaluó el impacto de la aplicación de estiércol tratado aeróbicamente, sobre las características microbiológicas del suelo, con el objetivo de identificar un conjunto mínimo de variables microbiológicas para monitorear los cambios tempranos en la calidad del mismo. El biofertilizante líquido utilizado en el experimento se preparo en tanques mediante el tratamiento-aeróbico del estiércol de ganado. Se estudiaron dos sitios y como control el mismo sitio sin aplicación. Los sitios difieren en la intensidad de aplicación del biofertilizante (1 y 3 años). Se determino el pH, % humedad y el potencial de mineralización de N (PMN). Además, se midieron diferentes parámetros microbianos: biomasa (carbono microbiano); número de bacterias, hongos y actinomicetes, actividad enzimática; propiedades físicas del suelo, relacionadas con la concentración de glomalina; fertilidad, incluyendo grupos microbianos funcionales con la capacidad de suministrar directa o indirectamente nutrientes (solubilizadores de P, diazótrofos, nitrificantes, desnitrificantes, celulolíticos) e índice de patogenicidad (IP). En términos generales, los resultados mostraron que la aplicación del biofertilizante incrementa la biomasa, la actividad enzimática y el PMN, y disminuye el IP. Estos resultados mostraron diferencias significativas en el sitio con 3 años de aplicación. El sitio con 1 año de aplicación mostró el mismo comportamiento de las variables, pero no en todos los casos diferencias significativas. Los actinomicetes, el IP, la glomalina y la actividad enzimática se correlacionaron significativamente ($P < 0.05$). Es importante hacer mayores esfuerzos para comprender el comportamiento de un amplio grupo de propiedades biológicas del suelo y cómo se relacionan entre sí en áreas y situaciones particulares para contribuir a generar información para una evaluación más global de la salud del suelo.

Financiamiento: Proyecto Donaciones/ Facultad de Ciencias: Empresa Agrofuturo S.A.
(Microgeo®)

*Trabajo presentado previamente en otro evento

M1P3. Cambios fisicoquímicos y microbiológicos producidos en suelos arroceros en función de la intensificación de su uso*

Oreggioni, D.¹; Martínez, A.¹; Ferrando, L.¹; Fernández, A.¹; Illarze, G.²; Irrisarri, P.²; Salvo, L.³; Terra, J.⁴; Tarlera, S.¹.

1- Laboratorio de Ecología Microbiana Medioambiental, Departamento Biociencias, Facultad de Química, UdelaR, Montevideo, Uruguay; 2- Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, UdelaR, Montevideo, Uruguay; 3- Departamento de Suelos y Aguas, Facultad de Agronomía, UdelaR, Montevideo, Uruguay; 4- INIA Treinta y Tres, Treinta y Tres, Uruguay
doreggioni@fq.edu.uy

El cultivo de arroz irrigado presenta interés ambiental, ya que parte de su ciclo ocurre en condiciones anaerobias, produciendo emisiones de metano (CH₄) y óxido nitroso (N₂O), gases de efecto invernadero (GEI), generados por procesos microbianos del ciclo del carbono y del nitrógeno. El flujo de emisiones en los arrozales es afectado por parámetros relacionados con las características biológicas y físicas del suelo, por lo que la intensificación de los cultivos, puede llevar a variaciones en las emisiones. El objetivo de este trabajo es conocer el efecto de la intensificación de los sistemas arroceros sobre la dinámica poblacional de los grupos microbianos del suelo, relevantes para la producción y consumo de CH₄ y N₂O, las emisiones netas de estos gases, durante el ciclo del cultivo, y su interacción con algunas variables fisicoquímicas. Para ello se determinó mediante qPCR la abundancia de genes funcionales involucrados en la desnitrificación (*nirK*, *nirSynosZ*), metanogénesis (*mcrA*) y metanotrofia (*pmoA*), y la del gen 16S ARN del Dominio *Bacteria* y *Archaea*. Además, se midió el flujo neto de CH₄ y N₂O, mediante el método de cámaras estáticas, y se monitoreó pH, humedad y concentración de amonio y nitrato del suelo. Se seleccionaron sistemas arroceros con distinto grado de intensificación: arroz-pastura, arroz-soja y arroz-arroz. Se realizaron muestreos durante el macollaje, la floración y madurez del arroz, utilizando el ensayo de rotaciones del INIA Treinta y Tres, Unidad Experimental Paso de la Laguna, que comenzó el año 2012. Los resultados permitieron ver diferencias entre los distintos sistemas, principalmente con respecto a las comunidades metanótrofas y metanogénicas. También se observó correlación entre la abundancia de los genes involucrados en la producción y consumo de los gases evaluados y la emisión de los mismos, y entre grupos microbianos relacionados en los ciclos del carbono y del nitrógeno.

Financiamiento: Fondo sectorial Innovagro-ANII.

*Trabajo presentado previamente en otro evento

M1P4. Efecto de la inhibición de la metanogénesis en las bacterias fermentadoras de exudados de plantas de arroz*

Pereira, L.¹; Fernández, A.¹

1-Labortorio de Ecología Microbiana Medioambiental, Departamento de Biociencias, Facultad de Química, UdelaR, Montevideo, Uruguay.

lupereira@fq.edu.uy

Después del dióxido de carbono (CO₂), el metano (CH₄) es el gas que más contribuye al efecto invernadero. Este gas es el producto final de la degradación anaerobia de materia orgánica, donde bacterias hidrolíticas y fermentadoras suministran sustratos a las archaeas metanogénicas responsables de la emisión. El cultivo de arroz es una de las fuentes principales de metano atmosférico debido a que al inundarse se generan condiciones anaerobias en el suelo propicias para el desarrollo de estos microorganismos, contribuyendo hasta con el 19% de las emisiones anuales del mundo. En algunos sistemas metanogénicos la etapa limitante de la producción de metano es la transferencia de sustratos entre bacterias fermentadoras secundarias y archaeas metanogénicas, pero se desconoce si esta limitación ocurre en los cultivos de arroz donde las bacterias y los ácidos fermentables son distintos. El objetivo de este trabajo es determinar los metabolitos que se acumulan en distintas rotaciones de cultivo (arroz continuo, arroz-pasturas y arroz-soja) cuando se suministran compuestos presentes en exudados de plantas de arroz y se inhibe la metanogénesis. Se realizaron ensayos en microcosmos con suelos de cada rotación, suministrando los ácidos succínico y tartárico como sustratos de fermentación. La inhibición de la metanogénesis se realizó con 2-bromoetano sulfonato. Las medidas de metano se realizaron por GC y los metabolitos se midieron por HPLC. Se cuantificó mediante qPCR el gen *mcrA* para archaeas metanogénicas. Los resultados indican que la inhibición de la metanogénesis no impide la fermentación de los exudados por las bacterias presentes en los suelos. Además, se observó que se generaron diferentes intermediarios metabólicos para cada sustrato utilizado. Los metabolitos acumulados no permitieron distinguir el comportamiento de los suelos de las rotaciones de cultivo. Sin embargo, estos suelos se diferenciaron por la cantidad de metano emitido y el número de copias de gen *mcrA*.

Financiamiento: Proyecto CSIC Grupos 976, Proyecto INNOVAGRO FSA 1244.

*Trabajo presentado previamente en otro evento

M1P5. Efecto del inhibidor de la nitrificación Diciandiamida (DCD) sobre las emisiones de Óxido nitroso (N₂O) desde suelos en condiciones de pastoreo

Torres, P.¹; Federici, M.¹; Ciganda, V.²

¹Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Estación Experimental INIA Las Brujas, Canelones, Uruguay.²Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay.

ptorres@inia.org.uy

El uso de inhibidores de la nitrificación (IN), como la diciandamida (DCD), se ha descrito como una técnica útil para reducir las emisiones de N₂O desde el suelo, para incrementar la eficiencia de fertilizantes nitrogenados y para reducir las pérdidas por lixiviación de nitratos. Este estudio tiene como objetivo cuantificar el efecto de un inhibidor de la nitrificación (DCD) sobre las emisiones de N₂O provenientes desde parches de orina de bovinos en condiciones de pastoreo. El trabajo se llevó a cabo en INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay, sobre suelos del tipo Brunosol éutrico. Se instalaron dos experimentos, uno sobre campo natural degradado (CND) y otro sobre una pastura implantada (PI) mezcla de festuca y alfalfa, con tres tratamientos: control sin aplicación de orina (C), aplicación de orina de bovinos bajo pastoreo (O), y orina con el inhibidor de la nitrificación (O+DCD). Los niveles de nitrógeno inorgánico en el suelo (N-NO₃⁻ y N-NH₄⁺), el pH y los flujos de N₂O, fueron monitoreados durante un año. Con los datos obtenidos a partir de los perfiles del DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) de fragmentos del gen 16S rDNA, se evaluaron cambios en la estructura de los microorganismos del suelo mediante un análisis de coordenadas principales y se calculó el índice de diversidad de Shannon. Los resultados indican que los máximos flujos de N₂O ocurrieron dentro de los 50 días después de la aplicación de la orina, siendo mayores para el CND. El uso de un inhibidor de la nitrificación (DCD) al suelo no produjo un cambio en la estructura de bacterias del suelo. Los resultados sugieren que el uso del DCD permitiría mitigar los efectos del exceso de N y mitigar las emisiones de N₂O desde los parches de orina bovina.

MÓDULO 2

Microorganismos en la nutrición y promoción del crecimiento vegetal

O1. Roles de los microorganismos en las transformaciones del fósforo orgánico del suelo

Dra. Elena Beyhaut

Plataforma de Bioinsumos
INIA Las Brujas
ebeyhaut@inia.org.uy

El fósforo como nutriente de las plantas participa en la organización celular a través de los fosfolípidos, energía para el metabolismo en la forma de ATP, el desarrollo y numerosas funciones celulares mediante los ácidos nucleicos, y formando parte de señales moleculares intracelulares. El P está presente en el suelo en formas orgánicas e inorgánicas complejas y diversas. Conocer la dinámica de la fracción orgánica del P en el suelo (P_{org}) representa una clave para entender el funcionamiento, la productividad y la resiliencia ambiental de los suelos. Los compuestos orgánicos que contienen P considerados relevantes desde el punto de vista biológico incluyen monoésteres, inositol fosfatos, diésteres y fosfonatos, lo que subraya la necesidad de disponer de metodologías analíticas que permitan caracterizar al P_{org} en sus distintas especies químicas. Por tratarse de transformaciones esencialmente biológicas que ocurren en la interfase suelo-planta-microorganismos, es importante conocer las relaciones estequiométricas entre el P_{org} y los otros elementos (C:N:P), y sus efectos sobre actividades de enzimas como las fosfatasas alcalina y ácida, y las fitasas. La diversidad funcional de la comunidad microbiana del suelo en relación a las transformaciones del P_{org} , y los abordajes metagenómicos en particular, realizan una contribución significativa a la comprensión del ciclo biogeoquímico del P y su sensibilidad a los factores edáficos.

O2. Contribución de los microorganismos a la nutrición vegetal nitrogenada

Dra. Andrea Rodríguez Blanco

Microbiología, Facultad de Agronomía. Av. Garzón 780. Montevideo. Uruguay
andrearb@fagro.edu.uy

El nitrógeno es un nutriente limitante para el crecimiento vegetal por lo que para lograr buenos rendimientos se agrega al suelo en forma de fertilizante. En los últimos años, el Uruguay ha experimentado un crecimiento de la superficie bajo agricultura que viene acompañado de un aumento en la cantidad de fertilizantes utilizados. Gran parte del fertilizante nitrogenado no es utilizado por las plantas, lo que contribuye a la contaminación del suelo, agua y aire. En este contexto, los microorganismos del suelo constituyen una alternativa más favorable desde el punto de vista económico y ambiental ya que tienen el potencial de reducir el uso de fertilizantes y potenciar el desarrollo de una agricultura sustentable. Por un lado, el proceso natural de fijación biológica de nitrógeno, realizado por las bacterias diazótrofos, tiene un papel importante ya que constituye un aporte no contaminante de nitrógeno. Por otro lado, los microorganismos del suelo pueden mejorar la eficiencia de uso del nitrógeno al aumentar la absorción vegetal de este nutriente mediante la producción de fitohormonas o el establecimiento de simbiosis micorrícicas. Una estrategia es el agregado a la semilla o al suelo de microorganismos eficientes mediante el empleo de inoculantes. El país cuenta con una vasta trayectoria en el uso de inoculantes rizobianos para leguminosas y se ha comenzado a incluir en los últimos años otros microorganismos promotores del crecimiento vegetal. Es necesario continuar investigando con el objetivo de seleccionar microorganismos eficientes para cada cultivo y de mejorar algunos aspectos que limitan el uso de estos inoculantes, como el desarrollo de métodos apropiados de inoculación, compatibilidad con agroquímicos, competencia y sobrevivencia en suelo. Otra estrategia, no menos importante, es apostar a prácticas de uso del suelo que contribuyan a mantener saludables a las poblaciones de microorganismos nativos que constituyen un capital importante en nuestros suelos.

O3. Prospección y caracterización de *Bacillus* spp. movilizadores de fósforo del suelo, para el desarrollo de inoculantes microbianos

Martin, N.¹; Beyhaut, E.²; Altier, N.¹; Abreo, E.¹

¹Laboratorio de Bioproducción, ² Laboratorio de Microbiología de Suelos,
Plataforma de Bioinsumos - INIA Las Brujas – Uruguay
nmartin@inia.org.uy

El fósforo (P) es un macronutriente limitante para el desarrollo de los cultivos, en particular las leguminosas que requieren altos aportes para sustentar la fijación biológica del nitrógeno que ocurre en los nódulos. Los suelos del Uruguay presentan niveles de P disponible insuficientes para la mayoría de los cultivos y la estrategia histórica para levantar esta limitante ha sido el agregado de fertilizante fosfatado. Sin embargo, el P agregado como fertilizante se vuelve rápidamente no disponible para las plantas. Dado que los microorganismos del suelo actúan en el ciclo biogeoquímico del P, mediando la fitodisponibilidad de este nutriente, el desarrollo de biofertilizantes en base a éstos representa una alternativa tecnológica para reducir el P agregado al sistema. Con este objetivo, se aislaron cepas de *Bacillus sensu lato* solubilizadoras y/o mineralizadoras de P inorgánico y/o orgánico, respectivamente, a partir de suelo rizosférico, raíces y suelo no rizosférico de 6 sitios sojeros, y de suelo no rizosférico de 5 sitios sin historia previa de este cultivo. Los 181 aislamientos obtenidos se caracterizaron según su capacidad de mineralizar y/o solubilizar el fitato de sodio, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, y una mezcla de fosfatos inorgánicos en proporción similar a la reportada para suelos nacionales ($\text{FePO}_4/\text{AlPO}_4/\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (46:35:19)), en medio sólido (1° Nivel de *screening*). Veinticuatro aislamientos presentaron las capacidades funcionales de interés. Se determinó la actividad mineralizadora y solubilizadora de estas cepas cuantificando la liberación del ion ortofosfato en medio de cultivo líquido, cuya única fuente de P fue orgánica ó la mezcla inorgánica (2° Nivel de *screening*). Nueve candidatos promisorios fueron preseleccionados y caracterizados según su actividad fitasa extracelular, actividad solubilizadora para cada fosfato inorgánico y perfil de ácidos orgánicos secretados para las cuatro fuentes P (3° Nivel de *screening*). Este proceso de selección continuará evaluando atributos como rizocompetencia, y absorción de P por plantas co-inoculadas con rizobios.

Financiamiento: Proyecto Alianzas de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), conjuntamente con las empresas Calister S.A., Lafoner S.A., y Lage y Cía. S.A., el Instituto Pasteur Montevideo y el Instituto Nacional de investigación Agropecuaria (INIA).

O4. Fitasas rizobianas y eficiencia en la utilización de fósforo en la simbiosis *Bradyrhizobium elkanii*-soja en cultivo hidroaeropónico

Cerecetto, V.^{1,2}; Amenc, L.²; Trives, C.²; Teffahi, M.²; Rojas, L.²; Altier, N.¹; Beyhaut, E.¹; Drevon, J.²

¹Laboratorio Microbiología de Suelos, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Las Brujas, Canelones, Uruguay.

²Institut National de la Recherche Agronomique, UMR Ecologie Fonctionnelle & Biogéochimie des Sols et Agroécosystèmes, INRA-IRD-CIRAD-SupAgro, Montpellier, France

vcerecetto@inia.org.uy

La soja (*Glycine max* L. Merr) es el cultivo de mayor área sembrada en Uruguay y uno de los principales productos de exportación. En la última década, ha aumentado el interés en la optimización del proceso de fijación biológica de nitrógeno, con el fin de lograr un aumento en la productividad y mejoras en la sustentabilidad de los sistemas de producción. En Uruguay el 100% del área se siembra inoculada con el inoculante comercial, que contiene dos cepas de *Bradyrhizobium elkanii*: U-1301 y U-1302. El fósforo (P) puede ser un factor limitante de esta simbiosis, por lo que la hipótesis de esta investigación es que las fitasas rizobianas pueden estar involucradas en la adaptación a la deficiencia de P de la planta. Se comparó el crecimiento de dos cultivares de soja, Nidera5909 (N5909) y Santa Rosa532 (SR532), inoculados con *B. elkanii* U-1301 y U-1302 en hidroaerponia, en condiciones de P suficiente y deficiente. Se determinaron el peso seco de la parte aérea (SDW), peso seco de raíces (RDW), peso seco de nódulos (NDW) y número de nódulos (NN). Se realizaron RT-PCR *in situ* de los transcritos fitasa del tipo fosfatasa ácida histidina (HAP) rizobianos en secciones de nódulos de soja inoculada con U-1301. Las plantas inoculadas con U-1301 presentaron mayores valores de SDW, RDW, NDW y NN, en comparación con las plantas noduladas por U-1302, en P suficiente y deficiente. Para el cultivar N5909 la mayor expresión de transcritos HAP bacterianos ocurrió en plantas cultivadas en condiciones de P suficiente, sucediendo lo contrario en el cultivar SR532, donde la mayor expresión ocurre en condiciones de P deficiente. Se concluyó que el cultivar podría influir en el nivel de expresión del gen fitasa HAP rizobiana. Sería interesante estudiar los mecanismos de regulación de la fitasa HAP rizobiana en diferentes cultivares de soja.

Financiamiento: Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) y Fundación Agropolis.

O5. Selección de cepas de rizobios eficientes en la promoción del crecimiento de leguminosas nativas arbóreas a ser incluidas en sistemas agroforestales

Zabaleta, M.¹, Carro, G.², Alonso, A.², Sandes, L.¹, Bizzozero, F.², Platero, R.¹

¹Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable; Montevideo, Uruguay. ²Centro Uruguayo de Tecnologías Apropriadas rplatero@iibce.edu.uy

Introducir componentes arbóreos y otras especies perennes en los sistemas de producción contribuye a mitigar y mejorar la adaptación al cambio climático, mejorar la productividad por aumento de la fertilidad del suelo, fijación de nitrógeno y retención de carbono, proveer alimento y refugio para el ganado y biodiversidad asociada, mejorar la calidad del agua, disminuir riesgos y mejorar ingresos de los agricultores al diversificar sus productos. Las especies de sostén utilizadas en los sistemas agroforestales (SAFs), tienen como principal función nutrir a las especies productivas, utilizándose prioritariamente leguminosas, aunque también especies pioneras de la zona que tengan altos niveles de producción de biomasa. El empleo de cepas de rizobios eficientes en la fijación de nitrógeno (FBN) y promoción del crecimiento de estas especies es clave. En el presente proyecto nos propusimos evaluar y seleccionar cepas de rizobios capaces de promover el crecimiento de especies de leguminosas apropiadas para su incorporación en las SAFs. Para esto, contamos con una colección de rizobios colectados a partir de nódulos de leguminosas nativas. Cada especie de leguminosa fue plantada en macetas de 1L conteniendo tierra sin abonar e inoculadas con uno de los aislamientos a ensayar. Las plantas fueron mantenidas durante 30 días en invernáculo, luego de lo cual fueron transplantadas, evaluándose la altura alcanzada y la presencia y apariencia de los nódulos en sus raíces. Mediante esta metodología se logró identificar cepas de rizobios eficientes en la promoción del crecimiento de 5 especies de leguminosas nativas; *Vacchelia cavens*, *Sesbania punicea*, *Sesbania virgata*, *Mimosa adpresa* y *Mimosa uragüensis*. Los plantines producidos fueron incorporados a las siguientes situaciones prediales: cortinas de viento, suelos degradados y montes de frutales. El diseño planteado permitirá evaluar el efecto que tiene el uso de distintas cepas de rizobio sobre el crecimiento de las leguminosas nativas a nivel de campo.

M2P1. Cambios en la capacidad de aporte de N del suelo dado por el uso de Microgeo® y su influencia sobre el rendimiento en grano y respuesta al agregado de Nitrógeno (N) a V6 en sorgo granífero (*Sorghum bicolor*).

Decker, C.¹; Baeten, A.²; Fassana, N.²; Pereyra, C.²; Hoffman, E.²

¹AGROFUTURO SA, ²UNICAMPO URUGUAY SRL. Paysandú, Uruguay.
cdecker@agrofuturo.com

La productividad de los cereales en actualmente en Uruguay se encuentra fuertemente condicionada por la baja capacidad de aporte de N de los suelos. En este trabajo, se evaluaron los cambios en la capacidad de aporte de N del suelo dado por la fertilización biológica con Microgeo® (Mgeo) (compost líquido continuo -CLC) y respuesta al agregado de Nitrógeno (N) a V₆ en sorgo granífero, en el verano 2016-17. El experimento se ubicó sobre un Brunosol Éútrico Típico, perteneciente a la unidad de suelos Escilda Paullier-Las Brujas. Los tratamientos surgen de la combinación de 4 niveles de N a V₆ (0, 50, 100 y 150 kg de N ha⁻¹) y dos ambientes dados por un testigo sin aplicación y otro con CLC-Mgeo (ocho aplicaciones en tres años, a razón de 150 lt ha⁻¹). Los resultados mostraron una respuesta a CLC-Mgeo, independientemente del N a V₆ de 10 (%) (790 kg ha⁻¹) (P< 0.01). Si bien la interacción no resulto significativa, la diferencia en rendimiento en grano a favor de CLC-Mgeo, se acentuó a nivel del testigo y a bajas dosis de N (17 %), frente a las dosis mayores (6%). La mayor deficiencia nitrogenada sobre el suelo testigo sin CLC-Mgeo se asoció a la mayor respuesta al N (26 kg de grano kg de N⁻¹), en relación al tratado con CLC-Mgeo (18 kg de grano kg de N⁻¹). Los cambios en la EUN estuvieron relacionados con el incremento significativo (P< 0.05) en la cantidad de N absorbida a inicios del llenado de grano (r =0.79) y respondería al incremento significativo (P< 0.01) del PMN del suelo, superior al 25 (%) con CLC-Mgeo. Estos resultados comienzan a generar esperanzas en cuanto al impacto de la mejora de la capacidad de aporte de N, por una vía no convencional.

M2P2. Respuesta al uso de un compost líquido continuo a base de Microgeo® sobre el rendimiento en grano del cultivo de trigo (*Triticum aestivum*), y su relación con la mejora de la capacidad de aporte de N del suelo.

Decker, C.¹; Baeten, A.²; Fassana, N.²; Pereyra, C.²; Hoffman, E.²

¹AGROFUTURO SA, ²UNICAMPO URUGUAY SRL. Paysandú, Uruguay
cdecker@agrofuturo.com

Las cantidades de N necesarias en chacras con más de 10 años de agricultura se han incrementando desde el año 2000 a un ritmo superior a los 10 kg de N ha⁻¹ año⁻¹, hasta los 200 kg de N ha⁻¹. Consecuencia de que a nivel de producción escasamente se alcanza un 60 % de estas dosis, la productividad de calidad del trigo en Uruguay se encuentra limitada por N. Se evaluó el impacto de la fertilización biológica con Microgeo® (Mgeo) (compost líquido continuo –CLC), sobre la capacidad de aporte de N del suelo y el rendimiento en grano de trigo. El experimento se ubicó sobre un Brunosol Éutrico Típico, sobre la unidad de suelos Escilda Paullier-Las Brujas en el 2015. Dado el bajo nivel de P en suelo, los 8 tratamientos surgen de 4 niveles de agregado de P a siembra (0, 50, 75 y 100 kg. de P₂O₅ ha⁻¹), en combinación con un testigo sin aplicación y otro con CLC-Mgeo (dos aplicaciones a 150 lt ha⁻¹ cada una). Sin interacción entre CLC-Mgeo y dosis P, existió un incremento significativo del rendimiento en grano de 12 (%) (P-valor = 0.006), equivalente a 470 kg ha⁻¹ por el uso de CLC-Mgeo. La respuesta a CLC-Mgeo, se asoció positivamente con el incremento del N absorbido a Z 65 (r = 0.76; P < 0.05), equivalente a 25 kg de N ha⁻¹. La mayor cantidad de N absorbido, posiblemente obedezca al incremento en el PMN del suelo de 63% (P < 0.01) (32 vs 52 ppm de N-NH₄, para el testigo y CLC-Mego, respectivamente). En base a información de eficiencia de recuperación aparente del N de los fertilizantes, el incremento de N absorbido adicional provocado por el CLC-Mgeo, equivaldrían a una cantidad similar a 50 kg. de N ha⁻¹ agregado vía fertilización nitrogenada.

M2P3. Aislamiento y caracterización de rizobios endófitos de arroz en distintas rotaciones *

Duarte, C.¹; Rodríguez, A.¹

¹Microbiología, Biología Vegetal. Facultad de Agronomía, Universidad de la República.

Carola2989@gmail.com

Los rizobios son bacterias fijadoras de N₂ capaces de establecer simbiosis con leguminosas. En nuestro país el uso de rizobios como inoculantes es una práctica ampliamente utilizada para el mejoramiento de praderas y para el cultivo de soja. Además de este rol, los rizobios pueden promover el crecimiento vegetal como rizosféricos o endófitos de plantas no-leguminosas. El objetivo del trabajo fue aislar y caracterizar rizobios endófitos de plantas de arroz obtenidas de distintas rotaciones del norte y este del país. La estrategia utilizada consistió en inocular con un macerado de raíces de arroz a distintas leguminosas que sirven como cultivo trampa. De los nódulos formados se aislaron rizobios que se autenticaron inoculando la leguminosa hospedera con un cultivo puro de cada aislamiento. La diversidad se evaluó mediante BOX-PCR. De las plantas de arroz provenientes de Salto, se obtuvieron aislamientos que nodularon soja, lotus y alfalfa. No se aislaron rizobios capaces de nodular trébol blanco. De las plantas de arroz de Treinta y Tres, se obtuvieron aislamientos que nodularon soja y trébol blanco de la rotación soja-arroz; mientras que de las rotaciones pastura-arroz y pradera-arroz se obtuvieron aislamientos que nodularon trébol blanco y lotus. Con excepción de los rizobios que nodularon alfalfa, los aislamientos obtenidos formaron nódulos efectivos en la leguminosa hospedera. En las plantas de arroz de las distintas rotaciones el NMP de rizobios endófitos que nodularon trébol blanco y soja fue bajo (menor a 5 rizobios/g de raíz). El NMP de rizobios endófitos que nodularon lotus varió entre 5 y 6.9x10³/g de raíz, con valores significativamente mayores en plantas de la rotación pradera-arroz. La técnica de BOX-PCR demostró variabilidad genética entre los aislamientos. Algunos aislamientos presentaron igual perfil que las cepas de rizobios empleadas en los inoculantes comerciales que se utilizaron en las distintas rotaciones.

Financiamiento: CSIC proyecto I+D, año 2014.

*Trabajo presentado anteriormente en otro evento

M2P4. Impacto del uso de diferentes cebadores en la abundancia y diversidad de comunidades diazótroficas asociadas a plantas de arroz *

Ghiazza, C.¹; Ferrando, L.¹

1- Laboratorio de Ecología Microbiana Medioambiental, Departamento Biociencias, Facultad de Química, UdelaR, Montevideo, Uruguay.
cghiazza@fq.edu.uy

La fijación de nitrógeno, reducción del N₂ atmosférico a NH₃ (forma asimilable por las plantas) está ampliamente extendida entre los taxones procariotas incluyendo, bacterias y arqueas muy diversas. Sin embargo, el proceso de fijación y el complejo enzimático nitrogenasa que lo lleva a cabo está ampliamente conservado. La subunidad nitrogenasa reductasa está codificada por el gen *nifH*, marcador funcional utilizado en técnicas de biología molecular para caracterizar la diversidad y la ecología de estos microorganismos. Las tasas de fijación de nitrógeno se han asociado tanto con la abundancia como la diversidad del gen *nifH*, y el conocimiento de la estructura y dinámica de la comunidad diazótropa son de gran importancia para comprender este proceso en distintos ecosistemas. Con este fin, se han diseñado diversos cebadores de PCR con el propósito de amplificar la secuencia de estos genes a partir de muestras ambientales. Conforme al relevamiento de cebadores disponibles y análisis *in silico* realizado por otros autores, muchos de los cebadores utilizados no presentan una buena cobertura de la diversidad de secuencias depositadas en las bases de datos, especialmente de microorganismos anaerobios. En este trabajo se evaluaron dos pares de cebadores (PoIF/PoIR y F2/R6) como alternativas metodológicas para comparar la estructura de las comunidades diazótroficas de rizósfera y raíces de arroz de diferentes sistemas agrícolas, utilizando técnicas cuantitativas (qPCR) y de evaluación de la diversidad de comunidades (T-RFLP). Los resultados obtenidos muestran diferencias significativas en la abundancia de genes *nifH* relevada utilizando los diferentes cebadores para muestras de rizósfera y raíces de arroz, tanto para el muestreo en la etapa seca (condiciones aerobias), como inundada (condiciones anaerobias) del cultivo. Sin embargo, la diversidad bacteriana no parece verse afectada por los cebadores utilizados. Para ambos cebadores, las comunidades diazótroficas establecidas en raíces presentan mayor similitud entre sí que aquellas de rizósfera.

*Trabajo presentado previamente en otro evento

M2P5. Estrategias para el análisis genómico de cepas microbianas mineralizadoras de fósforo

Iraola, G.¹; Rego, N.¹; Garaycochea, S.²; Altier, N.²

¹ IPMont; ² INIA;
naltier@inia.org.uy

En el marco del proyecto “Desarrollo de inoculantes para la movilización de fósforo como insumo en la producción agrícola”, se identificaron y seleccionaron microorganismos con capacidad de movilización de fósforo orgánico del suelo que aumentan el crecimiento vegetal y el rendimiento en cultivos de soja. De un *screening* inicial de 181 bacterias, se encontró esta propiedad en cinco cepas de *Bacillus* spp., dos de *Lysinibacillus* spp. y una de *Paenibacillus* spp. Para comprender las bases genéticas-moleculares del fenotipo diferencial, se obtendrán las secuencias genómicas de estas cepas, así como de otras cepas relacionadas no movilizadoras de fósforo. Las secuencias genómicas anotadas se obtendrán siguiendo una estrategia de secuenciación genómica “*shotgun*” en MiSeq, ensamblado y anotación génica. Los datos aquí generados se integrarán con los provenientes de los genomas de la base de datos PATRIC, pudiéndose entonces extender el análisis a todo el género *Bacillus*, lo que permitirá evaluar la estabilidad del fenotipo movilizador de fósforo orgánico en un contexto filogenético. Asimismo, la disponibilidad de las secuencias genómicas, en conjunción con el uso de bases de datos de virulencia microbiana y alérgenos, permitirá una primera aproximación *in silico* al análisis de inocuidad ambiental requerido para el desarrollo de estas cepas como inoculantes.

Financiamiento: Proyecto Alianzas de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), conjuntamente con las empresas Calister S.A., Lafoner S.A., y Lage y Cía. S.A., el Instituto Pasteur Montevideo y el Instituto Nacional de investigación Agropecuaria (INIA).

M2P6. Eficiencia simbiótica y capacidad competitiva de cepas de rizobios que nodulan soja en suelos con y sin historia del cultivo

Lagurara, P.¹; Echenique, V.¹; Rodríguez, N.¹; Beyhaut, E.²; Montañez, A.³; Sicardi, M.³; Rodríguez-Blanco, A.¹

¹ Facultad de Agronomía, UDELAR; ² Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA Las Brujas), ³ Facultad de Ciencias, UDELAR
plagurara@gmail.com

La soja (*Glycine max* L. Merr) es el principal cultivo de grano en Uruguay, con un área sembrada de 1.300.000 há. y en continua extensión hacia suelos no tradicionalmente agrícolas. Es un cultivo que se inocula con inoculantes formulados con dos cepas de *Bradyrhizobium elkanii* (U1301/U1302). En Uruguay, la información sobre el comportamiento en el suelo de las cepas no está actualizada. Los objetivos generales son determinar la persistencia, capacidad competitiva y eficiencia simbiótica de las cepas de rizobios empleadas en nuestro país en suelos con y sin historia del cultivo; así como también detectar la presencia de cepas naturalizadas que nodulen soja. Para alcanzar los mismos se utilizaron ensayos de campo en la zafra 2012-2013, que incluyeron 2 variedades de soja y cepas de rizobios (U1301, U1302, y *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA5080 y E109). Además, se realizaron muestreos de campo en predios comerciales con y sin historia previa de soja, y se instaló un ensayo de invernáculo. Se determinó identidad de rizobios ocupantes de nódulos (técnica de rep-PCR) y eficiencia-simbiótica (biomasa aérea, radicular y nodular). A partir del análisis de los perfiles genéticos de 315 aislamientos obtenidos de los ensayos de campo, se vio que la cepa SEMIA5080 estaba presente en la mayoría de los nódulos cuando se la inoculaba en conjunto con la U1301, en predios con y sin historia del cultivo. Este resultado también se observó cuando se analizaron 40 aislamientos de nódulos colectados en la zafra 2016 en predios con historia, pero sin inocular. En todos los predios en estudio se obtuvieron aislamientos de cepas naturalizadas cuyo perfil genético es distinto al de las cepas comerciales. La eficiencia simbiótica analizada para el ensayo en invernáculo, mostró valores mayores de biomasa aérea y radicular cuando las plantas se inocularon con la cepa SEMIA5080, sola o en mezcla con la U1301.

Financiación: Fondos de investigación Aplicada Maria Viñas – ANII 2014

M2P7. Generación de un bioinoculante en base a hongos autóctonos solubilizadores de fosfato a nivel de laboratorio

Machado, F.¹; Umpierrez, M. ¹; Sanguinetti, C.¹; Achigar, R. ¹

¹ Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ingeniería, Universidad ORT Uruguay
machado@ort.edu.uy

El fósforo es el segundo macronutriente fundamental para las plantas. A pesar de encontrarse ampliamente distribuido en los suelos es poco accesible para las mismas, ya que se encuentra en forma insoluble. Debido a esto, el objetivo de este trabajo es la generación de un bioinoculante en base a hongos solubilizadores de fosfato capaz de promover el crecimiento vegetal. Para ello, se aislaron, identificaron y caracterizaron, según su capacidad solubilizadora de fosfato, diferentes hongos de varias zonas del país. Se evaluó la fitopatogenicidad y promoción del crecimiento vegetal del aislamiento más prometedor (E12), y, por último, se generó una metodología de producción industrialmente escalable. Con respecto a la solubilización de fosfato, de los 57 aislamientos obtenidos, 3 fueron capaces de solubilizar fosfato tricálcico y fosfato de roca de forma preponderante (84 % y 100 % respectivamente). Asimismo, demostraron ser capaces de solubilizar fosfato tricálcico de forma sustancial cuando se los sometió a diversos estresores (deseccación, estrés osmótico y estrés térmico). En relación a la actividad enzimática, los tres aislamientos más prometedores demostraron poseer una actividad fosfatasa y fitasa significativamente igual o incluso mayor a la del control (*Penicillium bilaiae*). Con respecto a la fitopatogenicidad del aislamiento E12, se demostró que semillas de soja, trigo, sorgo, lotus y maíz no disminuyen su germinación al ser inoculadas con él. Asimismo, dicho aislamiento demostró ser capaz de promover el crecimiento vegetal en soja en un 59 % y 15 % bajo condiciones controladas y ambientales respectivamente. Por último, se logró generar una formulación industrialmente escalable a partir de esporas fúngicas capaz de mantener la viabilidad en el tiempo bajo condiciones de almacenamiento. Como conclusión, se puede indicar que se logró generar un bioinoculante promotor del crecimiento vegetal capaz de ser escalado a nivel industrial.

M2P8. Herramientas moleculares aplicables a *Cupriavidus*: β -rizobio promotor del crecimiento vegetal

Ocampo, F.; Rodriguez, C., Sandes, L., Platero, R.

Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas,
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.
focampo86@gmail.com; rplatero@iibce.edu.uy

Los rizobios son bacterias del suelo capaces de asociarse simbióticamente con plantas leguminosas, llevando a cabo la fijación biológica de nitrógeno (FBN). En la agricultura, son empleados como fertilizantes biológicos, que, a diferencia de los químicos, promueven el crecimiento de los cultivos sin contaminación ambiental. Los procesos de establecimiento de la simbiosis son bien conocidos en rizobios del orden *Rhizobiales* (alfa-rizobios). Contrariamente existe escasa información sobre los mecanismos implicados en asociaciones que involucran beta-rizobios. En Uruguay, se han hallado rizobios pertenecientes a los géneros *Burkholderia* y *Cupriavidus* asociados a diversas leguminosas nativas. El estudio de estos β -rizobios puede promover el desarrollo de nuevas tecnologías a favor de la producción agrícola y forestal. El modelo de este estudio es la cepa UYMMa02A, aislada de nódulos de *Mimosa magentea* colectada en el país. Mediante análisis filogenéticos se demostró que pertenece al género *Cupriavidus*, pero no coincide con ninguna especie antes descrita. La secuenciación del genoma evidenció un grupo de genes homólogo al operón *nod*, responsable del proceso de nodulación en otros rizobios. Con la finalidad de avanzar en la caracterización de los procesos involucrados en la interacción beta-rizobios-*Mimosa*, se propuso poner a punto herramientas moleculares que permitan evaluar la función de genes seleccionados. Se implementó un sistema de recombinación homóloga para generar mutantes por delección, y se crearon vectores para estudiar la dinámica de expresión de genes presuntamente implicados en la nodulación. Estas son nuevas herramientas moleculares aportadas a la comunidad científica que permitirán avanzar en el estudio de la interacción entre β -rizobios y leguminosas hospederas.

Agradecimientos: IIBCE, PEDECIBA, ANII, FCE.

M2P9. Bradirizobios pre-incubados con flavonoides: una estrategia para mejora del rendimiento en cultivos de soja*

Riviezzi, B.¹; Cagide, C.¹; Herrmann, C.²; Lombide, R.²; Castro-Sowinski, S.^{1,3}; Morel, MA.¹

¹ Microbiología Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE). Av. Italia 3318, 11600, Montevideo, Uruguay. ² LAGE y Cía. S.A. Cno. Carrasco 6948, 11500 Montevideo, Uruguay. ³ Sección Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias, UdelaR, Iguá 4225, 11400, Montevideo, Uruguay.
braulioriviezzi94@gmail.com

La soja (*Glycinemax*), un cultivo altamente demandante de nitrógeno, puede obtener este nutriente por fijación biológica de nitrógeno (FBN) cuando se asocia simbióticamente con bradirizobios. Esta asociación es el resultado de una comunicación a nivel molecular entre microorganismos y plantas, y lleva a la formación de nódulos radicales donde ocurre el proceso de FBN. Los flavonoides exudados por las raíces, cumplen un rol clave en el inicio de este diálogo molecular, pues desencadenan la producción de factores de nodulación por los rizobios (y finalmente la formación de nódulos). Nuestros objetivos fueron evaluar el efecto de pre-incubar bradirizobios con flavonoides sobre la nodulación y el rendimiento de soja en condiciones de invernáculo, y la sobrevivencia de los bradirizobios sobre las semillas inoculadas. Las semillas se inocularon con *Bradyrhizobiummelkanii* U1301 y U1302 crecidos en presencia y ausencia de flavonoides. Se cosecharon plantas en tres estadios de crecimiento: cuarto nudo (V4), floración completa (R2) y madurez fisiológica (R8). En V4 y R2 se analizó el peso seco (PS) de parte aérea (PA) y raíz, el largo de PA, y número y PS de nódulos. En R8 se analizó la biomasa aérea, el número y peso de chauchas y granos, e índice de cosecha. Los datos se sometieron a análisis estadístico. Se observó que el agregado de flavonoides no afecta la adherencia ni sobrevivencia de los bradirizobios sobre las semillas, y que incrementa la biomasa aérea seca y el número y PS de nódulos en raíces secundarias de plantas en R2. En R8 produjo un mayor número de chauchas y granos, en relación a las semillas inoculadas con bradirizobios sin pre-tratamiento. Estos resultados sugieren que algunos metabolitos involucrados en la comunicación microorganismo-planta pueden ser útiles para la mejora de los inoculantes tradicionales.

Financiación: PIEP (MIEM) y LAGE y Cía. S.A.

*Trabajo presentado previamente en otro evento

M2P10. Descripción de nuevos rizobios adaptados a leguminosas nativas

Sandes, L.¹; Garabato, F.¹; Rodríguez, C.¹; Estrada de los Santos, P.²; Platero, R¹.

¹Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable; Montevideo, Uruguay. ²Laboratorio de Biotecnología Microbiana, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional; Ciudad de México, México.
lsandes@iibce.edu.uy

En la actualidad la producción de alimentos provenientes del campo se incrementa día a día para poder satisfacer el aumento de la demanda de la población mundial. El aumento de la producción exige a su vez, cada vez más nutrientes del suelo por lo que es fundamental aplicar prácticas de conservación si queremos mantener este recurso. En particular, la inclusión de leguminosas en los esquemas de rotación y planes de uso de suelo es una práctica de conservación ampliamente reconocida y aplicada ya que las leguminosas tienen la capacidad de asociarse simbióticamente con bacterias del suelo, llamadas rizobios, capaces de realizar el proceso de fijación biológica de nitrógeno (FBN). La FBN provee el nitrógeno necesario para el crecimiento y desarrollo de las leguminosas permitiendo que estas especies sean utilizadas tanto en la producción de alimentos como para la recuperación de suelos degradados. Para poder utilizar con éxito a las leguminosas, es imperativo conocer en profundidad su capacidad para asociarse simbióticamente con los rizobios así como la identidad y características de estas bacterias. El conocimiento completo sobre una especie bacteriana requiere un enfoque multidisciplinario en el cual se describen sus características fenotípicas y genotípicas y se comparan con las especies tipo más cercanas. En el presente proyecto proponemos la caracterización de nuevas cepas de rizobios aisladas de leguminosas nativas. La descripción de estas nuevas especies contribuirá a incrementar el conocimiento sobre la diversidad y riqueza de microorganismos simbióticos en el grupo de los beta-rizobios y en particular en el género *Cupriavidus* presentes en los suelos de nuestro país. Los datos que se generen podrán contribuir al diseño de estrategias que permitan un aprovechamiento sustentable de los recursos naturales y de su conservación para poder así obtener un mejor equilibrio en el medio ambiente.

M2P11. Efecto de la co-inoculación de *Bacillus s.l.* promotores del crecimiento vegetal con *Bradyrhizobium elkanii* sobre la nodulación en plantas de soja

Torres, P.¹, Beyhaut, E.¹, Altier, N.¹, Abreo, E.¹

¹Plataforma Bioinsumos-INIA Las Brujas, Canelones, Uruguay
ptorres@inia.org.uy

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) promueven el crecimiento de las plantas a través de la producción de hormonas, el ciclado de nutrientes y la inhibición de patógenos. En leguminosas, la co-inoculación de rizobios con PGPR debe además ser compatible con los rizobios y con los procesos de nodulación. El objetivo de este trabajo fue caracterizar una selección de 11 cepas de *Bacillus s.l.* capaces de mineralizar P orgánico, por factores asociados a la promoción del crecimiento vegetal y evaluar el efecto de su co-inoculación en semillas de soja (*Glycine max*) con *Bradyrhizobium elkanii* (U-1301 y U-1302). El experimento se llevó a cabo bajo condiciones de invernáculo, se utilizaron 10 macetas por cada cepa de *Bacillus s.l.*, con 2 plantas cada una. Se sembraron semillas de soja pre-inoculadas con rizobios, sobre las que se aplicó 1 mL de una suspensión de esporas a una concentración de 1×10^6 . Como controles negativos se usaron semillas inoculadas sólo con rizobios y semillas sin inocular. Las plantas se cosecharon a los 30 días, y se evaluó peso seco de la parte aérea, número de nódulos y biomasa nodular de la raíz principal y secundaria. Se evaluó a las cepas por su capacidad de producir ácido indolacético (AIA), presencia de la enzima ACC desaminasa, movilidad y formación de biofilm. Los resultados indican que 8 cepas produjeron AIA variando de 2,21 a 53,13 ppm, 4 fueron positivas para la enzima ACC desaminasa, todas las bacterias realizaron *swimming*, 6 realizaron *swarming* y 4 fueron formadoras de *biofilm*. En el ensayo con plantas se observó un efecto positivo en la formación temprana de nódulos en soja, ya que las plantas presentaron un mayor número de nódulos a los 30 días. Se plantea conocer la relación entre las características de las cepas y la nodulación observada.

Financiamiento: Proyecto Alianzas de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), conjuntamente con las empresas Calister S.A., Lafoner S.A., y Lage y Cía. S.A., el Instituto Pasteur Montevideo y el Instituto Nacional de investigación Agropecuaria (INIA).

MÓDULO 3

Bioproducción de microorganismos para la protección vegetal

O1. An overview on the development and use of invertebrate pathogenic fungi in Brazil

Dr. Rogerio Biaggioni Lopes

Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Brazil

rogerio.lopes@embrapa.br

One of the greatest challenges for the current agricultural model is the reduction of the use of chemical pesticides. The cost of developing new chemical molecules has increased dramatically in the last decades. The average time to develop a new pesticide by the agrochemical companies is around nine years from the synthesis to the commercialization, and approximate cost of US\$ 200 million per product. On the other hand, the world market of biological control agents, which is estimated at over US\$ 1.9 billion, can reach US\$ 6 to 7 billion in 2020. While the sales of agrochemicals grow around 6% per year, biological control based-products grow near to 15%. In Brazil, sales of biological products (including macro and microorganism) for the control of insect pests and plant pathogens were between US\$ 65 and 75 million in 2010, around 2% of all marketed pesticides. It is estimated that the area treated annually in Brazil with biological control agents is around 8 to 10 million hectares. Microbial pesticides have been considered as potential candidates to substitute or to reduce the use of chemical pesticides since late 20th century. Indeed, the interest of growers on biological products has increased, leading to the emergence of some cottage industries in Brazil. However, microbial products still represent a limited slice of the total pesticide market in the country. It is noteworthy that mycopesticides (products based on invertebrate pathogenic fungi) attained successfully some specific niches, either by their environmental friendly feature or because of their competitive costs. On the other hand, low quality and short shelf-life of unformulated products and inconsistent results under field conditions have been seen with an undesirable frequency. Biopesticides efficacy and persistence can be considerably increased by the development of appropriate formulations and use of packaging techniques. In this seminar, some of the recent studies carried out by our team in Brazil on mass production and formulations of conidial based mycopesticides will be briefly presented.

O2. Harvesting the power of entomopathogenic and beneficial fungi through liquid culture fermentation technology

Dr. Gabriel Moura Mascarin

Embrapa Environment, Brazil
gabriel.mascarin@embrapa.br

Biopesticides have been striving as the “new green revolution” and are expected to reach approximately 4.4 billion USD by 2019 of the total global pesticide market. Mass-production and formulation technologies coupled with selection of effective and genetic stable microbial strains play pivotal roles in ensuring cost-effective and robust microbial biopesticides. Although solid-substrate produced conidia remain the predominant propagule used as mycopesticides in the world, liquid-cultured propagules consisting of blastospores or microsclerotia are gaining interest for the biocontrol of above and below ground pests. In this presentation, I will briefly demonstrate some advances made by our international team regarding liquid culture fermentation and stabilization processes for production of these fungal biocontrol agents. In this sense, our focus has been directed to develop liquid fermentation processes coupled with drying and stabilization strategies that provided high yields of viable propagules of major fungal-based pesticides including *Trichoderma* spp., *Beauveria* spp., *Isaria* spp., *Metarhizium* spp., *Lecanicillium* spp. Understanding and manipulating nutritional and environmental conditions during liquid culture production are critical to select suitable, high-quality fungal propagules such as blastospores and microsclerotia, which are desiccation tolerant, shelf-stable and effective to their specific pest targets. More recently, we have developed a method to mass-produce blastospores of *Beauveria* spp. and *Isaria* spp. and microsclerotia of *Trichoderma* spp. using deep-tank fermentation processes. These blastospores and microsclerotia, once stabilized through dehydration, presented extended shelf-life and exhibited excellent effectiveness against certain pest targets. We believe that this low-cost, high yielding production technology will definitely support the widespread commercial use of fungal biopesticides for arthropod and plant disease control.

O3. Experience of a global biological company in plant care market

Ing. Agr. Jean Marc Sanchez

LALLEMAND PLANT CARE

jmsanchez@lallemand.com

Lallemand was founded in Montreal at the end of the 19th century by Fred "Lallemand," a young immigrant from Germany. Although Lallemand had focused on the production of yeast for the North American baking industry in the early 20th century, by using the acquired knowledge and the technological assets in microbiology and fermentation as a base, Lallemand has come to serve the needs of other industries through the production of specialty yeast, fungus and bacteria, and their derivatives. Today, Lallemand is present on all 5 continents with more than 3500 employees and 42 plants. The company is organized into 11 technically-driven business units focusing on various applications of yeast, fungus and bacteria in baking, fermented beverages, human and animal nutrition, fuel ethanol, pharma and plant care. In 2006, Lallemand has started a new business unit Lallemand Plant Care to serve crop production and supply farmers with microbial solutions as fertilizer, plant growth promoter or plant protection products. Using sound science and empirical knowledge, Lallemand Plant Care selects and develops the right strain for the right applications to ensure the greatest impact for its customers. The evolution to the plant domain was natural: as with animals and humans, microbes play an important role in plant health, nutrition and performance. Facing main challenges to develop microbial solutions for crops, Lallemand Plant Care continue to invest more than 15% of its sales in R&D and technical development.

O4. Levaduras en estrategias de control biológico de hongos patógenos

Garmendia, G.; Gonda, M.; Arrarte, E.; Alvarez, A.; Vero, S.

Laboratorio de Biotecnología. Área Microbiología. Departamento de Biociencias.
Facultad de Química. UdelaR.
svero@fq.edu.uy

El presente trabajo abarca las líneas de investigación en control biológico que nuestro grupo ha llevado adelante con el uso de levaduras como agentes de biocontrol. A raíz de dichos estudios se cuenta en la actualidad con varias cepas de levaduras psicrotolerantes, capaces de inhibir en más del 75% el desarrollo de patógenos de manzana durante el almacenamiento postcosecha en cámara fría. Dichas levaduras han sido identificadas en forma polifásica y se han caracterizado de forma de determinar los posibles mecanismos de acción implicados en el biocontrol. Se mostrarán también los resultados obtenidos en el control biológico de *Aspergillus flavus* en diferentes matrices con el uso de levaduras provenientes de kefir. La presencia de una cepa de *Pichia membranifaciens* se evidenció como fundamental en el biocontrol, lográndose reducir en 100 veces el crecimiento del hongo determinado por PCR en tiempo real.

Financiamiento: CSIC, ANII, Pedeciba Química

05. Control biológico de *Diaphorina citri* con *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*

Corallo, B.¹; Pechi, E.²; Asplanato, G.²; Bettucci, L.¹; Tiscornia, S.¹

¹Facultad de Ciencias, UdelaR; ²Facultad de Agronomía, UdelaR
belencfabiano@gmail.com

Diaphorina citri es considerada una plaga importante a nivel mundial debido a que es el vector de la bacteria *Candidatus Liberibacter* spp. que causa la enfermedad de Huanglongbing (HLB). Esta es la más destructiva a nivel de los cítricos y se encuentra presente en la región, sin embargo, en Uruguay no se ha reportado la presencia del HLB. El objetivo de este trabajo fue seleccionar cepas de hongos entomopatógenos eficientes para controlar a *D. citri* en plantaciones de cítricos. Se utilizaron dos cepas de *Beauveria bassiana* y una de *Metarhizium anisopliae* aisladas a partir de insectos colectados en Uruguay y se evaluó la virulencia sobre individuos de *D. citri* en condiciones de invernadero y condiciones de semicampo. Esporas de dichas cepas se aplicaron mediante aspersión sobre plantines con *D. citri* y se cuantificaron las ninfas y adultos infectados. Se determinó la viabilidad de los conidios a diferentes temperaturas y en presencia de oxiclورو de cobre, abamectina y aceite mineral. Además, se evaluó el efecto de los hongos entomopatógenos sobre enemigos naturales de *D. citri* *in vitro*. Para ello se aplicó mediante aspersión sobre individuos de dos especies de coccinélidos y una especie de crisópidos, contabilizando los individuos infectados. En invernadero la mortalidad de *D. citri* fue mayor a la observada en condiciones de semicampo, siendo para este último 79% con *M. anisopliae* y 51% con *B. bassiana*. La viabilidad de los conidios fue alta entre 20 y 30°C. La mayoría de los productos químicos evaluados, afectaron la germinación, el crecimiento micelial o la esporulación de los hongos en las dosis que son aplicados. No se observó un efecto significativo de los hongos sobre coccinélidos y crisópidos. Debido a estos resultados se seleccionó la cepa de *M. anisopliae* para los ensayos de bioproducción y evaluación a campo.

Financiamiento: INIA-FPTA

O6. Selección y producción de hongos entomopatógenos para el control de la chinche del eucalipto: resultados y desafíos

Abreo, E.²; Simeto, S.¹; Mattos, N.²; Dini, B.²; Corallo, B.³; Lupo, S.³; Bettucci, L.³; Gómez, D.⁴; González, P.¹; Martínez, G.¹; Rivas, F.²; Altier, N.²

¹Programa Nacional de Investigación en Producción Forestal, INIA Tacuarembó, Uruguay;

²Programa Nacional de Investigación en Sustentabilidad Ambiental, Sección Bioinsumos, INIA

Las Brujas; ³Facultad de Ciencias/Ingeniería, Laboratorio de Micología, Universidad de la

República, Montevideo; ⁴School of Forest Resources and Conservation, U. of Florida, USA.

eabreo@inia.org.uy

El uso de hongos entomopatógenos como agentes de control biológico es visto como una alternativa factible para el manejo de plagas forestales ya que el control químico es escasamente utilizado debido a sus desventajas ambientales y económicas. El presente trabajo tiene como objetivo el desarrollo de bioinsecticidas a partir de la búsqueda, evaluación y bioproducción de hongos entomopatógenos para el control de *Thaumastocoris peregrinus*. Si bien la producción de hongos entomopatógenos es generalmente realizada sobre un sustrato sólido, este sistema es difícilmente escalable, requiere mucho trabajo manual y es propenso a contaminaciones. Otra opción es la multiplicación del hongo en medio líquido con agitación. Esta estrategia permite acortar los tiempos productivos y es más fácilmente escalable. Sin embargo, no todas las especies fúngicas producen propágulos cuando crecen en medio líquido, y los propágulos producidos son diferentes a los conidios naturalmente infectivos producidos en medio sólido. En este trabajo, se estudió la capacidad de cepas de *Beauveria bassiana*, preseleccionadas por su virulencia, de ser producidas en medio líquido con agitación. Los aislamientos seleccionados fueron evaluados por su capacidad de producir propágulos sumergidos en medio líquido. Para ello, se cuantificó la capacidad de los mismos de crecer y producir esporas en suspensiones de harina de soja, maíz y arroz y se seleccionó la mejor combinación cepa/harina que asegurase alta productividad y mantenimiento de la capacidad de matar de los propágulos. Tres de las 6 cepas alcanzaron 10^8 propágulos por ml (5^9 propágulos/g de harina) en la suspensión de las tres harinas evaluadas. La CL50 de los formulados deshidratados y envasados al vacío fue similar a la CL50 de los conidios aéreos.

M3P1. Factores de patogenicidad de *Bacillus s.l.* y *Serratia* spp. en *Argyrotaenia sphaleropa* (Meyrick 1909) (Lepidoptera: Tortricidae): resultados preliminares

Abreo, E.¹, Valle, D.², Silvera, M.², Rivas, F.¹, Mujica, V.², Mattos, N.¹, Dini, B.¹, Altier, N.¹

¹ Laboratorio de Bioproducción, ² Laboratorio de Entomología
Plataforma de Bioinsumos, INIA las Brujas
eabreo@inia.org.uy

Argyrotaenia sphaleropa es una especie nativa de lepidóptero que afecta manzanos, perales y vides, dañando hojas y la superficie de los frutos. Su importancia ha resurgido cuando la aplicación de químicos ha sido parcialmente sustituida por estrategias de confusión sexual, desarrolladas para otras especies. El objetivo de este trabajo fue caracterizar una colección de bacilos formadores de endospora (*Bacillus s.l.*) y aislamientos del género *Serratia*, evaluando su patogenicidad en *A. sphaleropa*. Los aislamientos se identificaron mediante la amplificación por PCR de los genes 16S y gyrB, secuenciación de los productos obtenidos y análisis filogenético. En los aislamientos de *Bacillus* se observó la producción de cristales (proteínas cry) mediante azul de Coomassie. Todos los aislamientos se evaluaron por expresión de otros factores de virulencia como movilidad, capacidad de formar *biofilm*, actividad hemolítica y fueron fenotipadas con los kits API ZYM y API20E. La patogenicidad hacia larvas de *A. sphaleropa* de segundo estadio se evaluó mediante el suministro de dieta inoculada con una suspensión de esporas (*Bacillus*) o de células vegetativas (*Serratia*) y el registro de individuos muertos a los 7 días. Larvas de *Bombix mori* fueron tratadas por vía oral o mediante inyección subepidérmica para verificar el modo de acción de los diferentes aislamientos. Entre los *Bacillus*, las cepas que produjeron mayor mortalidad en *A. sphaleropa* pertenecieron a *Lysinibacillus xylaniliticus*, *B. thuringiensis*, *B. pumilus* y *B. aryabhatai*. Entre las especies de *Serratia*, *S. marcescens* y *S. ureilytica* difirieron del control. En el caso de *B. mori* ninguna de las cepas resultó ser patogénica por vía oral, pero si lo fueron en distinto grado al ser inyectadas en el hemocele. Estos resultados permiten suponer que la mortalidad producida por las cepas de *L. xylaniliticus*, *B. thuringiensis*, *B. pumilus* y *B. aryabhatai* se encuentra asociada a factores de patogenicidad diferentes a las proteínas cry.

Financiamiento: Proyecto INIA SA_24

M3P2. Uso de endófitos comerciales (AR584) para el control de insectos plaga de festuca en Uruguay

Cibils-Stewart, X¹; Lattanzi, F¹; Gonzalez, A¹; Calistro, P¹; Popay A.J.²

¹ Programa de Investigación en Pasturas y Forrajeras, INIA La Estanzuela, Uruguay

² Biocontrol and Biosecurity, AgResearch, Hamilton, New Zealand.

xcibils@inia.org.uy

La festuca, *Festuca arundinacea* Schreb, es la gramínea perenne más extensamente utilizada en pasturas cultivadas en nuestro país (Formoso, 2011). Al igual que muchas especies pertenecientes a la subfamilia Pooideae, la festuca se asocia con hongos simbióticos conocidos coloquialmente como "endófitos", Epichloë (Ascomycota: Clavicipitaceae). Dichos simbiosistas, reciben nutrientes de la planta, proporcionándole a cambio protección, mediante la expresión de alcaloides. Los alcaloides le brindan a la planta protección frente al estrés biótico (ganado, insectos) y abiótico (temperatura, exceso/falta de agua). Consecuentemente, AgResearch en Nueva Zelanda ha desarrollado "endófitos nobles", los cuales sólo expresan alcaloides amigables a los mamíferos (Ascomycota: Clavicipitaceae AR584). Recientemente, estos "endófitos nobles" han sido introducidos en material uruguayo; cultivares INIA Fortuna y INIA Aurora, bajo un acuerdo entre INIA - AgResearch - PGG Wrightson. Por lo tanto, y debido a que dicha tecnología implica un costo adicional en el acopio de la semilla, las implicaciones agronómicas de estas asociaciones y sus aspectos positivos y negativos deben ser estudiadas cuidadosamente para los sistemas uruguayos de eco-producción en particular. Asimismo, el objetivo de este trabajo fue evaluar el comportamiento de dichas variedades con la introducción de AR584 frente a plagas foliares (*Rhopalosiphum padi*, *Pseudaletia adultera*) y de suelo (*Diloboderus abderus*). Con este fin, se realizaron ensayos de antibiosis y antixenosis en condiciones controladas de laboratorio e invernáculo. Un total de cuatro tratamientos fueron evaluados: Aurora, Aurora (AR584), Fortuna, y Fortuna (AR584). Resultados preliminares indican que los endófitos aumentan la tolerancia de festuca frente a insectos; AR584 tiene un impacto negativo en la biología de los insectos plaga utilizados.

Financiamiento: INIA - AgResearch - PGG Wrightson

M3P3. Implementación de la técnica de PCR para la detección de *Cydia pomonella* Granulovirus (CpG) en bioinsecticidas comerciales

Etchevers, A.¹; Castillo, E.²; Méndez, S.¹

¹Laboratorios Biológicos-DGSA ²Sección Bioquímica- Facultad Ciencias
aetchevers@mgap.gub.uy

La DGSA, responsable del registro de productos fitosanitarios, necesita aplicar técnicas confiables, sensibles y específicas de detección de CpG en formulaciones comerciales por lo que en conjunto con la Facultad de Ciencias ha logrado ese cometido. *Cydia pomonella* (L), o carpocapsa, es una de las plagas más importante de los cultivos de pepita en el mundo. Su daño genera pérdidas directas en la economía y limitaciones en el acceso de nuestra producción a nuevos mercados y a los destinos tradicionales. El objetivo del trabajo fue implementar la técnica de PCR (tiempo final) para identificar CpG, utilizado como agente de control biológico microbiano para esta plaga, en bioinsecticidas comerciales. Para la metodología de detección de CpG se pusieron a punto: el protocolo de extracción de ADN, la técnica de PCR y la secuenciación de los productos obtenidos. Los cebadores se diseñaron para amplificar dos fragmentos de genes característicos de CpG. Estos genes codifican dos proteínas denominadas catepsina (Cat) y granulina (Gran). Como resultados se optimizó un protocolo de extracción de ADN, y se ajustó la técnica de PCR. Se observaron en gel de agarosa las bandas esperadas para los productos de PCR Cat: 491 pb y Gran: 430 pb. Los amplicones se secuenciaron en el Instituto Pasteur concluyendo que una de las secuencias corresponde a parte del gen de la proteína Gran y la otra a parte del gen de la proteína Cat. Se validó la técnica por repetibilidad y reproducibilidad, y se está aplicando desde el año 2009 a la fecha en el Área Virología para identificación por PCR de CpG en bioinsecticidas para su registro.

M3P4. Control biológico de *Aspergillus flavus* en mini silos de sorgo*

Gonda, M.¹; León Peláz, A.²; De Antoni, G.²; García y Santos, C.³;
Caterina Rufo, C.⁴; Vero, S.¹

1-Cátedra de Microbiología, Facultad de Química, UdelaR, Uruguay. 2- Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, La Plata, Argentina. 3- Área de Toxicología, Facultad de Veterinaria, UdelaR, Uruguay. 4- Instituto Polo Tecnológico de Pando, Facultad de Química, UdelaR, Uruguay.

mgonda@fq.edu.uy

Los silos pueden presentar el problema de contaminación fúngica, lo cual es un potencial riesgo para la salud animal ya que los hongos contaminantes pueden ser productores de micotoxinas. Uno de los contaminantes más frecuentes en silos de sorgo en Uruguay se identificó como *Aspergillus flavus*, especie conocida como productora de aflatoxinas. Para inhibir el crecimiento de hongos en los silos se utilizan diversas estrategias, una de las cuales es el uso de control biológico. En este contexto es interesante estudiar a los microorganismos presentes en gránulos de kefir como controladores biológicos. Los gránulos de kefir están formados por bacterias ácido lácticas y levaduras embebidas en una matriz de polisacáridos. El kefir de agua (KA) es una bebida producida por fermentación de soluciones azucaradas utilizando estos gránulos. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la capacidad de microorganismos presentes en kefir de agua de controlar *Aspergillus flavus* en mini silos de sorgo. El sorgo para ensilar se trató con KA y KA libre de células (filtrado por membrana de 0.45 micras). A su vez, se realizó un control con agua. El sorgo tratado se secó a 60°C hasta obtener una humedad entre 23% y 40% y se inoculó con una suspensión de *A. flavus*. El ensilado se realizó en tubos de 15mL con un filtro esterilizante en la tapa para permitir la entrada de aire. Los mini silos se incubaron por 7 días a 25°C. El crecimiento de *A. flavus* se cuantificó por PCR en tiempo real. Los resultados mostraron que los microorganismos presentes en el KA fueron capaces de controlar el crecimiento de *A. flavus* en el mini silo, mientras que la solución libre de células no fue efectiva.

Financiamiento: CSIC

*Trabajo presentado previamente en otro evento

M3P5. Producción e introducción de *Beauveria bassiana* para el control de mosca blanca en el tomate bajo invernáculo, una herramienta hacia el manejo integrado de enfermedades y plagas*

Hernández Rodríguez, L.^{1,2}; González Rabelino, P.²; Bao, L.²; Peirano, Z.¹; Curbelo, Y.¹; Martínez, E.³; Fasiolo, C.³; Vieta, A.⁴; Godín, A.⁴; Banchemo, L.⁴; Galván, GA.²; Campelo, E.⁴

¹ Sociedad Fomento Rural Los Arenales. Ruta 81 km 60,5, Los Arenales, Canelones. Email: lauraher21@gmail.com. ² Departamento de Protección Vegetal y Departamento de Producción Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de la República. ³ Estación Experimental W. Ferreira Aldunate, Las Brujas, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). ⁴ Dirección Nacional de la Granja, Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (DIGEGRA-MGAP).
ecampelo@mgap.gub.uy

La Producción Integrada de hortalizas combina diversas estrategias en el control de enfermedades y plagas, mejorando la inocuidad alimentaria y minimizando los impactos sobre la salud de trabajadores, consumidores y el ambiente. Muchas herramientas alternativas al control químico no están disponibles en Uruguay. En ese marco, el proyecto FPTA 344, busca una transformación profunda en la horticultura en la región sur mediante la incorporación de agentes de control biológico (ACB) y otras herramientas alternativas al control químico desde un enfoque interinstitucional. La SFR puso atención en los ACB y se estableció la multiplicación de *Beauveria bassiana* con apoyo técnico de Facultad de Agronomía. Este trabajo presenta la experiencia de producción de *B. bassiana* a nivel local en la Sociedad de Fomento Rural (SFR) Los Arenales, y su introducción en el manejo de la mosca blanca (*Trialeurodes vaporariorum*) del tomate. La cepa utilizada proviene de aislamientos del Laboratorio de Fitopatología, Facultad de Agronomía, a partir de ejemplares nativos de mosca blanca infectados. Se confirmó la especie como *B. bassiana* mediante secuenciado de la región ITS y el gen EF-1 α y comparación por análisis filogenético con secuencias Tipo obtenidas de GenBank. El aislamiento se multiplica en arroz incubado dos semanas a 25 °C (mín. 10⁸ ufc g⁻¹), y se almacena a 4 °C. Como consecuencia del fracaso del control químico, los productores demandaban herramientas alternativas. La SFR puso atención en los ACB y se estableció la multiplicación de *B. bassiana* con apoyo técnico de Facultad de Agronomía. El producto está en proceso de registro en el marco del Proyecto FPTA. Su utilización en la producción comercial mostró un control y reducción de la población de mosca blanca cuando se realizaron aplicaciones periódicas (7 a 15 días). Se relevó un aumento de individuos infectados, y se logró mantener la plaga en máximos de 15 a 20 individuos por planta, valores bajo el umbral de daño. En combinación con otros ACB, *B. bassiana* constituye una herramienta eficiente para el manejo integrado.

Financiamiento: Ministerio de Industria, Energía y Minería (MIEM, 2011), Programa Más Tecnologías, DGDR-MGAP (2015-2017), INIA FPTA 344 y DIGEGRA-MGAP (2017-2020).

*Trabajo presentado previamente en otro evento

M3P6. Búsqueda de nuevos antimicrobianos a partir de microorganismos para el control de fitopatógenos

Raffaelli, S.^{1,2}; Hartmann, S.¹; Altier, N.³; Abreo, E.³; Vázquez, A.²; Alborés, S.¹

1-Área de Microbiología, Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; 2- Laboratorio de Farmacognosia y Productos Naturales, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; 3-Laboratorio de Bioproducción, Plataforma de Bioinsumos, INIA Las Brujas, Canelones, Uruguay
sraffaelli@fq.edu.uy

Las enfermedades de origen microbiano en plantas tienen el potencial de destruir enteramente las cosechas o reducir en forma crónica el rendimiento de los cultivos, obligando a tomar medidas que aumentan los costos de producción y afectan la calidad y la durabilidad de los productos cosechados. El rastreo de actividad de fuentes naturales es la forma tradicional de trabajo en el área de antimicrobianos, y se ha mostrado extraordinariamente exitosa. El laboratorio de Bioproducción de INIA Las Brujas cuenta con una colección de microorganismos aislados de diferentes fuentes, que han sido caracterizados a nivel fenotípico y molecular para su identificación y utilización en proyectos de promoción del desarrollo vegetal y control biológico de plagas. Los caldos extracelulares obtenidos luego del crecimiento de estos microorganismos pueden ser fuente de nuevos metabolitos de interés. En el presente trabajo se plantea aprovechar dichos medios de cultivo para la realización de un relevamiento de actividad antimicrobiana. Para ello, los caldos de cultivo provenientes de trece microorganismos diferentes se filtraron para separar la biomasa celular y se realizó extracción líquido-líquido. Se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos, y se observó inhibición del crecimiento por varios extractos contra uno o más microorganismos de interés agrícola. En particular, se observó una actividad importante para algunos extractos, con valores de Concentración Inhibitoria Mínima inferiores a 500 µg/ml frente a la bacteria *Xanthomonas vesicatoria* y los hongos *Rhizopus stolonifer* y *Alternaria alternata*. A partir de estos promisorios resultados, se continuará trabajando en la evaluación frente a otros fitopatógenos, así como en la derreplicación química de estos extractos seleccionados, para avanzar en el aislamiento y caracterización de los compuestos antimicrobianos.

Financiamiento: Proyecto ANII FCE 3_2016_126616, PEDECIBA Química.

M3P7. Coating of maize seeds with entomopathogenic fungi promotes rhizosphere colonization, endophytic ability and provides biocontrol of a pest and pathogen*

Rivas, F.^{1,2}; Jackson, T.A.³; Altier, N.¹; Rostás, M.²; Hampton, J.²; Glare, T.R.²

¹Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA, Las Brujas); ²BioProtection Research Centre (BPRC - Lincoln University, New Zealand); ³AgResearch (AgR, New Zealand).

frivas@inia.org.uy

Entomopathogenic fungi were originally identified as pathogens of insects, but recently some species have also been described as plant root colonizers and potentially endophytes. These fungal – plant associations could lead to benefits to the plant such as plant growth promotion or increase systemic resistance to pathogens. We evaluated the impact of different New Zealand isolates of *Metarhiziumanisopliae*, *M. robertsii*, *M. guizhouense*, *M. novozelandicum*, *Beauveria bassiana* and *Trichoderma harzianum*, on maize after applying them in a seed coating. The seeds were sown in potting mix in the presence of *Costelytrazealandica* (root feeding grass grub larvae) and *Fusarium graminearum* (maize pathogen). Rhizosphere colonization was greatest ($P=0.019$) from roots treated with *M. robertsii* (F447), followed by *M. anisopliae* (F672) with *M. guizhouense* (BK41) the lowest. The presence of grass grub larvae significantly reduced rhizosphere colonisation for all isolates while *F. graminearum* had no effect. No differences were noted in endophytic ability among the isolates, however when larvae were present the endophytism rate was reduced while *F. graminearum* increased the endophytic colonisation by the entomopathogenic fungi ($P<0.05$). Seedling emergence and shoot length were unaffected by the biocontrol fungal strains alone, but *M. anisopliae* (A1080) and *M. guizhouense* (BK41) treatments produced increased shoot length in the presence of *F. graminearum*. Grass grub larvae reduced root dry weight in all maize plants, although this reduction differed depending on the fungal strain used for the seed coating treatment. Bare seeds, without a biocontrol fungal coating, were the most affected by *F. graminearum*, while *B. bassiana* (Bb21), *M. guizhouense* (F16) and *M. novozelandicum* (F99) reduced the damage caused to the roots by this fungal pathogen. Biocontrol fungi differed in pathogenicity towards grass grub larvae; with *M. anisopliae* (F672) being the most pathogenic while *M. guizhouense* (BK41) and *M. robertsii* (F447) the least. This study showed that it is possible to deliver entomopathogenic fungi via a seed coating to provide biocontrol of both a fungal pathogen and an insect pest.

Financiamiento: Proyecto LP N-3518 (INIA), NGB 38798 (BPRC), POS_EXT_2014_1_105884 (ANII)

*Trabajo presentado previamente en otro evento

M3P8. Hongos entomopatógenos para el control de *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero y Dellappé (Heteroptera: Thaumastocoridae)*

Simeto, S.¹ ; Corallo, A.B.³; Lupo, S.³; Bettucci, L.³; Gómez, D.⁴; González, P.¹;
Martínez, G.¹; Abreo, E.²; Rivas, F.²; Altier, N.²

¹Programa Nacional de Investigación en Producción Forestal, INIA Tacuarembó, Uruguay;

²Programa Nacional de Investigación en Sustentabilidad Ambiental, Sección Bioinsumos, INIA Las Brujas; ³Facultad de Ciencias/Ingeniería, Laboratorio de Micología, Universidad de la República, Montevideo; ⁴School of Forest Resources and Conservation, U. of Florida, USA.

ssimeto@inia.org.uy

La chinche del eucalipto, *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae), es un insecto fitófago que se alimenta de especies de *Eucalyptus* provocando amarillamiento del follaje, defoliación y en casos de infestación severa, la muerte de árboles. El uso de hongos entomopatógenos como agentes de control biológico es visto como una alternativa factible para el manejo de plagas forestales ya que el control químico es escasamente utilizado debido a sus desventajas ambientales y económicas. El presente trabajo tiene como objetivo el desarrollo de bioinsecticidas a partir de la búsqueda, evaluación y bioproducción de hongos entomopatógenos para el control de *T. peregrinus*. Para ello, se aislaron hongos entomopatógenos a partir de chinches del eucalipto provenientes del campo. La identificación de las especies se basó en la morfología y características de esporas, estructuras reproductivas y colonias, así como en el análisis de las regiones ITS1, ITS2 y 5.8S del ADN ribosomal. Se identificaron especies pertenecientes a los géneros *Beauveria*, *Isaria*, *Lecanicillium*, *Purpureocillium* y *Pochonia*. Para determinar la patogenicidad y virulencia de los aislamientos se realizaron bioensayos utilizando 58 cepas provenientes de ésta y otras plagas forestales y agrícolas. Para una primera ronda de selección se aplicó una suspensión de esporas de 10⁷ esporas/ml sobre adultos de *T. peregrinus* ubicados sobre ramos frescos de *E. tereticornis* en jaulas de voile. Las cepas se clasificaron en cuatro categorías según el número de días en alcanzar el 90% de mortalidad de la población. La mayoría de las cepas (80%) fue patogénica para *T. peregrinus* con diferentes grados de virulencia. Para una segunda ronda de selección se determinó la CL50 y el TL50 de un subgrupo de cepas. Adicionalmente, se están realizando ensayos de bioproducción con las cepas más promisorias de manera de identificar métodos de producción masiva y de seleccionar las cepas formuladas más virulentas y estables.

*Trabajo presentado previamente en otro evento. Resumen del póster presentado en el "International Congress on Invertebrate Pathology and Microbial Control and the 48th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology", Vancouver, Canadá - agosto de 2015.

MÓDULO 4

Marco normativo, registro y calidad de bioinsumos

M4P1. Inoculantes en Uruguay: modelo de cooperación interinstitucional

Barlocco, C.¹; Mayans, M.²; Mortalena, M.¹; Mattos, N.¹; Altier, N.¹; Beyhaut, E¹

¹Laboratorio de Microbiología de Suelos (LMS). Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Ruta 48/Km 10. Uruguay.

²DGSA-Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP). Uruguay.
cbarlocco@inia.org.uy

A partir del convenio firmado en el 2012, el INIA y MGAP acordaron combinar capacidades para dar continuidad al sistema de registro y control de calidad de inoculantes, un antecedente que, mediante el trabajo conjunto del sector público y privado, hizo posible la producción nacional de inoculantes de alta calidad para leguminosas. El MGAP continúa con la fiscalización de la elaboración y comercialización de los inoculantes e INIA proporciona los servicios de análisis de los mismos y realiza la curaduría de la Colección Nacional de Cepas de Rizobios, suministrando cepas recomendadas oficialmente a las industrias. Los resultados de los análisis, solicitud de cepas y otra información es compartida vía página web por ambas instituciones y empresas registradas. Para garantizar al MGAP un servicio de alta calidad con resultados confiables y certeros, en 2016 el LMS de INIA comenzó la acreditación por la norma ISO/IEC 17025:2005 para los ensayos: (1) Concentración de rizobios viables, (2) Ausencia de microorganismos no declarados, (3) Identificación genética por BOX-PCR de las bacterias. Actualmente se está finalizando el proceso de acreditación, y se recibirá la auditoría externa del OUA a fines del presente año. Anualmente se analizan en promedio 150 lotes que corresponde al 100% de lo comercializado, 76% nacional y 24% importados. El 13% de los lotes no son autorizados, siendo causas del rechazo contaminación>concentración>identificación. Existen 114 productos registrados de 11 empresas, en soporte líquido: 100% soja; en turba: 85% forrajeras, 11% soja y 4% otras leguminosas de grano; semillas pre-inoculadas: 9 registros para soja y 1 para alfalfa. El funcionamiento eficiente de las actividades enmarcadas en el convenio INIA-MGAP ha permitido que los inoculantes microbianos continúen con una amplia adopción por el sector productivo. Además, se han creado normativas para el registro y control de inoculantes formulados con microorganismos no rizobios, como *Herbaspirillum*, *Azospirillum*, *Pseudomonas* y *Bacillus*.

M4P2. Bioinsumos de uso agrícola en Uruguay: regulación y marco legal

Mayans, M.¹ y Punschke, K.¹

¹ División Control de Insumos, Dirección General de Servicios Agrícolas (DGSA). MGAP, Av. Millán 4703, Montevideo, Uruguay.
mmayans@mgap.gub.uy kpunschke@mgap.gub.uy

Los Bioinsumos se utilizan para mejorar la productividad, la calidad y la salud de las plantas, o las propiedades biológicas del suelo. Para su formulación, las cepas son seleccionadas por su capacidad de promover el crecimiento vegetal, de forma directa, facilitando la absorción de nutrientes, o indirecta, contribuyendo al manejo sanitario de enfermedades y plagas de impacto económico. Se consideran dos grandes categorías, los Biofertilizantes y los Biocontroladores. El control biológico representa una alternativa promisorio para el control de enfermedades y plagas agrícolas, debido a consideraciones toxicológicas, emergencia de cepas resistentes, plagas secundarias y demanda de insumos libres de residuos tóxicos producidos según prácticas sustentables. Los biocontroladores microbianos y entomófagos, así como los biofertilizantes en una formulación comercial, deben cumplir requisitos como estabilidad genética, efectividad e inocuidad para organismos no blanco, entre otros. Cuando un bioinsumo es producido a escala comercial, y el formulado se vende como biofertilizante o biocontrolador, se requiere de su registro ante la autoridad competente, quien debe asegurar las pautas de identidad, eficacia agronómica, seguridad para el ambiente, la salud y el control de calidad. Dicho control comprende un conjunto de acciones destinadas a garantizar la producción uniforme de lotes que cumplan entre otros los parámetros de identidad, actividad y pureza establecidos. El Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, a través de la DGSA, es el responsable en Uruguay del registro y control de estos insumos, los cuales están regulados por normativas específicas. En este sentido, la DGSA a través de la cooperación interinstitucional da cumplimiento a uno de sus cometidos estratégicos, apostando al desarrollo de tecnologías innovadoras y contribuyendo de este modo al desarrollo de un país productivo, sustentable y con una política basada en la inocuidad.

M4P3. Identificación, cuantificación y control de los requerimientos microbiológicos de calidad e inocuidad en productos formulados con agentes de control biológico microbianos

Richero, M.

Laboratorios Biológicos, DAD, DGSA-MGAP
marichero@mgap.gub.uy

El Área Bacteriología realiza, a solicitud de la División Control de Insumos, la evaluación de productos formulados con agentes de control biológico (ACBM) de plagas agrícolas, para determinar si cumplen los requerimientos microbiológicos de calidad e inocuidad. A partir del año 2013, basándose en las recomendaciones de la OECD, se establecieron los límites y requisitos que se analizan en dichos productos durante el proceso de registro, así como en cada renovación de registro y partida de importación. Los parámetros de pureza a determinar son: ausencia de *E. coli* y *S. aureus* en 1g de muestra, ausencia de *Salmonella* spp. en 25 g, recuento de aerobios totales $<10^5$ UFC/g y recuento de hongos y levaduras $<10^3$ UFC/g. En el caso de los productos basados en baculovirus, se verifica además que el recuento de *Bacillus cereus* sea $<10^5$ UFC/g. Si bien existen protocolos para realizar estos análisis, los mismos están normalizados para matrices alimentarias. Uno de los desafíos del laboratorio ha sido implementar dichos protocolos en productos formulados con cargas microbianas del orden de 10^{10} UFC/g. Hasta el momento se realizó el control de pureza a 16 productos basados en *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. thuringiensis*, *B. bassiana*, *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. gamsii* y *Granulovirus* de *Cydia pomonella*, encontrándose en cuatro oportunidades con productos que no cumplían con los límites establecidos. Otros dos parámetros son evaluados en todos los productos de ACBM: identificación y cuantificación. En particular, el Área de Bacteriología se encarga de realizar estas determinaciones en aquellos productos que incluyen agentes bacterianos. Los protocolos utilizados varían según el tipo de microorganismo y formulación. En la identificación se utilizan tanto métodos convencionales como moleculares. El laboratorio continúa trabajando para estar preparado a nuevos desafíos y contar con las técnicas adecuadas a cada caso para el control de calidad de ACBM.

M4P4. Generación de capacidades nacionales para la realización de ensayos de toxicidad e inocuidad incorporando métodos alternativos al uso de animales de laboratorio

Silvera, C.¹; Arévalo, P.^{1,2}; Abreu, C.^{1,3}; Bollati-Fogolín, M.^{1,3}; Crispo, M.^{1,2}

¹Programa de Tecnología Molecular, Celular y Animal (ProTeMCA), protemca@pasteur.edu.uy

²Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación (UATE), crispo@pasteur.edu.uy

³Unidad de Biología Celular (UBC), mbollati@pasteur.edu.uy

Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay.

Los ensayos de toxicidad e inocuidad se realizan con el objetivo de recabar información específica de productos químicos y/o biológicos, con énfasis en sus efectos adversos, cuando su utilización implica contacto o interacción directa o indirecta con la biota. Tradicionalmente, estos productos se testean en animales de laboratorio, exponiéndolos a un daño real o potencial cuando la sustancia a testear tiene efectos aún desconocidos o se considera tóxica. Actualmente, la tendencia mundial es reemplazar el uso de animales por ensayos *in vitro* o *in silico*, promoviendo el principio ético de las 3Rs (Reemplazo, Reducción y Refinamiento). La UATE y la UBC trabajan realizando ensayos para empresas farmacéuticas humanas y animales relacionadas con áreas de investigación y/o producción. En el marco del ProTeMCA, se plantea sumar a Uruguay a la tendencia mundial de generar el mayor reemplazo posible al uso de animales en experimentación, creando una plataforma específica que ejecute ensayos alternativos a los *in vivo*, basándose en protocolos establecidos y validados en guías internacionales. Proponemos la puesta a punto de una batería de ensayos celulares y demás alternativos que reduzcan y/o reemplacen el uso de animales, que se pondrán a disposición de la academia y del sector privado. La posibilidad de contar con una plataforma de este tipo en nuestro país potenciará las capacidades de producción, desarrollo, investigación e innovación en áreas de biotecnología, biomedicina y agroindustria, con los más altos estándares de calidad y competitividad de exigencia internacional.