



INSTITUTO
NACIONAL DE
INVESTIGACIÓN
AGROPECUARIA

URUGUAY



**X ENCUENTRO
LATINOAMERICANO Y DEL
CARIBE DE BIOTECNOLOGÍA
AGROPECUARIA Y
XI SIMPOSIO REDBIO
ARGENTINA.
Libro de Resúmenes.**

Noviembre, 2019

SERIE
TÉCNICA

253

INIA



**X ENCUENTRO LATINOAMERICANO
Y DEL CARIBE DE BIOTECNOLOGÍA
AGROPECUARIA Y
XI SIMPOSIO REDBIO ARGENTINA.**

Libro de Resúmenes.

Montevideo 12 - 15 Noviembre 2019

Título: X ENCUENTRO LATINOAMERICANO Y DEL CARIBE DE BIOTECNOLOGÍA AGROPECUARIA Y XI SIMPOSIO REDBIO ARGENTINA. Libro de Resúmenes.

Serie Técnica N° 253

© 2019, INIA

doi: <http://doi.org.10.35676/INIA/ST.253>

e-ISBN 978-9974-38-437-8

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

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

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA

INTEGRACIÓN DE LA JUNTA DIRECTIVA

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

Ing. Agr., Mag. Mariana Hill - Vicepresidenta



Ing. Agr. Rafael Secco



Ing. Agr. Alberto Bozzo

Ing. Agr. Alejandro Henry



CONTENIDO

	Página
PRÓLOGO	v
COMITÉ ORGANIZADOR	vi
COMITÉ CIENTÍFICO	vii
PLENARIAS	1
BIOTECNOLOGÍA VEGETAL	5
PRESENTACIONES ORALES	6
PRESENTACIÓN DE POSTERS	50
BIOTECNOLOGÍA ANIMAL	104
PRESENTACIONES ORALES	105
PRESENTACIÓN DE POSTERS	117
BIOTECNOLOGÍA MICROBIANA	129
PRESENTACIONES ORALES	130
PRESENTACIÓN DE POSTERS	135
BIOECONOMÍA	161
PRESENTACIONES ORALES	162
PRESENTACIÓN DE POSTERS	173
BIOTECNOLOGÍA Y SOSTENIBILIDAD DE SISTEMAS PRODUCTIVOS	175
PRESENTACIONES ORALES	176
PRESENTACIÓN DE PÓSTERS	180
BOSEGURIDAD	189
PRESENTACIÓN DE PÓSTERS	190

PRÓLOGO

El Comité Organizador les da la bienvenida al X Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología Agropecuaria REDBIO Uruguay y al XII Simposio REDBIO Argentina, celebrado en Uruguay del 12 al 15 de noviembre de 2019. Este Encuentro es organizado por el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) de Uruguay y REDBIO Argentina, Asociación civil.

REDBIO, fundada en 1990 por laboratorios y programas nacionales de biotecnología vegetal, y desarrollada con los auspicios de FAO hasta 2011, se ha destacado como la red de biotecnología más importante de América Latina y el Caribe. El objetivo de REDBIO es promover el desarrollo y uso de la biotecnología como herramienta clave para el desarrollo sostenible y competitivo de la producción agrícola y forestal en América Latina.

Nuestro enfoque en REDBIO 2019 de «*mayor productividad agrícola con menor huella ambiental*» reconoce que los sistemas agrícolas dependen de la interconexión de muchos elementos y procesos diferentes. El desafío mundial de la seguridad alimentaria es multidimensional, de las cuales sólo algunas son susceptibles de cambio a través de la ciencia y la innovación. La ciencia interactúa necesariamente con los sistemas sociales, económicos y ambientales. Las mejoras en la producción de cultivos alimentarios pueden provenir de la investigación científica, pero para que los cambios en los sistemas de producción se consideren sostenibles, deben tener en cuenta los tres elementos.

Por lo tanto, estamos seguros de que este Encuentro REDBIO contribuirá en gran medida a fortalecer el desarrollo de sistemas agrícolas más sostenibles basados en biotecnologías seguras que promuevan la preservación del medio ambiente.

Ing. Agr. Dr. Marco Dalla Rizza Vilaró

Presidente REDBIO

Ing. Agr. Dr. Juan Izquierdo

Vicepresidente REDBIO

COMITÉ ORGANIZADOR

Presidente

Ing. Agr. Dr. Marco Dalla Rizza

VicePresidente

Ing. Agr. Dr. Juan Izquierdo

Presidente REDBIO Argentina

Dra. Marisa López Bilbao

Secretaría Técnica

MSc. Claudia Schvartzman

Tesorería

Lic. Esteban Cisneros

Comunicación

Lic. Mónica Trujillo

COMITÉ CIENTÍFICO

Biología Vegetal

Dra. Victoria Bonnacarrere – INIA - Uruguay

Biología Animal

Dra. Elly Navajas – INIA - Uruguay

Biología Microbiana

Dra. Carolina Leoni – INIA - Uruguay

Bioeconomía

Dr. Bruno Lanfranco - INIA- Uruguay

Dra. Elizabeth Hodson - Univ. Javeriana. Colombia

Biología y sostenibilidad de sistemas productivos

Dr. Walter Baethgen – Universidad de Columbia – INIA – Uruguay

Dra. Verónica Ciganda – INIA – Uruguay

Bioseguridad

Marisa López Bilbao – REDBIO Argentina – INTA – Argentina

Secretaría Técnica

Dra. Alicia Castillo – INIA – Uruguay

Dr. Gerardo Gallego – CIAT – Colombia

PLENARIAS

LA BIOTECNOLOGÍA COMO ELEMENTO CLAVE DE LA TRANSFORMACIÓN HACIA SISTEMAS AGROALIMENTARIOS SOSTENIBLES

Echeverría R.G.

Existe consenso a nivel global de que la muy necesaria transformación de los sistemas agroalimentarios se debería basar en **cuatro ejes fundamentales**: 1. La eficiencia, productividad y seguridad alimentaria; 2. Un mayor enfoque en la calidad nutritiva y aspectos de salud y no solo en cantidades de alimentos; 3. la sostenibilidad ambiental, el manejo eco-eficiente de los recursos naturales, el cambio climático y la biodiversidad y 4. la inclusión económica y social de actores claves de los sistemas agroalimentarios como los pequeños agricultores, los jóvenes y las mujeres. Una posible **agenda** de dicha transformación incluiría: escalar las innovaciones en tecnologías biológicas, digitales y materiales; lograr mucho mayor financiamiento a los productores y a las compañías tecnológicas privadas y reestructurar los apoyos públicos hacia bienes públicos como la nutrición y la agricultura climáticamente inteligente. Asimismo, existen al menos cinco grandes **actores** en dicha transformación: productores, consumidores, procesadores de alimentos, compañías tecnológicas y organizaciones nacionales, regionales e internacionales de investigación pública.

Lograr transformar los sistemas agroalimentarios en el mediano plazo tomando en cuenta los cuatro grandes componentes mencionados –tomando en cuenta la agenda para dicha transformación y los actores claves- tendría enormes impactos económicos, sociales y ambientales. **El desarrollo y utilización de la biotecnología es uno de los principales instrumentos disponibles para dicha transformación** y sin embargo frente a su enorme potencial no se han logrado hasta el momento las inversiones públicas en investigación, en la formación de capacidades y en la asistencia técnica para lograrlo a la escala de los desafíos anotados. **REDBIO 2019 llega en un momento clave en la Agenda 2030** para dialogar, evaluar y promover políticas nacionales en biotecnología y bioseguridad en el marco de la gran transformación global hacia sistemas agroalimentarios sostenibles. Además del cambio tecnológico cuales serían los cambios institucionales requeridos para contestar algunas de las siguientes preguntas: ¿Cómo fortalecer la vinculación entre la investigación y la evidencia científica y las políticas en biotecnología y bioseguridad? ¿Cómo poder evaluar los Impactos socioeconómicos y ambientales de la biotecnología? ¿Cómo lograremos una intensificación sostenible de los sistemas de producción sin mayores inversiones en investigación agropecuaria? ¿Cómo coordinar mejor nuestras acciones y como aliarnos en programas y proyectos de inversión con el sector privado, las universidades y los sistemas nacionales de investigación?

ADVANCES AND LIMITATIONS IN SOMATIC EMBRYOGENESIS AND CRYOPRESERVATION OF SELECTED BRAZILIAN PLANTS AND THEIR APPLICATIONS FOR MASS PROPAGATION AND CONSERVATION

Guerra, M.P.¹

Somatic embryogenesis (SE) comprises an *in vitro* regenerative route to mass propagate plants. This morphogenetic system also encompasses a model-system to study the complex molecular, biochemical, and physiological features underlying cell totipotency. In my research group more than three decades were dedicated to the basic and applied aspects of SE with emphasis to perennial Brazilian native plant species. In this context, we present and discuss here the basics and applications of selected SE model systems with emphasis to three select woody plant species native to Brazil, and from three different taxonomic woody groups. The first is the conifer *Araucaria angustifolia*; the second is the Myrtaceae *Acca sellowiana*, and the third one is the Amazon native palm *Bactris gasipaes*. Woody species are considered recalcitrant to SE. Our approach to SE is to better understand the basis of plant cell totipotentiality, to address its applications in capturing genetic gains from elite genotypes, as well as for the conservation of endangered species, including the cryopreservation of elite embryogenic cultures and somatic embryos. Aspects of scaling-up with temporary immersion systems, synthetic seeds, and LED lights technologies associated to SE are also presented and discussed. Advances and main bottlenecks of SE are also in the main scopes of our work.

¹ Federal University of Santa Catarina, Brazil
miguel.guerra@ufsc.br

HERRAMIENTAS CRISPR EN BIOTECNOLOGÍA VEGETAL: DE LA MUTAGÉNESIS DIRIGIDA A LA BIOLOGÍA SINTÉTICA

Diego Orzáez

La mejora genética de plantas se ha convertido en una de las principales bazas a nuestro alcance para responder a las amenazas del cambio climático con un crecimiento sostenible. Los límites tradicionales entre la mejora transgénica y no transgénica se han difuminado con la aparición de las llamadas «Nuevas técnicas de mejora de plantas» (NPBT de sus siglas en inglés), que comprenden desde la cisgénesis a la biología sintética. Las NPBTs que mayor impacto han tenido en los últimos años son aquellas basadas en la utilización de Nucleasas sitio-específicas (SSN de sus siglas en inglés), y muy especialmente la nucleasa CRISPR/Cas9. Esta tecnología se ha aplicado con éxito como agente mutagénico guiado por ARN a muchas especies de cultivos, produciendo docenas de ejemplos exitosos de mejora genética. El intenso esfuerzo de investigación que siguió al descubrimiento de CRISPR/Cas9 y sus prometedoras aplicaciones ha llevado, como en una profecía autocumplida, al desarrollo de nuevas herramientas relacionadas con CRISPR, pero ampliadas en sus usos y aplicaciones. Esto ha sido posible gracias a la sorprendente capacidad de las ribonucleoproteínas CRISPR/Cas para aceptar la adición de nuevos módulos con funciones adicionales, ya sea unidas a la proteína en sí o a la estructura del ARN guía, utilizando para ello un armazón extendido de aptámeros de ARN. En esta charla revisaremos las aplicaciones ampliadas de las proteínas CRISPR/Cas en mejora genética de plantas, desde la mutagénesis múltiple hasta la regulación transcripcional programable, y presentaremos una nueva colección de herramientas web para ingeniería genómica de plantas (GoldenBraid4.0), que facilita el ensamblaje modular de todo tipo de construcciones CRISPR/Cas. Además, presentaremos ejemplos de validación funcional de las herramientas GoldenBraid4.0 en ingeniería genómica de plantas solanáceas.

BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

A NEW CLASS OF RNA-BASED MATERIALS FOR THE CONTROL OF PESTS

Arhancet J.P.

The use of RNA-based materials for the control of pests has been demonstrated in the laboratory. However, commercially viable materials for use in agriculture are limited by the biological properties of dsRNA. We will describe post-transcriptionally chemically modified dsRNA materials designed to overcome such challenges.

DETERMINATION OF PURITY AND QUANTIFICATION OF VARIETAL COMPONENTS THROUGH NGS (NEXT GENERATION SEQUENCING)

Azambuja C.¹; Fonseca B.¹; Agorio A.^{1,2}; Fossati R.¹; Grasso AN¹.

Key words: barley, soybean, SNP (single nucleotide polymorphism), NGS (next generation sequencing), industry

The barley industry requires strict control of the varieties involved to maintain optimal malting procedure and limit batch variability.

We were asked to develop a method to enable the determination of varietal purity as well as identification and quantification of the components of varietal mixtures.

We speculated that, as each variety has its own SNP profile, we might be able to determine the percentage of each variety by determining the frequency of each allele in the pooled sample.

In order to determine the components of a varietal mixture we developed an algorithm based on Bayesian method and utilizing a database of the 43 varieties of barley most frequently used in Uruguay, Argentina, and Chile.

A set of 400 SNPs were selected from the iSelect 9k barley chip. The SNP's performance was tested in silico by the AgriSeq team, the final panel containing 369 SNPs. DNA was extracted from the flour of 10,000 seeds, PCR and library constructions were processed according to AgriSeq protocols. Sequencing was performed on an Ion S5.

This method was validated by mixtures the known composition being able to determine varietal purity with an error rate lower than 1% (99% confidence) and a 95-99% of purity, and the system can detect a 0.8% of contaminant varieties using coverage of 100X.

The system was also validated using malted barley.

Using the same approach we developed a soybean panel with 363 SNPs based on the BARCSOYSNP6K and tested it against 46 soybean varieties. The panel was able to discriminate all the varieties with an average of 80 differential SNPs between varieties and a minimum of 4 differential SNPs in closely related varieties.

The quantification capability of the AgriSeq system proved to be a reliable tool for varietal purity determination.

¹ azambuja@genia.com.uy. Laboratorio Genia; Av Sarmiento 2265, CP1100 Montevideo, Uruguay

² Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Montevideo, Uruguay

TOWARDS GENERATING MULTI-DISEASE RESISTANT LETTUCE USING CRISPR/CAS GENOME EDITING

Bertier L., Michelmore R.

Lettuce is an important crop plant that ranks as one of the top ten most valuable crops in the US with an annual value of over \$2.3 billion. We have currently mapped 52 phenotypic loci that confer resistance in lettuce to ten diseases. To isolate the causal resistance genes, we are using contemporary map-based cloning approaches that exploit high throughput sequencing and the availability of the lettuce genome sequence. The resulting genes will be stacked using CRISPR/Cas9-mediated genome editing.

A protoplast assay using fluorescent gene conversion was developed to optimize gene replacement strategies in lettuce, a prerequisite for efficient gene stacking. Gene replacement relies on the incorporation of a donor template at the locus of interest via the homology-directed repair (HDR) pathway. HDR efficiencies in plants are rarely >5%, hence the need for a high-throughput, fast turnaround system to test many variables. RNPs plus donor templates for HDR are being introduced into lettuce protoplasts by PEG-mediated transfection. We are exploring some of the key variables such as the design and amounts of gRNA and donor template, the number (one versus two) and position(s) of the double strand breaks, the length and position of the homology arms with respect to the double strand break(s), and the method of delivery of the donor template. We are assessing the conversion of a red fluorescent protein (DsRED) to a mutant variety (AG4 or N42H) and that exhibits only or additional green fluorescence to quantify CRISPR/Cas9-mediated HDR. Significant (>5%) sequence replacement was detected by amplicon sequencing when using linear dsDNA fragments with homology arms >200 bp. Currently, we are focusing on regenerating edited protoplasts to increase the chance of recovering phenotypic conversions.

CHLOROPLAST VESICULATION MEDIATES CHLOROPLAST AND PEROXISOME TURNOVER, SOURCE-SINK RELATIONSHIPS AND STRESS TOLERANCE IN CROP PLANTS

Blumwald E.

The earliest detectable event during stress-induced senescence is the loss of photosynthetic activity and degradation of the chloroplasts (that contain up to 70% of the total leaf proteins). Most of the nitrogen resulting from chloroplast degradation at the source leaves are recycled and supplied to the sink organs. The protein CV (CHLOROPLAST VESICULATION) targets the chloroplast, promoting the formation of vesicles (containing stroma and thylakoid proteins) that are released from the chloroplast and transported into the vacuole through an autophagy-independent pathway. CV encodes a non-classical adaptor protein that recruits clathrin heavy chain-2, inducing the budding of CVVs (CV-contained vesicles). While *OsCV* overexpression caused leaf yellowing and a decrease in photosynthetic activity, *OsCV* silencing contributed to the maintenance of chloroplast integrity, chloroplastic grana-thylakoid organization and higher photosynthesis. *CV*-silenced plants displayed enhanced source fitness (i.e. carbon and nitrogen assimilation) and photorespiration, leading to water-deficit stress tolerance.

Since high atmospheric CO₂ conditions diminished photorespiration, we tested whether *CV*-silencing might be a viable strategy to improve the effects of high CO₂ on grain yield and N-assimilation in rice. Under elevated CO₂, *OsCV* expression was induced and *OsCV* was targeted to peroxisomes where it facilitated the removal of peroxisome biogenesis factors (*OsPEX11*), delivering it to the vacuole for degradation. This process correlated well with the reduction in the number of peroxisomes. At elevated CO₂, *CV*-silenced rice plants maintained peroxisome proliferation, photorespiration and displayed higher N assimilation than WT plants as shown by higher NO₃⁻ and NH₄⁺ assimilation and higher total and seed protein contents. Co-immunoprecipitation of *OsCV*-interacting proteins indicated that similar to its role in chloroplast protein turnover, *OsCV* acted as a scaffold, binding peroxisomal proteins. From a biotechnological perspective, *CV* silencing offers a suitable strategy for the generation of stress-tolerant transgenic crops.

REGULATION OF CELLULOSE BIOSYNTHESIS BY TTL PROTEINS IN RESPONSE TO STRESS

Botella M. A.

The adaption of plant growth during stress relies on highly controlled re-organization in cell division and expansion. Therefore, precise remodeling of the cell wall is essential for the plant to adapt its growth to environmental stresses. Cellulose, the main load-bearing polymer of the cell wall, is directly synthesized at the plasma membrane as β -1,4-linked D-glucose chains by mobile cellulose synthases (CesA) that are organized in rosette-shaped cellulose synthase complexes (CSCs). The tracks of moving CesAs co-align with the underlying cortical microtubules (MT), and it is now clear that these cytoskeletal fibrils guide the CSCs while producing cellulose extracellularly. Understanding the mechanisms that regulate cellulose biosynthesis is essential to develop strategies to improve plant production but also has wide biotechnological applications. In Arabidopsis, the TETRATRICOPEPTIDE THIOREDOXIN-LIKE (TTL) a gene family is composed of four members (*TTL1* to *TTL4*) and mutations in *TTL1*, *TTL3*, and *TTL4* genes cause impaired brassinosteroid (BR) signaling. *TTL3* associates with most core components of BR signaling serving as scaffold for BR biosynthetic components. Also, *tll* mutants present defects in the plant cell wall during salt and osmotic stress and also during isoxaben or sucrose treatment indicating a role in cellulose biosynthesis. Using spinning disk confocal microscopy, we have observed that *TTL3* relocalizes from the cytoplasm to the plasma membrane where associates with the Cellulose Synthase Complex (CSC) after stress. *TTL1* and *TTL3* are essential for the stability of the CSC in stress conditions. Furthermore, genetic analysis indicates that *TTLs* function in a different signaling pathway than the *SOS5/FE11/FE12* and their function in cellulose biosynthesis is independent of their role of BR signaling. Furthermore, analysis of a *tll1/3/sos5* triple mutant indicates that these two pathways have a role in cellulose biosynthesis during normal plant development but can compensate each other when one of them is functional.

10

This work was supported by grants from: (1) Ministerio de Ciencia e Innovación BIO2017-82609-R; (2) Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (BES-2015-071256)

PRODUCCIÓN DE PLANTAS RESISTENTES A ENFERMEDADES VÍRICAS Y BACTERIANAS MEDIANTE SILENCIAMIENTO DE GENES DEL PROPIO PATÓGENO

Burgos L.

Hemos producido plantas transgénicas de ciruelo y albaricoquero resistentes al virus de la sharka con una construcción diseñada para silenciar genes del propio virus. Esta construcción la diseñó el equipo de la Dra. Ilardi. Por otra parte en nuestro laboratorio hemos construido un vector diseñado para silenciar los genes de *Agrobacterium tumefaciens* responsables de la producción de la agalla de corona y hemos producido plantas transgénicas resistentes de tabaco, ciruelo y albaricoquero con diferente grado de éxito. En ambos casos se trata de una construcción que genera un ARN mensajero en forma de pinza del pelo, es decir con dos cadenas complementarias separadas por un intrón. En el caso del virus la secuencia utilizada corresponde a un fragmento no codificante del extremo 5'. Para evitar la formación de los tumores típicos de la agalla de corona tuvimos que silenciar dos genes de *Agrobacterium*, el *ipt* responsable de la síntesis de citoquininas y el *iaaM/H* responsable de la síntesis de auxinas. La expresión conjunta de ambos es lo que produce una división descontrolada de las células. Para silenciar ambos al tiempo se eligieron zonas muy conservadas entre diferentes estirpes de la bacteria y se ensamblaron en un solo fragmento que se utilizó para preparar el hairpin.

EDICIÓN DE GENOMAS: PRINCIPIOS, REGULACIÓN Y APLICACIONES.

Chavarriga-Aguirre, P.

El mejoramiento de cultivos enfrenta hoy los mismos retos desde que se inició la agricultura. La diferencia es que hoy debemos dar una respuesta más rápida a dicho retos porque el crecimiento poblacional acelerado conlleva mayor demanda de alimentos y energía, con la subsecuente reducción y contaminación de suelos aptos para la agricultura. Por esta razón debemos usar las Nuevas Tecnologías de Mejoramiento (NTMs) como CRISPR-Cas9 para modular/cambiar muy rápidamente la expresión de genes involucrados en características que influyen en el rendimiento, como el número de granos en una espiga, la resistencia a plagas, la calidad del almidón, la tolerancia a metales pesados, e incluso la posibilidad de desarrollar variedades a partir de células haploides. La Edición de Genomas es parte de las NTMs y durante este simposio daremos ejemplos de su uso para el mejoramiento de cultivos, los principios de la regulación que se aplica a estas nuevas variedades y las perspectivas de su uso y adopción a nivel mundial.

RE-DESIGNING GREEN REVOLUTION RICE BREEDING PROGRAMS TO ACHIEVE GREATER RATES OF GENETIC GAIN IN SOUTH ASIA AND AFRICA

Cobb J.

As rice feeds nearly half of the human population, rice breeding is a critical focal point for achieving the UN Sustainable Development Goal of eliminating hunger and poverty by 2030 and providing a sufficient quantity of safe and nutritious food to vulnerable populations in the developing world. However, despite dramatic improvements in understanding the genetic basis of complex traits in rice over the last 20 years, annual rates of genetic gain for yield in most public rice breeding programs in Asia and Africa are extremely low. Understanding and manipulating the key drivers of genetic gain will be necessary for rice breeding programs to fully meet the expectations of the 21st century. Funded by the Bill and Melinda Gates foundation and in coordination with the CGIAR Excellence in Breeding Platform, The International Rice Research Institute (IRRI) aims to transform rice breeding by driving alignment among national public breeding programs in Asia and Africa around a common breeding model that appropriately leverages modern genomic technologies to ensure vulnerable smallholder rice farmers have access to a steady stream of high yielding, locally adapted, and market-ready rice varieties.

THE USE OF PROTEOMIC AND TRANSCRIPTOMIC TOOLS TO UNDERSTAND SOMATIC EMBRYOGENESIS A CASE STUDY

Correia, S.I., Canhoto J.C.

Plant somatic embryogenesis (SE) is a developmental pathway in which a somatic cell acquires totipotency and evolves into an embryo. Our group has developed effective protocols for SE in the solanaceous tree tamarillo (*Solanum betaceum*). Tamarillo SE induction is achieved through a two-step process, by exposing leaf segments or mature zygotic embryos to MS media with auxin and high concentrations of sucrose and by transferring the induced embryogenic cells (EC) to auxin-free medium to allow somatic embryos development. Tamarillo's SE is also an efficient system for molecular analyses and experimental embryology approaches. Based on this system, comparative proteomic and transcriptomic profiles were obtained for tamarillo's EC and non-EC cells. The results obtained reveal a better ability of EC to regulate the effects of stress conditions through increased expression of heat-shock and energy metabolism-related proteins. The differential expression of several transcription factors and specific families of miRNAs in EC and NEC also reveals a strong epigenetic regulation of cell commitment to embryogenic competence. These results allow the formulation and test of various novel fundamental hypotheses regarding the induction of SE.

This work was supported by the Project «RENATURE - Valorization of the Natural Endogenous Resources of the Centre Region» (CENTRO-01-0145-FEDER-000007) and Project PTDC/BAA-AGR/32265/2017: «Tamarillo breeding: better plants for better products».

UTILIZACIÓN DE TÉCNICAS BIOTECNOLÓGICAS PARA LA CONSERVACIÓN DE ESPECIES NATIVAS EN RIESGO DE EXTINCIÓN COMO HERRAMIENTA PARA INCREMENTAR LA BIODIVERSIDAD EN ÁREAS URBANAS

Cordal M.; Dobler N.

El Relleno Sanitario de Villa Domingo, recibió 48 millones de toneladas de residuos sólidos urbanos. Un Vivero Experimental y un Laboratorio de Cultivo *in vitro* funcionan allí. Sobre la cobertura de estos módulos, se realizaron plantaciones de especies nativas que sirven de alimento y refugio a la vida silvestre, contribuyendo al enriquecimiento de la biodiversidad de las 400 ha de la propiedad, pudiendo observarse hoy hasta 130 especies de aves. Entre las especies vegetales más destacadas se encuentran: *Celtis ehrenbergiana* (Tala), *Schinus longifolia*, *Acacia caven*, *Phytolacca dioica* y *Phytolacca tetramera*. Este es el único miembro endémico de los Talaes de la Provincia de Buenos Aires, Argentina, cuya situación actual es extremadamente crítica. En este caso, se desarrolló un protocolo optimizado para su micropropagación. Se utilizó medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 0,002 mM de 6-Benzyl-aminopurina (BAP) y Ácido Indolbutírico (IBA) y 3% de sacarosa. En estas condiciones químicas se obtuvieron los mejores resultados en cuanto a la formación de brotes. Tras dos subcultivos, las plantas elongadas se cultivaron en medio de enraizamiento. Posteriormente, los microtallos enraizados se aclimataron a condiciones *ex vitro* en el invernadero reduciendo progresivamente la humedad relativa. Luego se aclimataron a condiciones *ex vitro* y se trasladaron al vivero para su endurecimiento. En 2018, se seleccionaron 20 individuos para realizar pruebas de adaptación y supervivencia en 4 áreas del complejo Villa Domingo con diferentes características geológicas. La evaluación posterior consiste en el estudio fitosanitario y en el análisis del crecimiento y desarrollo de los individuos en las distintas áreas de instalación. Además, se evaluarán periódicamente aspectos relacionados con el incremento de la biodiversidad en la zona.

HOW EXTRACELLULAR AND INTRACELLULAR SIGNALS CONTROL GROWTH IN SINGLE CELLS IN *ARABIDOPSIS* ROOTS

Estevez J.M.

One of the most intriguing questions in modern biology is how cells regulate their size. The rate at which cells grow is determined both by cell-intrinsic factors and external environmental signals. Root hairs are single plant cells that can expand several hundred-fold their original size and have emerged as an excellent model system for studying cell size regulation. A well-defined developmental program and multiple environmental signals coupled to several hormones are integrated to define the final size of root hairs. Root hair size has vital physiological implications for the plant, determining the surface area/volume ratio of the whole roots exposed to the nutrient pools. Although the final hair size is of fundamental importance, the molecular mechanisms that control it remained largely unknown. In this talk, I will show how extracellular signals like specific nutrients and small peptides as well as endogenous hormones like auxin are able to control growth a single plant cell level.

BIOMASS CO-PROCESSING IN EXISTING REFINERIES: THE FUTURE OF THE REFINING INDUSTRY

Falabella, E.

The survival of the oil industry will depend on many factors. Indeed, the refiner of the future will have to face multiple challenges. Such challenges are increasingly stringent environmental regulation, growing demand for cleaner fuels, globalization, production of derivatives from declining quality oil, uncertainty about the consumer's choice and growing pressure of several segments of the society aiming at the reduction of GHG. The search for alternative feedstock such as biomass has become a must to cope with more stringent regulations. Also, alternative refining routes such as synthetic fuels are striking back. In fact, chemical industry seems to be moving towards the concept of Green Economy.

Hence, aiming at having a better utilization of the existing facilities, biomass co-processing is often indicated. Co-processing is, by definition, the utilization of blends in already existing units. In principle, vegetable oils can be rather easily co-processed in the installed facilities of the refineries. Also, different types of bio-oils, resulting from both catalytic and non-catalytic pyrolysis of lignocellulosic biomass can undergo processing in different units of the refinery.

The co-processing of both vegetable oils and bio-oils resulting from pyrolysis in different refinery units such as FCC and hydro processing is discussed. Based upon experimental results, the advantages and drawbacks of co-processing are presented. Eventually, conclusions are drawn with the help of copious published literature, showing that co-processing in existing refining units may be a clever solution for biomass utilization.

COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES LIBERADOS DESDE ACARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUCTURADOS PARA INDUCIR EL CRECIMIENTO EN *SOLANUM LYCOPERSICUM*

Fincheira P.^{1,3}, Quiroz A.^{2,3}, Hermosilla E.^{1,3}, Tortella G.^{1,3}, Rubilar O.^{1,3}

Estimulantes del crecimiento vegetal basados en nanopartículas (NPs) se han propuesto como alternativa sustentable. Acarreadores lipídicos nanoestructurados (ALN) caracterizados por su naturaleza orgánica, biocompatibilidad y biodegradabilidad constituyen un «carrier» para encapsulación de compuestos. Adicionalmente, compuestos orgánicos volátiles (COVs) caracterizados por su naturaleza carbonada, lipofílica y biodegradable poseen eficiente acción para inducir el crecimiento vegetal. El objetivo del presente trabajo es determinar el efecto de 2-nonanona y 2-tridecanona liberada desde ALN para inducir el crecimiento de *Solanum lycopersicum*. Para ello se formularon ALN con lípidos de triestereato de glicerilo y miristato de isopropilo, con tween 80 (surfactante), donde se encapsularon 250 ppm de 2-nonanona o 2-tridecanona. NPs fueron caracterizadas a través de microscopía electrónica de barrido y dispersión dinámica de luz durante 3 semanas. Bioensayo de crecimiento se realizó en placa Petri bicompartimentada conteniendo medio Murashige y Skoog (pH 5.7). En la superficie de un compartimento se colocaron 4 plántulas de *S. lycopersicum* y en el segundo 10 μ L de ALN conteniendo 2-nonanona o 2-tridecanona. Se determinó el crecimiento foliar y el desarrollo radicular. Al encapsular COVs en ALN, el tamaño en promedio fue 268 nm, índice de Polidispersidad (IPD) de 0,25 y potencial zeta de -26.87 mV. Incrementaron los parámetros en la tercera semana a 343.57 nm, 0.34 IPD y -25.90 mV. Bioensayo demostró al día 9 que 2-nonanona y 2-tridecanona liberada desde ALN tienen a incrementar el crecimiento de raíz principal y foliar (~10%). Ambos COVs liberados incrementan fuertemente (26 al 77%) la longitud raíces laterales de *S. lycopersicum* al día 6 y 9. Al día 9 ambos COVs incrementan en un 97% la densidad de pelos radicales. La encapsulación de COVs en ALN constituye una estrategia biotecnológica de innovación para incrementar la tasa de crecimiento de *S. lycopersicum*, con potencial aplicación en cultivos de invernadero.

¹ Laboratorio de Nanobiotecnología Ambiental, Departamento de Ingeniería Química, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile

² Laboratorio de Química Ecológica, Departamento de Ciencias Químicas y Recursos Naturales, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile

³ Centro de Excelencia en Investigación Biotecnológica Aplicada al Medio Ambiente (CIBAMA), Facultad de Ingeniería y Ciencias, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile

p.fincheira01@ufromail.cl

OPTIMIZACIÓN DE TÉCNICAS DE EDICIÓN GENÓMICA LIBRES DE DNA EN SOJA

Fleitas AL¹, Gallino JP², Señorale M³, Bonnacarrere V², Vidal S¹.

Las metodologías de edición genómica, especialmente aquellas basadas en el sistema CRISPR/Cas9 se han establecido en los últimos años como herramientas poderosas al servicio del mejoramiento vegetal. Recientemente se han reportado metodologías de edición genómica «libres de DNA» en plantas, las cuales garantizan la no incorporación de DNA foráneo al genoma y confieren ventajas a las variedades editadas desde el punto de vista de su regulación. En este sentido, buscamos optimizar una metodología optimizada para la edición genómica libre de DNA de soja. Los sistemas libres de DNA consisten en incorporar en las células vegetales ambos componentes necesarios para realizar la edición genómica, estos son, la proteína Cas9 y los pequeños RNAs guía (SgRNA). La proteína Cas9 puede ser incorporada como proteína propiamente o como su mRNA codificante (Cas9-mRNA) generado mediante transcripción in vitro (IVT). Por otra parte, los SgRNAs son producidos por IVT.

El trabajo pretende abordar dos interrogantes: por un lado, qué forma de Cas9 es más eficiente utilizar, la proteína o su mRNA; por otro lado, qué tejido y metodología de entrega es más efectiva.

En cuanto al trabajo con la proteína Cas9, hemos generado construcciones que permiten la síntesis del Cas9-mRNA optimizado para su expresión en soja. Asimismo, hemos optimizado la expresión y purificación de la proteína Cas9 recombinante la cual ha sido activa en ensayos de corte realizados in vitro.

En cuanto a las metodologías transformación, hemos optimizado la entrega de proteínas mediante biolística en embriones somáticos, hemos implementado con éxito una metodología de transformación del ovario de la flor y hemos puesto a punto un protocolo para la obtención de protoplastos.

Estas metodologías desarrolladas serán utilizadas en combinación para editar genes en soja.

¹Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay

²Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Unidad de Biotecnología, Estación Experimental INIA Las Brujas. Canelones, Uruguay

³Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay

VALORIZACIÓN DE PARIENTES SILVESTRES DE LA PAPA COMO RECURSOS FITOGENÉTICOS MEDIANTE HERRAMIENTAS CITOGENÉTICAS, GENÉTICAS Y GENÓMICAS

Gaiero P.¹, Vilaró F.², de Jong H.³, Speranza P.¹

La mayor incidencia de factores adversos bióticos y abióticos pone en riesgo la estabilidad de la producción de los principales cultivos de los que depende la seguridad alimentaria de la humanidad. Afortunadamente, los mejoradores cuentan con un rico acervo de parientes silvestres que suministran fuentes de resistencia a enfermedades y tolerancia a factores ambientales adversos. La papa es el tercer alimento más importante y es fuente de carbohidratos, vitaminas y otros micronutrientes para muchos pueblos del mundo. Su acervo genético es el más diverso y accesible de todos los cultivos y ha aportado muchos caracteres de interés al mejoramiento de la papa cultivada. Para utilizar tales caracteres efectivamente, los mejoradores requieren de herramientas que faciliten la exploración y explotación de la diversidad genética de los parientes silvestres de la papa. Los programas de introgresión para incorporar la cromatina silvestre al contexto genético del cultivo hasta ahora han recurrido a estudios citogenéticos y genéticos para captar caracteres deseables de los dadores silvestres. Estos enfoques, suplementados con tecnologías genómicas más recientes, pueden asistir en el uso de los parientes de la papa en pre-mejoramiento. En este trabajo nos enfocaremos en las herramientas que se han desarrollado para facilitar y constatar los cruzamientos entre la papa y sus parientes silvestres (en particular *Solanum commersonii* y *S. chacoense*), para seguir el destino de los cromosomas silvestres en los híbridos y retrocruzas y confirmar su apareamiento con los cromosomas de la papa. Otros enfoques permiten predecir la recombinación y evaluar la eficiencia de la introgresión de caracteres de interés a nivel de cromosomas, mapa genético y secuencias genómicas. Esta información también puede facilitar la cisgénesis y la edición genómica para mejorar las variedades de papa, así como la identificación de marcadores para selección asistida y la búsqueda de genes candidatos.

¹ Laboratorio de Evolución y Domesticación de las Plantas. Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Uruguay

² Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Programa Nac. Inv. Producción Hortícola. Estación Experimental INIA Las Brujas. Canelones, Uruguay

³ Laboratory of Genetics, Wageningen University & Research, Droevendaalsesteeg 1, P.O. Box 16, 6708 PB, Wageningen, The Netherlands.

GENOMICS APPLIED TO WEED BIOLOGY AND MANAGEMENT

Gaines T.¹, Merotto A.²

Weeds are one of the main constraints of food, fiber, and bioenergy production. In the last 50 year's large advances in chemistry resulted in the development of herbicides, which are currently the main tool for weed control. Recently, genomics had a significant development of knowledge that is revolutionizing biology studies. On plant science, the initial studies were focused on model and in the main crop species. In the last decade, the number of genomics studies in weed biology has grown exponentially resulting in a new era in Weed Science. The potential of genomic studies on this area is related to herbicide resistance, the discovery of new herbicide targets, weed identification, and diversity, and on the genetic basis of weed traits, invasiveness, seed dormancy, allelopathy, biological control and reproductive characters. Currently, close to ten weed species have a sequenced reference genome. This knowledge has provided a large impact in several studies, but also indicated a challenge for the improvement of the already sequenced species and also for the sequencing of the other important weeds. Recently, the International Weed Genomics Consortium (IWGC) was established for a coordinated international effort in weed genomics. The main focus of the IWGC are i. to obtain reference genomes for the most important weed species worldwide; ii. to provide user-friendly genome analysis tools and user training through web-based databases and resources; and iii. to facilitate discussion and collaborations within this emerging field. The benefits of genomics for the basic studies on weed science are undoubted. However, the challenge is applying this knowledge for improving the management of weeds. New control methods based on applying molecular data from genome-wide analyses may soon emerge.

¹Colorado State University, USA

²Federal University of Rio Grande do Sul, Brasil

ASPECTOS FITOQUÍMICOS DEL CANNABIS

García C.

El cannabis es una planta ampliamente distribuida en el planeta que ha proporcionado al hombre una fuente de fibra, alimentos, aceite, medicinas y estupefacientes desde tiempos del neolítico. En ella se han identificado a la fecha más de medio millar de compuestos, entre los que se destacan cannabinoides, terpenoides y flavonoides. De estos, los cannabinoides son los compuestos de mayor relevancia dada su actividad biológica y su producción exclusiva por este género vegetal. No obstante el resto de los metabolitos resultan de interés, ya sea por contribuir a las características organolépticas de la planta, por modular la psicoactividad de los cannabinoides o por presentar actividades biológicas per se.

Si bien el cannabis es considerada en la actualidad como una planta monoespecífica (*Cannabis sativa* L.), se pueden hallar diferentes subespecies o variedades con base en aspectos morfológicos y microscópicos. Más allá de eso se pueden establecer diferentes genotipos, así como distintos quimiotipos de acuerdo con el contenido de cannabinoides e incluso de terpenos. El tipo y la cantidad de metabolitos secundarios no sólo varían según el genotipo, sino que también dependen del órgano vegetal, de la edad de la planta y de las condiciones de cultivo. De esta manera, los efectos sobre los sistemas biológicos de un extracto de cannabis serán potencialmente diferentes dependiendo de los factores antes mencionados. Frente a condiciones de cultivo controladas, la actividad biológica dependerá del quimiotipo utilizado.

En esta presentación se introducirán los aspectos farmacognósticos y fitoquímicos más relevantes del cannabis, con mención a los principales metabolitos secundarios, su biosíntesis, extracción y análisis. Así mismo se presentarán avances de los estudios fitoquímicos y metabolómicos que se vienen llevando a cabo sobre las dos variedades de cannabis para uso adulto recreativo comercializadas en Uruguay.

POTATO PLANTS (*SOLANUM TUBEROSUM* L.) WITH REDUCED TUBER ENZYMATIC BROWNING DEVELOPED BY GENOME EDITING WITH THE CRISPR/CAS9 SYSTEM

González M.N.^{1,2}, Massa G.A.^{1,2,3}, Andersson M.⁴, Storani L.^{1,2}, Décima Oneto C.A.², Hofvander P.^{4*}, Feingold S.E.^{2*}

Enzymatic browning of potato tubers (*Solanum tuberosum* L.) is the cause of undesirable changes in organoleptic properties and the loss of nutritional value of fresh and processed products, which represents a serious quality deficiency for industry and consumers. This process is a consequence of Polyphenol oxidases (PPOs) activity, which catalyze the conversion of phenolic substrates to quinones, leading to the formation of dark-colored precipitates. In potato, PPOs are encoded by a multi-gene family, with at least four genes expressed in the tuber. In this work, we have produced the specific knock out of a *PPO* gene in the tetraploid cultivar Desiree, by inducing mutations with a CRISPR/Cas9 system. Ribonucleoprotein complexes (RNPs), formed by two single-guide RNAs (sgRNAs) and Cas9 nuclease were transfected to potato protoplasts, and complete plants were regenerated. Mutations were screened by High-Resolution Fragment Analysis (HRFA) on the target gene of 92 regenerated lines, and the genome editing efficiency obtained was 40%, with 24% of the edited lines carrying mutations in the four alleles of the target gene. Even though the majority of mutations were small deletions - ranging from 1 to 18 bp -, large fragment deletions were obtained coincidentally with the loss of the sequence between the target sites of both sgRNAs. No off target mutations were detected in other members of the *PPO* gene family of selected edited lines. Lines carrying mutations in all the four alleles of the target gene displayed a significant reduction in PPO activity and enzymatic browning in the tubers when compared to the control. Our results demonstrate that CRISPR/Cas9 can be applied to develop transgene-free potato varieties that maintain the organoleptic, antioxidant and nutritional properties during harvest and post-harvest procedures.

¹ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), C1425FQB, Godoy Cruz 2290, CABA, Argentina

² Laboratorio de Agrobiotecnología, INTA - EEA Balcarce, Ruta 226, Km 73.5, Balcarce, B7620, Argentina

³ Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata, Ruta 226, Km 73.5, Balcarce, B7620, Argentina

⁴ Department of Plant Breeding, Swedish University of Agricultural Sciences, P.O. Box 101, SE-23053 Alnarp, Sweden

* Joint senior authors

INDUSTRIA Y CIENCIA: LOGROS Y PERSPECTIVAS DE DESARROLLO PARA EL CANNABIS MEDICINAL EN URUGUAY

González Ramos, H.

Tras años de prohibición, la actual industria del Cannabis Medicinal crece rápidamente a nivel global. El marco regulatorio vanguardista de Uruguay genera condiciones para su desarrollo. Los esfuerzos se transforman en resultados tras recorrer decisiones en las instituciones públicas de salud, de regulación y control, junto con las decisiones de emprendedores que se empeñan en hacer realidad sus proyectos innovadores. La historia de uso humano de esta planta es diversa y data de miles de años, ocupando lugares en el desarrollo industrial, medicinal y social. La planta contiene cientos de cannabinoides que, junto con otras moléculas, generan distintas posibilidades de formulación, aportando valor terapéutico para diferentes condiciones patológicas. En sintonía con el uso pluripotencial que ofrece la planta, los emprendimientos que pretenden apuntalar el desarrollo del cannabis serán más fructíferos en la medida que incluyan el aporte de profesionales de distintas áreas, no solo empresarios y abogados, sino también profesionales de áreas de la ciencia, incluyendo biología, química, agronomía e ingeniería. Siendo una industria innovadora, el desarrollo de los sistemas productivos y de calidad implican la generación de soluciones a problemas que enfrentamos por primera vez en Uruguay, paradójicamente, mientras se trabaja con una planta milenaria. Esta presentación relata los logros de un emprendimiento de Cannabis Medicinal en Uruguay, los estándares de producción y de calidad alcanzados, que permiten acceder a mercados de máxima exigencia, destacando el rol que juegan los profesionales científicos, así como el potencial que ofrece la planta para continuar proyectando transferencias del conocimiento hacia aplicaciones de valor económico y social.

FUTURE REGULATION OF GENOME EDITING TECHNIQUES IN THE EU: DETECTION AND SEVERE IDENTIFICATION PROBLEMS

Hartung F.

In July 2018 the Court of Justice of the European Union CJEU issued the final decision that organisms treated by new techniques of site-directed mutations (also known as genome editing) result in GMOs. They need to be regulated under the gene technology law of the EU, including all necessary follow up safety and marketing obligations. The ruling causes a lot of irritation in the scientific community, plant breeders and farmers and raises reasonable unsafety regarding the practical implementation of the necessary obligations. Recently the European network of GMO laboratories clearly stated in its report, that it may be possible to detect GE events but not to identify which technique was used from whom in a specific case (ENGL report, JRC 116289, 2019). Grohmann et al. (2019) reported the same problems short before. Therefore, an applicant cannot deliver an event-specific identification method, which is required for approval and necessary for the enforcement of GMO legislation by the member states.

Since the CJEU-ruling several scientific organizations like the VIB, EPSO and many others expressed their concern in the form of statements or open letters and claim for an update of the EU GMO law. In May 2019, a coalition of 14 EU member states, led by the Netherlands and Estonia, are calling for such an update too.

The problems with detection and identification of GE plants and some ideas for a possible GMO law update will be presented and discussed.

PUTTING SCIENCE INTO ACTION AGAINST CROP DISEASES

Diana Horvath

Crop diseases are a serious, under-recognized cause of food loss and a significant threat to global food security, with annual losses of \$220 billion. The use of crop chemicals and conventional breeding for resistance are important tools for protecting harvests but are not adequate to control many major plant diseases. Smallholder farmers who feed a third of the world often lack access to existing tools.

Advances in the fundamental knowledge of plant disease and immunity make it possible to produce durable genetic solutions for crop disease. The 2Blades Foundation has assembled and supported programs that advance the most promising discoveries into practical applications for agriculture through the development of disease-resistant seeds. It has demonstrated new options for resistance in wheat, soybean, potato, and tomato against their most significant unmanaged major diseases; in the lab, the greenhouse, and the field. 2Blades promotes their deployment in agriculture worldwide, with a particular aim to benefit developing countries.

PERCEPCIÓN, COMUNICACIÓN Y ALGUNAS LECCIONES APRENDIDAS

Levitus G.

La edición génica hoy se suma a las herramientas con las que cuenta el fitomejorador para lograr nuevas variedades vegetales. Estas técnicas se están empleando para desarrollar una amplia gama de cultivos y características. Desde el punto de vista técnico, la edición génica ofrece la posibilidad de realizar uno o varios cambios en el genoma de manera muy precisa y poco invasiva. Más allá del potencial técnico, la edición génica se posiciona como una oportunidad muy promisoriosa para diversos actores del sector público y privado y diferentes modelos de negocio.

El impacto de las técnicas de edición génica está siendo discutido en los ámbitos nacionales e internacionales, donde se busca evitar trabas o restricciones que frenen su avance. En este sentido, lograr la aceptación de todos los eslabones de la cadena productiva es clave, incluyendo los productores agropecuarios, exportadores y consumidores.

Hoy los investigadores, las empresas y las agencias gubernamentales están comunicando activamente sobre los beneficios que puede aportar la edición génica. Se realizan talleres y encuentros para discutir cómo comunicar de manera efectiva sobre este tema. Esta comunicación se da en un contexto complejo, en el que prevalecen la preocupación de la sociedad sobre la actividad agropecuaria, las fake news, la pos verdad y el intrusismo.

De algunos talleres en los que participamos, se desprende que al comunicar sobre los diferentes aspectos de la edición génica debemos tener cuidado con la exageración (que genera falsas promesas), contar con claridad el grado de avance de los proyectos (por el momento hay solo un producto en el mercado, en Estados Unidos), evitar simplificaciones que lleven a pensar que se trata de técnicas de «garage» sin controles, y tratar de usar imágenes que nos acerquen más a los cultivos, los alimentos y las personas, en lugar de las tijeras, inyecciones, guantes y barbijos.

COMBINANDO BIOLOGÍA SINTÉTICA Y EDICIÓN GENÓMICA PARA DESARROLLAR UNA NUEVA GENERACIÓN DE CULTIVOS RESISTENTES A HERBICIDAS

Lieber L.¹

Bioheuris es una empresa de agrobiotecnología dedicada al desarrollo de Sistemas Sustentables de Control de Malezas. Su propuesta se basa en la introducción de tecnologías que permitan retrasar la aparición de malezas resistentes con una menor carga de herbicidas en el ambiente. Combina el trabajo de una plataforma de Biología Sintética y una de Edición Génica para lograr cultivos resistentes a múltiples herbicidas. La plataforma de Biología Sintética utiliza estrategias de diseño racional y evolución dirigida de proteínas para identificar mutaciones en los genes de la planta que confieran resistencia a los herbicidas. Estas mutaciones son introducidas en el cultivo mediante técnicas de edición génica basadas en el bombardeo de Ribonucleoproteínas. Bioheuris está trabajando actualmente en el desarrollo de resistencia en 5 sitios de acción de herbicidas en soja, sorgo y alfalfa.

¿POR QUÉ LA FENÓMICA ES CLAVE PARA ENFRENTAR EL CAMBIO CLIMÁTICO Y LA SEGURIDAD ALIMENTARIA?

Lobos G.A.

Debido al cambio climático y la escasez de alimentos proyectada para las siguientes décadas, no solo será necesario desarrollar cultivares con mayor tolerancia al estrés ambiental, sino que también es imperativo reducir el tiempo de los ciclos del mejoramiento. Para esto será necesario incorporar un nuevo conjunto de características morfo-fisiológicas y físico-químicas; relevantes para un adecuado diseño de los cruzamientos. Desafortunadamente, debido a la gran cantidad de genotipos a evaluar, las mediciones convencionales son inviables, especialmente en condiciones de campo. El fenotipado de alto rendimiento (high-throughput phenotyping) en campo, facilita la recopilación de una gran cantidad de información en un corto período de tiempo. En la medida en que se realice una caracterización holística de la planta (fenómica) en entornos adversos, será posible seleccionar, objetivamente, los mejores genotipos (*forward phenomics*), pero también comprender por qué dicho individuo se destacó del resto (*reverse phenomics*). En este sentido, el Centro de Mejoramiento Genético y Fenómica Vegetal de la Universidad de Talca, Chile, ha focalizado los esfuerzos en la estimación de estos «caracteres complejos» (ej., intercambio de gases, fluorescencia modulada de la clorofila a, concentración de pigmentos y osmorreguladores, composición isotópica del carbono, entre otros) vía espectrometría y termografía, en varios programas de mejoramiento activos (trigo, alfalfa, quinoa, arándanos y frutilla) orientados a estreses abióticos (salinidad, déficit hídrico y alta temperatura).

Esta línea de trabajo ha sido financiada por diferentes fuentes CONICYT: FONDECYT (1110678, 212039 y 1180252), FONDEQUIP (EQM130073 y EQM190124) y FONDEF IDeA (14110106 y 14120106).

USO DE DIFERENTES ALTERNATIVAS PARA LA PROPAGACIÓN POR EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE CULTIVARES DE *MUSA* SPP.: SU ESCALADO EN BIOFÁBRICAS

López J., Montano N., Reinaldo D., Rodríguez D., Medero V., Basail M., Rayas A., Santos A., Beovides Y., Gutierrez Y.

Los plátanos y bananos constituyen una fuente de alimento para millones de personas alrededor del mundo donde la fruta forma parte de su dieta alimentaria, además de fuente de empleo. En Cuba, su cultivo posee una alta prioridad en el programa alimentario nacional debido a su capacidad de producción durante todo el año, alta tasa de consumo per cápita y diversidad de usos. Siendo necesario abordar otros métodos de propagación *in vitro* como la embriogénesis somática, debido a la insuficiente disponibilidad de material de plantación procedente de hijos, así como los producidos mediante la propagación por organogénesis en biofábricas para satisfacer las demandas de semillas. Se utilizaron los cultivares 'CEMSA 3/4', 'INIVIT PV 06-30', 'FHIA-25' e 'INIVIT PB-2012' para inducir el proceso embriogénico a partir de ápices de brotes de yemas axilares y flores masculinas inoculados en medio de cultivo líquido y semisólido. Los explantes estudiados posibilitaron la obtención de callos con estructuras embriogénicas seguido del desarrollo de las suspensiones celulares embriogénicas. Sin embargo, el uso de estos explantes inoculados en medio de cultivo líquido sin pasar por una fase de callo facilitó el desarrollo de suspensiones celulares embriogénicas en menor período de tiempo. Basado en la totipotencia celular se logró la histodiferenciación de los embriones somáticos hasta la formación de plantas completas. Los resultados alcanzados permitieron disponer de una metodología para el escalado de la propagación por embriogénesis somática de cultivares de interés a ocho biofábricas cubanas en las etapas de maduración y germinación, como una alternativa para mitigar el crítico cuello de botella en la producción comercial de semillas para la cadena productiva de este cultivo.

STRAWBERRY TREE (*ARBUTUS UNEDO* L.) PATHOGEN RESISTANCE: A CHEMICAL WARFARE

Martins J.F.¹, Veríssimo P.², Batista M.T.³, Cavaleiro C.³, Pinto G.⁴, and Canhoto J.M.¹

Strawberry tree (*Arbutus unedo*) is a small Mediterranean perennial tree that produces edible berries. Due to its natural resistance to both biotic and abiotic stress, the characterization of its defense mechanisms may be a crucial step to develop disease control strategies for other species and improve production. Thus, the main objective of this work is to characterize both the biochemical composition and mycobiome of strawberry tree as well as test the potential as biocontrol agents of some endophytes. For this purpose, 62 fungi from 20 different genera were isolated from wild trees and identified after the amplicons were searched on GeneBank (ITS region of rDNA). To test the possible antagonism effect, several symbionts were co-cultured with pathogens and the reduction in growth was calculated when compared to a control group. *Thricoderma* sp. proved to be a very successful antagonist of several pathogens causing leaf spot as well as *Phytophthora cinnamomi* (an oomycete responsible for ink disease). *In vitro* strawberry tree clones that have been multiplied through shoot proliferation on Anderson medium (2.0 mg/L BAP) and rooted with 2.0 mg/L IBA. Plants were then inoculated with *P. cinnamomi* and *T. viride*, and the endophyte proved to be efficient to protect plants against the pathogen. To unveil this protection mechanism, an enzymatic activity study of this endophyte was carried out, and the volatiles produced were identified through GC-MS. Furthermore, chemical composition of wild trees was studied through HPLC-PDA and LC-MS/MS. Among the several compounds identified, hydroquinone and arbutin were quantified and its antifungal effect tested. Both compounds were also effective against *P. cinnamomi*, suggesting a synergic effect and a complex, but efficient defense mechanism against pathogens.

The results obtained on this work elucidate the complex defense plant mechanisms against biotic agents, and may be a contribution to develop more efficient and environmentally friendly biocontrol strategies on crop production.

¹Plant Biotechnology Laboratory, Centre for Functional Ecology, Department of Life Sciences, University of Coimbra, Portugal

²Molecular Biotechnology Laboratory, Center for Neuroscience and Cell Biology, Department of Life Sciences, University of Coimbra

³Pharmacognosy Laboratory, Faculty of Pharmacy, University of Coimbra,

⁴Fungal and Plant Biology Laboratory, Centre for Environmental and Marine Studies, Department of Biology, University of Aveiro, Portugal

CRISPR / CAS TO IMPROVE THE NUTRITIONAL AND INDUSTRIAL QUALITY OF POTATOES

Massa G.

Potato is one of the most important foods in human dietary. Cultivated potato has a tetraploid, highly heterozygous genome and it is clonally propagated. These characteristics make conventional breeding and genetic analysis very challenging. In this context, the CRISPR/Cas9 technology has been successfully utilized in potato for precise Genetic Edition. Two fundamental aspects of the nutritional and industrial quality in potatoes are the behavior of the varieties respect to «cold-induced sweetening» and «enzymatic browning» in tuber. Cold-induced sweetening occurs when harvested tubers are stored at temperatures below 10 °C and for the action of vacuolar invertase the tuber accumulates reducing sugars. The enzymatic browning is for the action of Polyphenol oxidases (PPO) enzymes that catalyze the oxidation of phenolic compounds in potatoes producing black spots on the tubers, with the consequent economic losses due to discarding and reduction in consumer acceptance. Our objective is to develop varieties with reduction of cold-induced sweetening and enzymatic browning by CRISPR/Cas9 system. In a first approximation, were obtained constructions with two RNA guide specific for vacuolar invertase (Vac-Inv) and polyphenol oxidase 2 (StPPO2) genes. A Golden Gate assembled binary vector which codifies for the CRISPR/Cas9 reagents, was stably integrated into potato genome via *Agrobacterium tumefaciens*. The CRISPR for Vac-Inv was evaluated by protoplast transfection previously to transformation. We analyzed the transgenic plants by HRFA and CAPS and we obtained 9,7 % of edited plants in at least one allele of StPPO2 gene. Another objective is to obtain edited potatoes plants in both genes by protoplast transfections with ribonucleoprotein (gRNA/Cas9), DNA-free method. The GE represents the most promising and safe approach to achieve a reduction in production costs, a decrease in the discarding of raw material and a product of higher nutritional quality for the health of consumers.

MICROPROPAGACIÓN DE LA PIÑA PARA LA INTRODUCCIÓN DE NUEVOS GENOTIPOS A ESCALA PRODUCTIVA CON EL OBJETIVO DE DIVERSIFICAR LA PRODUCCIÓN

Nápoles L.¹, Rodríguez R.², Hernández L.³, Cid-Ruíz M.¹, Lorente G.Y.¹, Concepción O.¹

En Cuba la producción de piñas se basó durante muchos años exclusivamente en la variedad 'Española Roja', de gran rusticidad y adaptación, pero con bajo rendimiento y limitada calidad. La provincia de Ciego de Ávila es la principal región productora y exportadora de fruta fresca, luego de la introducción en 2009 del híbrido 'MD2'. Sin embargo, en la actualidad requiere incrementar las plantaciones con nuevos genotipos para superar la incidencia de virus, de enfermedades fungosas y el efecto del cambio climático. El presente trabajo resume tres años de labor para introducir los genotipos de piña: 'MD2', 'Champaka 153F', 'Pérola' y 'Cayena Lisa Brasil', del Banco de Germoplasma del Centro de Bioplantas. Se realizó desde el establecimiento *in vitro* de las yemas axilares de las coronas hasta la evaluación del desarrollo morfológico en las etapas de aclimatización, vivero y campo. La propagación *in vitro* permitió producir plantas libres de los virus PMWaV-1, PMWaV-2 y PMWaV-3 detectados por amplificación por RT-PCR del gen que codifica la proteína de la cápside de cada especie viral. Se utilizaron los biorreactores de inmersión temporal en combinación con el método convencional para incrementar los volúmenes de explantes en multiplicación en el laboratorio. La aclimatización se realizó bajo casas de cubierta plástica durante 90 días y luego se trasladaron a vivero con cubierta de malla sombra 60% durante otros 60 días. El traslado y plantación en campo se realizó en enero 2019. De manera general se comprobó el potencial de la técnica de micropropagación y se demostraron diferentes aspectos relacionados con la calidad morfológica de las plantas producidas. Este resultado constituye una alternativa para crear bancos de «semillas» de alta calidad y satisfacer la demanda de productores en biofábricas y empresas agrícolas.

¹Centro de Bioplantas, Universidad de Ciego de Ávila, Cuba

²Empresa Agroindustrial Ceballos, Ciego de Ávila, Cuba

³Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical, La Habana, Cuba

oconcepcion@bioplantas.cu

INSIGHTS INTO *CLAVICEPS PASPALI* SECRETOME: A FIRST APPROACH INTO EFFECTOR MOLECULES EXPRESSED DURING *CLAVICEPS PASPALI*-*PASPALUM DILATATUM* INTERACTION

Oberti, H.¹; Reyno, R.²; Murchio, S.¹; Feijoo, M.³; Schwartzman C.¹; Spangenberg G.⁴; Dalla-Rizza, M.¹

The ascomycete *Claviceps paspali* is a biotrophic flower pathogen of *Paspalum* spp. genus. This fungus has become a serious problem threatening the forage potential of some susceptible species like *P. dilatatum*. Infections with this pathogen lead to the formation of sclerotia instead of seed in the infected flower, drastically reducing the seed production of these plants almost to no commercial use. Also, infected seeds had toxic effects on grazing animals reducing performance. Filamentous plant pathogens that establish biotrophic interactions need to avoid plant immune responses. Colonization is governed in all systems by hundreds of secreted fungal effector molecules. These effectors suppress plant defense responses and modulate plant physiology to accommodate fungal invaders and provide them with nutrients. Using a computational pipeline integrating data from RNA-seq during infection of *C. paspali* in *P. dilatatum* and bioinformatic predictions, we have identified secreted proteins of this fungus. Small secreted and effector-like proteins similar to agents of fungal-plant pathogenesis were also identified within the secretome. In particular, we predicts 8122 genes with coding potential from the draft genome of *C. paspali* obtained from NCBI database. From the total proteome, 367 (4,5%) were predicted as secreted proteins. From these predicted secreted proteins, 25 (6,8%) had known functions as enzymes that degrade cell walls and 134 (36,5%) had annotated PFAM domains. Also, a total of 220 (60%) proteins could be predicted as effectors. Based on RNA-seq expression analysis we also determine that at least 6 of these secreted proteins are in the Top50 differential expressed genes within the first 96 hrs post-infection in the stigma of *P. dilatatum*. With this study, we provide new insights that will provide a basis for a better understanding of this pathosystem. Also, we present a collection of candidate genes to be evaluated for functional roles in this plant–microbe interaction.

¹Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas; ²Programa Nacional de Forraje y Pasturas, INIA Tacuarembó. ³Centro Universitario Regional Este, Udelar. ⁴Agriculture Victoria, Agribio Australia

AVANCES EN LA MICROPROPAGACIÓN DE *HYERONIMA* *ALCHORNEOIDES*

Pérez, J.^{1,2}, Abdelnour-Esquivel, A.^{1,2}, Murillo, O.³

Hieronyma alchorneoides es una especie con gran potencial comercial debido a la calidad de su madera, siendo la única especie nativa costarricense que puede competir con especies exóticas de mayor aprovechamiento. En el presente trabajo se planteó una estrategia biotecnológica para la propagación masiva de la especie, dados su potencial, alta demanda de material de siembra sin suplir y bajas tasas de germinación de las semillas. Segmentos de hoja fueron desinfectados en doble incubación con hipoclorito de sodio y peróxido de hidrógeno e incubados en la solución antioxidante con 5 mL/L de la solución biocida de la casa comercial Laboratorios ARVI S.A. (Methylisothiazolone y Methylchloroisothiazolinone) previo a su cultivo en el medio MS. Después de estandarizar la esterilización superficial de los segmentos, se continuó con la etapa de embriogénesis somática. Segmentos de hoja desinfectados fueron cultivados en el medio MS complementado con vitaminas B5 aminoácidos y una concentración de auxinas 0, 1, 2 o 3 mg/L ANA, 2,4-D y Picloram. Los callos producidos fueron cultivados en el medio de regeneración que consistió de sales MS, vitaminas B5 y una concentración de citocinina de 0, 1, 2 o 3 mg/L BAP. Se observó hasta un 60 % de explantes asépticos incubando los explantes por 20 min en 2% (v/v) NaOCl y 3 min en 1 % H₂O₂. En la callogénesis se observó que todas las concentraciones de reguladores de crecimiento produjeron callos, sin embargo, la mayor cantidad de callos embriogénicos fue observada con Picloram en un promedio de 86% de explantes produciendo embriones somáticos. Los ensayos de regeneración de estos embriones continúan en evaluación. Los resultados del presente trabajo constituyen un apoyo esencial para el sector forestal costarricense en la reproducción de esta especie tan atractiva y las experiencias generadas podrían ser trasladadas a otras especies de interés comercial y de conservación.

¹ Centro de investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica

² Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica

³ Escuela de Ingeniería Forestal, Instituto Tecnológico de Costa Rica

DIVERSIDAD GENÉTICA Y SENSIBILIDAD A FUNGICIDAS: UNA MIRADA PRÁCTICA A *MONILIOPHTHORA RORERI* EN ECUADOR

Pérez-Martínez S.¹, Villavicencio M.², Espinosa F.², Amaya D.², Romero C.², Quiroz, J.³, Mestanza, S.³, Sosa del Castillo D.^{1,2*}

La enfermedad pudrición helada del fruto, causada por *Moniliophthora roreri*, ha mantenido en jaque a los productores de cacao desde 1916, cuando fue reportada en la Costa del Ecuador. Esta misma situación se presenta en cada nuevo avance de la enfermedad en el Hemisferio, donde permanece contenida hasta el presente. En Ecuador, los estudios previos de diversidad genética del hongo tienen en común: 1) que no ha sido asociada a marcadores fenotípicos de interés fitopatológico (agresividad o la sensibilidad a fungicidas) y 2) una subrepresentación de aislados de la Amazonía. Este trabajo analiza la diversidad genética de *M. roreri* a partir de aislados de la Amazonía y de la Costa en asociación con la sensibilidad a los fungicidas flutolanil y asozystrobin, y a la agresividad *in vivo* en frutos de cacao. Se analizaron 75 aislados, incluyendo 70% de la Amazonía. La diversidad genética se determinó mediante microsatélites y la sensibilidad a los fungicidas mediante determinación de la IC50 *in vitro* ($\mu\text{g ml}^{-1}$).

Resultados. Hasta el momento hemos encontrado que el rango IC50 del flutolanil está entre 2.6×10^{-3} y 145.6×10^{-3} , con el 3% de los aislados en el rango superior (131.0 - 145.6×10^{-3}). Hubo diferencias significativas en el promedio de IC50 de Amazonía y Costa (30×10^{-3} y 50×10^{-3}), respectivamente. El promedio de diversidad genética entre ambas regiones fue $H_s=0.63$ y el índice de fijación $F_{st}=0.11$, lo que indica un bajo % de diversidad genética. Estos resultados, aunque en progreso, pueden constituir insumos para: 1) las casas comerciales de fungicidas, responsabilizados con evitar la resistencia a las moléculas, 2) gestores de las políticas públicas nacionales para la producción y la productividad del cultivo, y 3) para fitomejoradores, que pueden dirigir mejor sus ensayos en los programas de mejoramiento genético del cultivo.

¹Universidad Estatal de Milagro, Milagro-Ecuador

²Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, ESPOL. Guayaquil-Ecuador

³Estación Experimental Litoral Sur, INIAP. Guayas, Ecuador

dasosa@espol.edu.ec

BÚSQUEDA DE COMPUESTOS BIOACTIVOS CON APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA EN RECURSOS FITOGENÉTICOS NATIVOS Y NATURALIZADOS

Piñuel L.¹, Boeri P.¹, Dalzotto D.¹, Maschio J.I.², Hoffmann E.¹, Torreta J.¹, Carrillo W.³, Barrio D.¹ & Sharry S.^{1,4,5}

Desde hace varios años se ha fortalecido el interés mundial en investigar el aprovechamiento de la biodiversidad genética de especies vegetales, dada la importancia de su valor nutritivo y calidad biológica. La biodiversidad específica de nuestro país, brinda la posibilidad de obtener productos de interés biológico derivados de la bioprospección y de las biotecnologías simples. Particularmente, en ecosistemas áridos y semiáridos, las especies vegetales se encuentran sometidas a condiciones de estrés que inducen transformaciones metabólicas para asegurar su supervivencia. Así, la selección natural favorece la presencia de especies con alto nivel de defensa y ello se traduce en una mayor síntesis de compuestos bioactivos. A pesar de que la biodiversidad es fuente de bioproductos, solo el 5-15% de las especies han sido estudiadas. En la actualidad, se ha intensificado la tendencia a buscar y consumir alimentos saludables de origen vegetal. Esto implica la necesidad de conocer la composición nutricional de los alimentos que consumimos y adicionar compuestos bioactivos y concentrados proteicos con el fin de lograr la funcionalidad de los mismos. Nuestro grupo de investigación estudia especies vegetales que crecen en la Nor- Patagonia Argentina, y evaluamos su uso actual o potencial tanto como recursos, alimenticios o medicinales. Pese a la utilización regional de las plantas, en muchos casos se desconoce cuál es el aporte nutricional y cuáles son los principios activos y efectos farmacológicos potenciales. Así, la bioprospección nos permite identificar compuestos activos de las mismas y junto con técnicas biotecnológicas, son herramientas que favorecen el conocimiento de las especies. De esta manera, podemos pensar en una bioeconomía, basada en el conocimiento donde los recursos fitogenéticos podrán ser fuentes alternativas de proteínas y compuestos bioactivos para el desarrollo de nuevos alimentos con efectos beneficiosos para la salud y agreguen valor a la economía regional.

¹ CIT-RIO NEGRO Sede Atlántica, Universidad Nacional de Rio Negro (UNRN- CONICET). Viedma, Argentina

² Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Catamarca. Catamarca, Argentina

³ Departamento de Investigación. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Técnica de Babahoyo. Montalvo, Ecuador

⁴ Laboratorio de Investigaciones de la Madera. LIMAD-FCAyF-UNLP. CC 31.La Plata (1900) Buenos Aires, Argentina

⁵ Comisión de Investigaciones Científicas-Buenos Aires (CICPBA), Argentina

Email: lpinuel@unrn.edu.ar

INTEGRATION OF GENOMICS AND HIGH-THROUGHPUT PHENOTYPING FOR IMPROVED YIELD PREDICTION MODELING IN WHEAT

Poland, J.

To realize a new level of yield potential, breeding programs must increase the rate of genetic gain by evaluating larger populations, making more accurate selections, and decreasing the length of the breeding cycle. We are applying novel developments in remote sensing with unmanned aerial vehicles (UAVs) combined with deep learning to score complex traits in large populations evaluated in the field. With this suite of secondary traits, we can develop improved multivariate prediction models to implement yield prediction and advanced selection methodology directly within breeding programs. To make more accurate yield predictions across environments we are focused on combining genomic prediction and physiological modeling. These component models are then being developed to crop growth models to assess physiological prediction when using genomic information along with high-throughput phenotyping.

SOMATIC EMBRYOGENESIS IN BRAZILIAN MYRTACEAE SPECIES EMBRIOGENESIS SOMÁTICA EN ESPECIES DE MIRTÁCEAS BRASILEÑAS

Quoirin M.¹ ; Oliveira, F. L. R. ¹; Degenhardt, J.²

Brazil is known for its important plant biodiversity. A way to exploit its natural resources is to domesticate and cultivate fruit trees such as species of *Plinia* (jaboticaba) (ex- *Myrciara*) and *Campomanesia*. Besides their use as fruit trees, they may be exploited for their medicinal properties. These genera have several species native to Brazil and endemic in the Southeastern and Southern regions. Due to the recalcitrant nature of its seeds and the lack of efficient methods of vegetative propagation, commercial jaboticaba orchards are difficult to establish. Somatic embryogenesis can be an alternative to obtaining, in a short time, large numbers of plants in good phytosanitary conditions. Hence, we studied the different stages of somatic embryogenesis of some species, mainly *Plinia peruviana* and *cauliflora*, as well as *Campomanesia xanthocarpa*. Here, we will present the results obtained for both *Plinia* species using mature seeds as starting material. The different steps of this process will be described: seed desinfestation *in vitro* establishment and different treatments applied to obtain embryogenic masses and somatic embryos.

¹Graduate Program in Agronomy - Plant Production, Federal University of Parana, Curitiba, Brazil. Contact: mquoirin@ufpr.br

² Embrapa Forestry, Colombo, Parana, Brazil

DESAFÍO EN INVERNÁCULO DE LECHUGAS TRANSGÉNICAS PORTADORAS DEL GEN QUITINASA CON *RHIZOCTONIA SOLANI*

Radonic L.M., Darqui F.S., Filippi C.V., Hopp H.E., López Bilbao M.

Las enfermedades foliares causadas por hongos adquieren gran importancia en lechuga (*Lactuca sativa*) al ser las hojas los órganos comestibles y las que le otorgan el valor comercial. Para evitarlas se aplican agroquímicos, que afectan la sostenibilidad ambiental, sanitaria y socioeconómica del cultivo. Con la finalidad de tener plantas resistentes a estos patógenos y reducir el uso de agroquímicos, se obtuvieron líneas transgénicas portadoras de quitinasa (*ch5B* de *Phaseolus vulgaris*), proteína relacionada con la patogénesis.

En ensayos previos se evaluó la inhibición del crecimiento del micelio del hongo *Rhizoctonia solani* en placas con medio conteniendo extracto de plantas y se observó un menor crecimiento del micelio con los extractos de las líneas transgénicas comparado con el extracto control. Posteriormente, se realizaron ensayos *in vitro* con plantas en un medio inoculado con *R. solani* o con *Sclerotinia sclerotiorum* y se observó que las líneas transgénicas I y II presentaron menor cantidad de hojas dañadas.

En este trabajo se muestra la respuesta de plantas en invernáculo desafiadas con *R. solani*. Se realizó la inoculación en la cara adaxial de 5 hojas al azar con un disco de 4 mm de diámetro de PDA cubierto de micelio joven del hongo en plantas de 30 días. A los 14/15 días se cortaron las hojas inoculadas, se obtuvieron imágenes con un scanner *HPPHotosmartD110* y se midió el área de daño utilizando el software *ImageJ*. El análisis estadístico mostró que las líneas transgénicas analizadas presentan un área menor de lesión, siendo esta diferencia significativa con la línea control no transformada.

Estos resultados de plantas adultas en invernáculo junto con los observados previamente *in vitro*, confirman que la expresión de esta proteína confiere tolerancia a patógenos fúngicos. Esta investigación continuará con el estudio en condiciones de producción a campo, iniciando la etapa regulatoria de estas líneas transgénicas.

EDICIÓN DE GENOMAS EN *MANIHOT ESCULENTA* CRANTZ PARA LA PRODUCCIÓN DE PLANTAS WAXY Y PARA LA RESISTENCIA A LA BACTERIOSIS VASCULAR PRODUCIDA POR *XANTHOMONAS AXONOPODIS* PV. *MANIHOTIS*

Sánchez F.J., Arciniegas J.P., Brand A., Vacca O., Tohme J., Becerra L.A., Chavarriaga P.

La yuca es un cultivo ampliamente usado en África, Asia y América Latina como fuente de alimento y material industrial dado que su raíz tiene un alto contenido de almidón. Por tal motivo, es de alto interés para aplicar técnicas de mejoramiento genético como la edición de genomas con diferentes fines. Uno de ellos es la producción de plantas con almidón waxy (0-5% de amilosa), debido a sus aplicaciones en la industria de alimentos, papel de impresora, adhesivos para concreto y textiles. Otro tema crucial es la resistencia a la bacteria fitopatógena *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Xam), causante de pérdidas en el cultivo entre 12-100%. Con el fin de abordar estos problemas, se propuso realizar edición de genomas mediante CRISPR/Cas9 en el gen *GBSSI*, responsable de la síntesis de amilosa; y en los genes Sweet (Sweet10a y Sweet10b), que son transportadores de azúcares activados por la bacteria para tener mayor disponibilidad de carbono. Para *GBSSI* se seleccionaron tres sgRNAs en el segundo, sexto y noveno exón para generar INDELS. Para los genes Sweet se seleccionaron dos sgRNAs dirigidos a la secuencia del EBE del gen Sweet10a y dos sgRNAs dirigidos hacia el primer y tercer exón del gen Sweet10b. Se introdujo el sistema CRISPR/Cas9 mediante transformación genética con *Agrobacterium tumefaciens* en la variedad TMS 60444. De la edición *GBSSI* se obtuvieron 163 plantas, con 129 eventos independientes, de los cuales 123 fueron putativamente waxy según test de yodo en plantas *in vitro*. Paralelo al enfoque de transformación genética se ha trabajado en la edición libre de ADN con protoplastos aislados de estructuras embriogénicas organizadas de yuca. En estos protoplastos se hizo una prueba de concepto mediante transfección de ribonucleoproteínas y se verificó la edición del gen *GBSSI* con un ensayo heterodúplex.

AVANCES EN LA EDICIÓN DE GENOMAS LIBRE DE ADN PARA VARIETADES COLOMBIANAS DE *THEOBROMA CACAO*

Sierra-Robles S.¹, Moreno-Ramirez J. L.¹, Chavarriaga-Aguirre P.¹, Tohme, J.¹

En Colombia, la producción de cacao está siendo comprometida por la alta concentración de cadmio en algunos de los suelos donde se cultiva. Por este motivo para establecer la continuidad de este cultivo a través del tiempo se deben desarrollar variedades con absorciones reducidas de cadmio. En este proyecto se pretende realizar la edición de genomas libre de DNA de al menos 2 variedades de *Theobroma cacao* mediante el uso de la metodología CRISPR-Cas9. Actualmente, se ha logrado embriogénesis somática de variedades colombianas, que, a pesar de tener una baja eficiencia, asegura el suministro de material de trabajo. Se han desarrollado protocolos de extracción de protoplastos con rendimientos altos (6×10^5 células/ml), llegando fácilmente hasta la fase de microcallo, actualmente se están desarrollando métodos de cultivo de microcallo y eventualmente de regeneración hasta embriones y plantas. A los protoplastos se les han realizado ensayos de transfección con eGFP y GUS con resultados positivos. Actualmente se han identificado los genes responsables en la absorción de cadmio en Arroz, identificado homólogos en cacao en la variedad de referencia y en al menos una variedad de interés, y con base en estos genes se diseñaron los sgRNA para hacer la edición. Actualmente se encuentra en proceso una prueba invitro de edición de genomas en cacao. Adicionalmente, se desarrolló un protocolo de hidroponía para mediciones de Cd en invernadero y basándose en este se hizo la medida de base para la absorción de cadmio una de las variedades seleccionadas.

NUEVAS ESTRATEGIAS PARA LA INTRODUCCIÓN DE RESISTENCIA A LA MARCHITEZ BACTERIANA EN PAPA Y ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN PLANTA – PATÓGENO

Siri M.I.

Las enfermedades causadas por patógenos bacterianos representan un factor limitante para la producción de cultivos y son responsables de considerables pérdidas anuales a escala mundial. Nuestro grupo trabaja desde hace varios años en el estudio de la marchitez bacteriana de la papa causada por la bacteria *Ralstonia solanacearum*. No existe control eficiente de esta enfermedad a nivel de campo, ni variedades comerciales de papa resistentes disponibles para la producción. La estrategia adoptada por el programa nacional de mejoramiento genético implica la introgresión de genes de resistencia a partir de la especie silvestre *Solanum commersonii*, ampliamente distribuida y adaptada a nuestra región. El esquema ha abarcado varias generaciones de selección por resistencia y retrocruzas sucesivas con germoplasma susceptible para restringir los caracteres desfavorables del germoplasma silvestre. Por otro lado, en los últimos años se complementó estos trabajos con estrategias de ingeniería genética, desarrollando líneas transgénicas que expresan de forma heteróloga un receptor de *Arabidopsis thaliana* involucrado en la percepción temprana de patógenos (At-EFR). Actualmente se cuenta con materiales avanzados con buenos niveles de resistencia sobre los que se profundizó en el estudio del proceso de infección y respuestas de defensa. Los resultados obtenidos sugieren que la resistencia a la marchitez bacteriana en papa está relacionada con la capacidad de la planta de restringir la colonización del patógeno, particularmente limitando su diseminación a nivel del tallo. También se observaron respuestas de defensa inducidas incluyendo la deposición de lignina, producción de especies reactivas del oxígeno y cambios a nivel de la expresión de genes de defensa. En las líneas At-EFR se verificó un aumento en los niveles de resistencia y un retardo en la aparición de los síntomas de marchitamiento respecto a las líneas sin transformar, verificando el potencial de este enfoque innovador para lograr una resistencia duradera frente a patógenos.

ALFALFA IMPROVEMENT THROUGH THE APPLICATION OF NBTS

Soto G.

Alfalfa is considered the forage base for meat and milk intensive systems worldwide. In Argentina, it is the most important forage at both the economic and the cropped area levels. Since the 1990s, the National Institute of Agricultural Technology (INTA), through the National Conventional Improvement Program of Alfalfa, has conducted several studies for the evaluation and improvement of alfalfa cultivars throughout the country to achieve representative environmental conditions and production systems. This Program has been successful in the development of alfalfa cultivars, highlighting the advances in characters such as latency and health. In particular, the main objective of our group is to develop high-productivity alfalfa cultivars through the combined application of conventional and unconventional biotechnological techniques to improve characters of interest in which natural genetic variability is not enough. In the short and medium term, our objectives are to understand the molecular basis of critical points of alfalfa growth and productivity and to develop tools for its improvement. We have standardized an efficient system to generate transgenic lines (e.g. BMC Plant Biol 2014 14:248; Plant Cell Rep 2016 35:1987-90; J Biotechnol. 2018 276:42-45) and to develop genetically modified cultivars (e.g. Theor Appl Genet. 2018 131:1111-1123), and we are currently working to standardize the CRISPR/Cas technology as a new breeding technique to enrich alfalfa improvement. As a whole, we intend to contribute to increasing both alfalfa productivity and quality and to provide a better use of territories and low quality waters with a special focus on sustainability.

GENE SILENCING AND EDITING: NEW FRONTIERS ON FUNCTIONAL GENOMICS

Jayme Nunes de Souza Filho, M.Sc.

During the last decades, genome sequencing projects allow us to get lots of annotation data so the next step is to understand gene functions. In order to help it, methodologies such as RNAi (RNA Interference) or even CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) have been reported as tremendous powerful.

As a gene knockdown approach, RNAi can be applied by 2 alternatives: a) Short hairpin RNA (shRNA) as a vector to be delivered to cell in order to translate a small transcript (dsRNA). It will be recognized by DICER to form RISC complex.

The activation of that complex will promote precisely single mRNA break-down after specific annealing. b) Small interfering RNA (siRNA) which are synthetic small double stranded RNA molecules (~ 21 mers) that are able to accelerate the formation of RISC complex so they take the same pathway. Interestingly, shRNA is considered to be stable transfection while siRNA are transient. Both of them are able to promote specific gene silencing effects.

As a gene knockout, CRISPR which is based on specific guide RNA (gRNA) «against» the gene of interest that, together with a Cas9 enzyme, is able to create a double break at the DNA driven by PAM sequence (NGG). Resultant random events will generate a lack of open reading frame with loss of gene function (truncated protein translation) will be discussed. In order to get it efficiently, several formats are being offered by Merck as tools to help you on your gene editing experiments. Those tools are considered to be CRISPR plasmid DNA, lentiviral particles or even synthetic guide RNA (sygRNA) that can be offered as powerful pre-designed formats. At the end, gene knock-in will be discussed as custom formats.

GWAS AND CORRELATION-BASED NETWORK ANALYSIS EMPLOYED ON A POTATO PANEL GROWN UNDER DIFFERENT ENVIRONMENTS IN SOUTH PERU

Toubiana D.¹, Cabrera Allpas R.¹, Lopez Smith J.M.¹, dos Santos G. F. ¹, Lindqvist-Kreuze H.², Castillo H.M.¹

Adverse changes in climate lead to extended periods of drought, degrading land and declining soil fertility, eventually decreasing food security and increasing its vulnerability. Although climate change has yet to reach its full-prognosticated impact, consequences can be seen already today. As such, potato suffers large yield gaps in developing countries compared to yields in Europe and North America (10 to 15 t/ha vs. 40 t/ha). To counteract the issue of abiotic stress of drought and ensure high yields, phenotyping of drought-resistant potato varieties is necessary. However, phenotyping for a complex trait like response to drought stress is challenging. A handy tool to overcome the deficiencies of phenotyping (e.g. silent phenotype) is the application of the field of metabolomics. To that aim, the Pontificia Universidad Católica del Perú initiated a collaboration with the International Potato Center, which has finalized an extended field experiment in the south of Peru, with different environments on a genome wide association potato panel composed of more than 300 different genotypes.

All potato samples were subjected to metabolic profiling using an NMR platform. Principal component analysis on the metabolic profiles highlighted a separation of control and drought samples. GWAS, statistical and network analyses highlighted the central roles of citric acid, sucrose, GABA, and glutamine. Difference networks revealed the differential role of glycine potentially acting as an osmoprotectant to modulate drought stress. Osmoprotectants are small organic molecules with neutral charge and low toxicity at high concentrations that act as osmolytes and help organisms survive extreme osmotic stress.

¹ Departamento de Ciencias – Química, Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima, Perú

² Genetics and Crop Improvement, International Potato Center, Lima, Perú

dtoubiana@pucp.edu.pe

CRISPR/CAS9: ACELERANDO EL MEJORAMIENTO DEL ARROZ

Valdés S.¹, Marín D.¹, Delgado G.¹, Lorieux M.¹, Alvarez M.¹, Tohme J.¹ y Chavarriaga P.¹

La edición genética es una herramienta poderosa y eficaz para la validación y modificación de genes. En la Plataforma de Mejoramiento Avanzado-CIAT nos hemos enfocado en el uso de CRISPR/Cas9 para validar genes de interés y para acelerar la obtención de variedades usando esta tecnología. Así, hemos obtenido líneas mutadas en el gen *AGO4* de la variedad resistente al Virus de la Hoja Blanca (VHB) Fedearroz 2000, lo que ha permitido validar *AGO4* como uno de los genes responsables de la resistencia a VHB. Las líneas editadas fueron inoculadas con el virus y mostraron una susceptibilidad e» al 50%, comparado con el control no editado. CRISPR/Cas9 también se ha usado para validar la función del factor de transcripción *TDF1* en la formación del tapetum. La inactivación de *TDF1* ha producido plantas con esterilidad de polen hasta del 100%. Igualmente se validó la función del gen *GBSS1* desactivándolo para aumentar la concentración de amilopectina en el grano (almidón Waxy). Plantas con esta característica podrían ser de interés para la industria de salsas y aderezos, así como para arroz tipo Sushi.

La inactivación del gen *GN1A*, regulador negativo de las citoquininas, produjo plantas de la variedad Llanura 11 (Japónica) con mayor número de panículas efectivas y mayor número de granos por panícula (aprox. 25% de incremento), características típicas de las variedades Indicas.

El CIAT en conjunto con otras instituciones ha trabajado en la obtención de líneas editadas resistentes a *Xanthomonas oryzae*, agente causal del añublo bacteriano, las cuales mostraron resistencia a diferentes cepas de *Xanthomonas*. Hoy dichas plantas se encuentran en los campos confinados de CIAT para evaluación agronómica e introgresión de la resistencia a variedades latinoamericanas. El uso de CRISPR/Cas9 se ve limitado por la capacidad de las variedades a ser transformadas y regeneradas in vitro. La estandarización de protocolos in vitro para diversos genotipos de arroz ha permitido transformar 28 variedades, líneas y especies de arroz, entre ellas *Oryza glaberrima*, lo cual abre las puertas para facilitar la introgresión de características deseables hacia el arroz cultivado (*O. sativa*) mediante la eliminación de genes de incompatibilidad entre las dos especies.

¹ Plataforma de Mejoramiento Avanzado. CIAT. A.A. 6713, Cali, Colombia

EXPERIENCIA ARGENTINA EN LA REGULACIÓN DE LA EDICIÓN DEL GENOMA: ESTADÍSTICAS PRELIMINARES

Whelan A.

Argentina fue uno de los primeros países de América Latina en implementar un sistema para evaluar la bioseguridad de los OGM para uso agrícola. Argentina también reconoció tempranamente el valor de los NBT para la investigación y desarrollo de cultivos. CONABIA decidió trabajar con las definiciones de OGM y de biotecnología contenidas en el Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB), e incluirlas en la Resolución 701/11 que regula las actividades con OGM para uso agrícola. CONABIA aplica diferentes criterios para determinar si un producto derivado de NBT debe considerarse OGM o no. La primera consideración es que los productos obtenidos a través de cualquier NBT deben ser sometidos a una consulta previa. El segundo es el alcance del cambio genético; Una combinación novedosa de material genético es la inserción en el genoma de genes o secuencias de ADN que forman parte de una construcción genética. A partir de estos criterios y después de dos años de debate, se adoptó la Resolución 173/15 que presenta un procedimiento para determinar si un producto obtenido utilizando NBT está cubierto o no por la Resolución 701/11.

Hasta ahora, solo se han presentado algunos casos, esto incluye cultivos anuales, así como plantas ornamentales y árboles frutales, algunos animales y microorganismos. La evaluación de los casos presentados nos permitió obtener estadísticas preliminares relacionadas con el impacto socioeconómico de los productos de edición de genes para uso en la agroindustria.

Con base en el análisis de las estadísticas preliminares, se puede concluir que al comparar la trayectoria reguladora de los productos GM versus los productos de edición de genes, se observó que la velocidad de innovación para los cultivos GM se mantiene estable, mientras que las nuevas técnicas de obtención están floreciendo. También ofrece una oportunidad para que las pequeñas empresas y las instituciones públicas lleguen al mercado con productos obtenidos a través de estas tecnologías en lugar de querer desarrollar un OGM con los altos costos económicos que requiere el Sistema Regulador.

Además, de acuerdo con el análisis de los casos presentados hasta ahora, se puede suponer que la edición de genes se utilizará comercialmente en una variedad más amplia de especies en comparación con los OGM. Esto permite la llegada de cultivos biotecnológicos a un universo más amplio de productores y cadenas agroindustriales.

RNAI IN INSECTS: FROM BENCH TO FIELD APPLICATIONS

Zotti M.

Scientists have made significant progress in understanding and unraveling several aspects of double-stranded RNA (dsRNA)-mediated gene silencing during the last two decades. Now that the RNA interference (RNAi) mechanism is well understood, it is time to consider how to apply the acquired knowledge to agriculture and crop protection. Some RNAi-based products are already available for farmers and more are expected to reach the market soon. Tailor-made dsRNA as an active ingredient for biopesticide formulations is considered a raw material that can be used for diverse purposes, from pest control and bee protection against viruses to pesticide resistance management. The RNAi mechanism works at the messenger RNA (mRNA) level, exploiting a sequence-dependent mode of action, which makes it unique in potency and selectivity compared with conventional agrochemicals. Furthermore, the use of RNAi in crop protection can be achieved by employing plant-incorporated protectants through plant transformation, but also by non-transformative strategies such as the use of formulations of sprayable RNAs as direct control agents, resistance factor repressors or developmental disruptors.

IDENTIFICACIÓN DE UN PANEL MÍNIMO DE MARCADORES MOLECULARES A PARTIR DE DATOS NGS APTO PARA EL DESARROLLO DE UN SERVICIO DE IDENTIFICACIÓN VARIETAL DE DURAZNERO

Aballay M.M.^{1*}, Valentini G.H.¹ y Sánchez G.^{1*}

La fruticultura en la Argentina enfrenta el desafío de modernizarse siendo uno de los puntos claves la certificación de la identidad varietal mediante el uso de marcadores moleculares (MM). Previamente en un proyecto de secuenciación de genoma reducido analizamos 191 accesiones de la colección de germoplasma de duraznero de la EEA San Pedro. El análisis bioinformático de las 50Gb obtenidas permitió identificar un total de 113.411 SNP, 13.461 InDel y 2.133 SSR. Sobre un set reducido de marcadores genotipados en cada una de las 191 accesiones formado por 6.028 SNP, 600 InDel y 191 SSR se calculó el contenido de la información polimórfica (PIC) mediante el programa PowerMarker. El PIC varió entre 0.005 y 0.375 para SNP, 0,005-0.533 InDel y 0.005-0.634 para SSR. A partir de estos datos se analizó el panel mínimo de MM discriminante teniendo en cuenta los siguientes criterios: 1) Alto valor de PIC, 2) Excluir MM ligados y 3) Excluir SSR mono nucleótidos por dificultar la asignación de genotipos mediante análisis en geles de poliacrilamida. Se identificó un set de 10 SSR distribuidos en 6 cromosomas capaces de discriminar las 191 accesiones de la colección de germoplasma. Considerando las frecuencias alélicas observadas, se podrá asignar la identidad varietal de una muestra incógnita analizando el set de 10 MM con niveles de certezas superiores al 99,98%. Estos resultados y el plan de negocio asociado sugieren que es factible establecer un servicio competitivo para la identificación/certificación varietal de duraznero.

*Lab. de Biotecnología

¹EEA San Pedro, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). 2930 San Pedro, Argentina

EL USO DE GENÓMICA BASADA EN «NEXT GENERATION SEQUENCING» PERMITIÓ LA IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS MARCADORES LIGADOS A CARACTERES DE INTERÉS PARA LA MEJORA DEL DURAZNERO MEDIANTE MAPEO POR ASOCIACIÓN

Aballay M.M.^{1*}, Valentini G.H.¹ y Sánchez G.^{1*}

El mejoramiento de duraznero se ve limitado por el periodo juvenil de la especie que requiere entre 4 a 5 años para evaluar el resultado de una cruce. Por tanto, la implementación de selección por marcadores moleculares (MM) resulta clave para volver más eficiente el proceso en términos de ahorro de recursos y tiempo. Previamente, desarrollamos una plataforma de genotipado por secuenciación, basada en ddRAD-seq que nos permitió estudiar la variabilidad y estructura poblacional la colección de germoplasma de duraznero. El objetivo de este trabajo fue identificar MM ligados a caracteres útiles para la mejora mediante un estudio de asociación (GWAS). Para llevar a cabo este trabajo se utilizó un set de 191 accesiones de duraznero genotipadas con 5.480 SNPs, 694 InDel y 512 SSR analizadas mediante ddRAD-seq y fenotipadas para los caracteres: color de pulpa, melting/no-melting, ausencia de vellosidad en la piel (nectarinas), fecha de floración y fecha de cosecha. El estudio de GWAS se realizó en el software TASSEL, bajo el modelo GLM- PCA (General Linear Model- Principal Analysis Components) que corrige los posibles efectos de estructura poblacional mediante datos de PCA. Como resultado se identificaron QTL para fecha de floración en Chr1 y Chr4, color de pulpa en Chr1, fecha de cosecha en Chr4 y para el carácter nectarina en Chr5; en concordancia con estudios previos, sin embargo los MM asociados no fueron descritos hasta la fecha. Estos resultados resaltan la ventaja de utilizar datos derivados de secuenciación para la identificación de nuevos MM. Este set de MM noveles resulta una herramienta útil para aplicar en el programa de mejora tanto en la elección de parentales como para la selección asistida por MM en las progenies. Estos resultados son el punto de partida para la implementar selección genómica al programa de mejora de la EEA San Pedro.

*Lab. de Biotecnología

¹EEA San Pedro, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). 2930 San Pedro, Argentina

DETECCIÓN PRELIMINAR DE MICROSATÉLITES EN MAÍZ ASOCIADOS CON LA RESISTENCIA A PALMARADO (ACHAPARRAMIENTO)

Aguilar V. N. N., Cespedes P. L. M., Avila A. M. T.

El achaparramiento del maíz, palmarado o «Corn stunt» es una enfermedad limitante en la producción de maíz de las zonas tropicales y subtropicales de América. Es producida por un complejo de patógenos: un virus y dos mollicutes (un espiroplasma y un fitoplasma). El vector principal de los tres patógenos y único conocido es *Dalbulus maidis*, la chicharrita del cogollo del maíz. En los últimos años esta enfermedad se ha hecho frecuente en Bolivia, en el Valle de Cochabamba principalmente, se conoce localmente con el nombre de palmarado. Una estrategia para su manejo, es desarrollar variedades de maíz con tolerancia o resistencia genética. Para este fin es necesario identificar genes relacionados a la resistencia a la enfermedad, inicialmente detectando marcadores moleculares asociados con la respuesta fenotípica de la planta. El presente estudio tiene por objeto la detección de microsatélites asociados con la resistencia a palmarado, en un cruzamiento (progenie F2), de 2 variedades de maíz, Chuspillo (Ch) susceptible y Perla precoz (Ppz) resistente, mediante 30 marcadores moleculares SSR asociados a la resistencia a los virus SCMV, MStV, MSV, MDMV y MMV; mediante análisis de grupo segregante (BSA). Tres de los marcadores bnlg 238, Phi126 y bnlg107 expresaron polimorfismo entre parentales y los grupos contrastantes. El análisis de correlación de Spearman, mostró que los cebadores BNLG107 y Phi162 presentan asociación entre éstos y los individuos de las cruzas Ppz5 x Ch15 (BOZM-0835) y Ppz21 x Ch14 (BOZM-0834) respectivamente. En base al resultado se sugiere utilizar los microsatélites en un análisis posterior con otras cruzas para lograr identificar la región cromosómica que confiere tolerancia a palmarado.

ANÁLISIS DE GENES CANDIDATOS ASOCIADOS AL CONTENIDO DE ARSÉNICO EN ARROZ URUGUAYO

Ale L.M.¹, Rosas J.E.², Verger M.³, Pérez de Vida F.²

Producir arroz con bajo arsénico en grano es fundamental para la inocuidad alimentaria y el acceso al mercado internacional. Se han reportado más de 15 genes asociados al transporte y/o absorción de arsénico en la planta de arroz. El objetivo de este trabajo es evaluar la segregación de estos genes en el germoplasma avanzado del Programa de Mejoramiento Genético de Arroz de INIA (PMGA) y su efecto en el contenido de arsénico inorgánico (iAs) en el grano. Se analizó la segregación de 15 genes candidatos para contenido de iAs en grano en 311 líneas tipo indica y en 310 tipo japónica tropical, genotipadas por secuenciación (GBS). Se encontraron polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en regiones internas de los genes LSI2, OsPT8 y OsABCC1 en indica, y OsHAC1.2, OsGrx_C2.1 y OsHAC4 en japónica tropical. Se seleccionaron 17 líneas indica y 15 japónica tropical combinando todos los haplotipos posibles para estos 3 genes. Se hizo un ensayo de campo en la Unidad Experimental de Paso de la Laguna (Treinta y Tres) en la zafra 2018/19 con dos repeticiones de cada línea seleccionada en un diseño de bloques completos aleatorizados. Se midió el contenido de iAs en grano pulido en el LATU por HPLC-ICP-MS. Se estudió el efecto en el contenido de iAs de los genes candidatos segregantes y de sus interacciones mediante análisis de varianza (ANOVA). Para la población indica los efectos principales de los genes LSI2 y OsPT8, así como la interacción OsABCC1:OsPT8 fueron significativos ($p < 0.01$). En la población japónica tropical fueron significativos los efectos del gen OsGrx_C2.1 y la interacción OsHAC1.2/OsGrx_C2.1/OsHAC4 ($p < 0.01$). Este trabajo sugiere la relevancia de algunos genes candidatos para el contenido de iAs en el germoplasma de INIA, cuyo efecto deberá ser confirmado en poblaciones más grandes.

¹Facultad de Ciencias UdelaR-Maestría en Biotecnología, Montevideo, Uruguay

²Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Programa Nac. Inv. Producción de Arroz. Estación Experimental INIA Treinta y Tres, Uruguay

³Laboratorio Tecnológico del Uruguay, Departamento Espectrometría Atómica de Alimentos y Medio Ambiente, Montevideo, Uruguay

lucasale.fc@gmail.com

DESARROLLO DE PLANTAS WAXY DE *MANIHOT ESCULENTA* CRANTZ MEDIANTE DE EDICIÓN LIBRE DE ADN

Arciniegas J.P.^{1,2}, Brand A.¹, Vacca O.¹, Tohme J.¹, Becerra L.A., Chavarriaga P.¹

La yuca es un cultivo ampliamente usado en África, Asia y América Latina como fuente de alimento y material industrial dado que su raíz tiene un alto contenido de almidón. El almidón normalmente tiene un 20-30% de amilosa y un 70-80% de amilopectina, pero existe un almidón con 0-5% de amilosa denominado ceroso (waxy), producto de una versión mutada del gen *GBSSI*, el cuál es responsable de la síntesis de amilosa. Esta modificación estructural hace que el almidón waxy tenga mayor viscosidad, temperatura de gelatinización, resistencia a la retrogradación y claridad que sus versiones silvestres. Gracias a estas propiedades, este almidón es usado para extender la vida útil de alimentos congelados y refrigerados dada su estabilidad al congelarse y descongelarse; también para producir papel de impresora, adhesivos para concreto y textiles. A pesar de que hay reportes previos de obtención de variedades waxy con el uso de ARN de interferencia, el uso de transgenes en yuca representa un problema porque la segregación de transgenes no puede darse sin la pérdida de los genotipos por la alta heterocigosidad de la especie; y por las barreras asociadas a la regulación y percepción social de transgénicos. Por tal motivo, se propuso desarrollar un sistema de edición libre de ADN. Para ello, se diseñaron 3 ARNs guía que fueron validados mediante transformación genética con *Agrobacterium tumefaciens*, con lo que se obtuvieron 15 líneas putativamente editadas según el ensayo heterodúplex, que además dieron coloración marrón con la prueba con lugol en plantas *in vitro*, indicando posible ausencia de amilosa. Actualmente, se está trabajando en el protocolo de regeneración de plantas a partir de protoplastos de yuca aislados de estructuras embriogénicas organizadas. En estos protoplastos se hizo una prueba de concepto mediante transfección de ribonucleoproteínas y se verificó la edición con un ensayo heterodúplex.

Palabras clave: Edición libre de ADN, *Manihot esculenta*, protoplastos, waxy.

¹Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Palmira, Colombia

²Universidad de los Llanos, Villavicencio, Colombia
juanarcivega@gmail.com

ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD MORFOLÓGICA, GENÉTICA Y FÍSICOQUÍMICA DE MAÍZ CRIOLLO (*ZEА MAYS L.*) EN COSTA RICA

Arrieta-Espinoza G.^{1*}, Carvajal S.¹, Valera O.², Argüello J.², Syedd, R.³, Pérez J.⁴, Garro G.⁴, Abdelnour-Esquivel A.⁴, Orozco R.², Fuchs-Castillo E.⁵

El maíz criollo (*Zea mays*) asociado a sistemas de agricultura tradicional fue objeto de esta investigación para conservar, caracterizar la diversidad morfológica, genética y nutricional del maíz de las regiones Chorotega y Brunca. Se recolectaron 59 accesiones que se georreferenciaron, tomaron datos pasaporte y nombre local para su conservación en bancos de germoplasma a 4 °C y crioconservación. Para la caracterización morfológica se midieron en la mazorca: longitud; diámetro; número de hileras; peso de 100 granos; disposición de las hileras y número de granos, longitud; ancho, grosor, color del grano. Un MANOVA demostró que la morfología del grano y la mazorca se relacionan significativamente con el «Color» del grano (Pillai's Trace=0.36323, $p < 0.001$). y la «Región» de recolecta (Pillai's Trace=0.1886, $p < 0.001$). La diversidad genética se analizó con 20 marcadores tipo microsatélites que indicaron una mayor diversidad del maíz criollo Chorotega con un mayor número de alelos de 16.25 (± 2.03) y un número efectivo de alelos de $A_e = 7.55 (\pm 0.98)$ y heterocigocidad. El maíz Blanco-Chorotega tuvo el mayor porcentaje de fibra cruda. El maíz Amarillo-Brunca y Morado-Chorotega mostraron los mayores niveles de nitrógeno. Las muestras con mayor concentración de polifenoles fueron las accesiones con grano de color morado de la zona Chorotega. Este estudio refleja el gran valor genético y valor nutricional del maíz criollo y la pertinencia de su conservación.

¹Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular, Escuela de Biología

² Escuela de Ciencias Agrarias, Escuela de Química

³ Universidad Nacional, Heredia Costa Rica

⁴ Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago

⁵ Universidad de Costa Rica, San José

MEJORAMIENTO DE PRECISIÓN PARA PROMOVER LA ACUMULACIÓN DE LICOPENO EN FRUTOS DE MANDARINA Y TOMATE

Arruabarrena A.^{1,2,3}, Lado J.^{2,3}, Stange C.R.⁴, González-Arcos M.³, Rivas C.F.², Vidal S.⁵

Los tomates y las mandarinas son frutos ampliamente consumidos en la dieta, lo que los convierte en una de las principales fuentes de antioxidantes como el licopeno o la vitamina C y otros carotenoides, respectivamente. Esto los convierte en buenos candidatos para potenciar su capacidad antioxidante. Una estrategia para lograr este objetivo es promover la acumulación de licopeno, ya que presenta una capacidad antioxidante superior a la de otros carotenoides. Adicionalmente, un mayor contenido de licopeno aportaría otros atributos deseables desde el punto de vista comercial a estos frutos, como un color rojo uniforme y más intenso en tomate y pulpa rojiza en mandarinas, lo que promovería su consumo y diferenciación comercial. En este trabajo se propone crear nuevos alelos no funcionales de la enzima Licopeno β ciclasa 2 (β LCY2) específica de frutos de tomate y mandarina en contextos genómicos de interés para los programas de mejoramiento genético de INIA. β LCY2 cataliza la degradación del licopeno, por lo que se espera estimular la acumulación de este compuesto en los genotipos que presenten los nuevos alelos no funcionales. Para llevar a cabo la mutagénesis dirigida al gen β LCY2, se optó por utilizar el sistema CRISPR/Cas9 con dos ARN guías para generar deleciones en la región codificante del gen. En cítricos existen varios alelos reportados para esta enzima con diferente grado de actividad. En consecuencia, se caracterizaron las secuencias genómicas de este gen para determinar que alelos están presentes en los genotipos de interés y se demostró su funcionalidad en sistemas de expresión heteróloga en bacterias carotenogénicas. El conocimiento de la vía de síntesis de carotenoides en contexto del mejoramiento genético de frutas y hortalizas combinado con la edición genómica y otras herramientas biotecnológicas es una estrategia innovadora para potenciar el valor nutricional de nuevos cultivares nacionales.

¹Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Unidad de Biotecnología. Estación Experimental INIA Salto Grande. Salto, Uruguay

²Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Programa Nac. Inv. Producción Citrícola. Estación Experimental INIA Salto Grande. Salto, Uruguay

³Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Programa Nac. Inv. Producción Hortícola. Estación Experimental INIA Salto Grande. Salto, Uruguay

⁴Universidad de Chile, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Centro de Biología Molecular Vegetal, Las Palmeras 3425, Santiago de Chile, Chile

⁵Universidad de la República, Facultad de Ciencias, Instituto de Química Biológica, Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, Iguá 4225, 11400, Montevideo, Uruguay

*arruabarrena@inia.org.uy

ATIVIDADE ANTIANGIOGÊNICA DE EXTRATOS DE *DUROIA MACROPHYLLA* HUBER (RUBIACEAE)

Bezerra Carvalho, A.*; Bücker, N. F.*; Nunez, C.V.*

A família Rubiaceae é reconhecida como uma das maiores famílias da floresta Amazônica e por produzir uma diversidade de metabólitos secundários (iridoides, triterpenos e alcaloides indólicos). Desta família, destaca-se a espécie *Duroia macrophylla* Huber, onde foram isolados triterpenos e alcaloides de suas folhas e galhos. Essas classes de metabólitos apresentam atividades importantes, como na redução de linhagens de células cancerígenas, e para testá-la pode-se utilizar um método alternativo ao uso de animais: atividade antiangiogênica em ovos de galinha. Este ensaio permite avaliar a inibição de formação de novos vasos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antiangiogênica de extratos brutos das folhas e galhos de *Duroia macrophylla*. O material vegetal foi extraído com diclorometano e depois com metanol, usando ultrassom por 20 min e cada extração feita 3 vezes. O ensaio biológico foi realizado utilizando o modelo de membrana corialantoica de embrião de ovo de galinha (*Gallus domesticus*) nas concentrações de 100, 500 e 1000 µg/mL com os extratos diclorometânico e metanólico de folhas e galhos de *D. macrophylla*, em triplicata, depositados em discos de metilcelulose. Os resultados foram obtidos 72 h depois, registrando imagens de cada ovo para contagem de vasos sanguíneos, obtendo-se o percentual de vasos inibidos pelo extrato. Nas doses de 1000 µg/mL, todos os extratos apresentaram inibição de formação de vasos sanguíneos na faixa de 80 a 95%, já os extratos diclorometânicos de folhas e galhos apresentaram potencial antiangiogênico nas doses de 100 µg/mL de 50% de inibição. Estes resultados incentivam a realização de ensaios com as substâncias isoladas dos extratos diclorometânicos, pois observa-se a importância de bioprospectar plantas amazônicas e avaliar suas atividades biológicas, como a inibição de formação de vasos que conseqüentemente impedem a nutrição de tumores, podendo ser novas matérias-primas para fármacos. Agradecimentos: CNPq e CAPES.

¿ES NECESARIO SUPLEMENTAR REGULADORES DE CRECIMIENTO AL MEDIO DE CULTIVO? RESPUESTA MORFOGÉNICAS *IN VITRO* DE PLANTAS LEÑOSAS DE AMBIENTES XEROFÍTICOS

Boeri P^{1;2}, Espíndola M.B^{1;2}, Dalzotto D^{1;2}; Cedrés Gazo M⁴, Piñuel L^{1;2} y Sharry S^{1;2;3}

La obtención de plantas completas *in vitro* está determinada por los medios de cultivo, reguladores de crecimiento (PGR) endógenos y exógenos, las condiciones de crecimiento y el genotipo. Como los requerimientos de las sales minerales y PGR difieren entre especies, resulta necesario evaluar variaciones de las formulaciones existentes. Las hormonas participan de procesos involucrados en la tolerancia al estrés. Aunque un balance auxina/citocinina (A/C) adecuado promueve la organogénesis *in vitro*, pocos trabajos abordan la importancia del balance endógeno hormonal. Dentro del proyecto «Bioeconomía regional: rescate, conservación y valorización de las especies nativas de la flora patagónica» se evaluó la respuesta *in vitro* de plantas de ambientes xerofíticos: *Geoffroea decorticans* (chañar), *Bougainvillea spinosa* (monte negro), *Prosopis caldenia* (caldén) y *alpataco*. Explantes juveniles fueron cultivados en 1/2MS sin PGR, con 30 g/l de sacarosa y 6 g/l agar. En todos los casos, se obtuvo respuesta morfogénica, sin la oxidación de tejidos. Explantes nodales de alpataco y caldén produjeron callos y brotes (10%, 83% y 88%, 44%, respectivamente). Se observó organogénesis directa de nudos cotiledonares de chañar (75%) (5+/-2 brotes/explante). Las secciones de epicotile de *Bougainvillea* produjeron callos y brotes. Estas respuestas sin PGR fue observada en otras especies. Nuestros resultados brindan evidencias sobre un balance hormonal endógeno favorable para la organogénesis. La formación de brotes adventicios sin PGR permite predecir que el contenido endógeno de citoquininas (en estas especies y tejidos involucrados) es mayor al de auxina. Esto concuerda con el modelo de Skoog-Miller: la diferenciación de yemas vegetativas es promovida por balances A/C favorables a las citoquininas, mientras que el predominio de auxinas induce la rizogénesis. Estos resultados presentan la posibilidad de multiplicar plantas en medios libres de PGR, disminuyendo los costos de manejo, especialmente para la micropropagación clonal, y eliminando los efectos negativos que puedan ser causados por el uso de PGR.

¹ Universidad Nacional de Río Negro, Sede Atlántica. CIT- Conicet-Río Negro

² Red Bioali-Cyted

³ Laboratorio de Investigaciones de la Madera (LIMAD), Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Buenos Aires, Argentina

⁴ Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de Río Negro, Subsecretaría de Recursos Forestales. Viedma, Río Negro, Argentina

ssharry@gmail.com

MÉTODO DE FENOTIPADO DE ALTO RENDIMIENTO PARA MEDIR LA RESISTENCIA CONTRA LAS MOSCAS BLANCAS (*ALEUROTRACHELUS SOCIALIS* BONDAR) MEDIANTE ANÁLISIS DE IMÁGENES

Bohorquez-Chaux A.*, Leiva L.F.*, Gomez-Jiménez M.I.*, Becerra López-Lavalle L.A.*

La mosca blanca, *Aleurotrachelus socialis*, es una de las principales plagas de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) en América del Sur. Este insecto causa pérdidas de rendimiento porque se alimenta de savia del floema y el crecimiento de moho en la melaza que excreta en las hojas. Se han identificado varias variedades locales resistentes a esta mosca blanca, pero el fenotipado consumió mucho tiempo y trabajo. Por lo tanto, implementamos un método de cribado eficiente que utiliza la infestación de plantas en macetas en una carpa de red en invernadero y desarrollamos una herramienta de fenotipado para cuantificar automáticamente el número de ninfas de tercer y cuarto instar, y el porcentaje de área foliar afectada como medida del nivel de resistencia de la planta. Esta herramienta ha sido desarrollada como un complemento ImageJ, un software para el procesamiento de imágenes. Probamos el método con once genotipos de yuca resistentes y susceptibles a *A. socialis*. Los datos obtenidos con el complemento mostraron una alta correlación con el método de conteo directo y el tiempo empleado en todo el proceso desde la infestación hasta la obtención de los datos se redujo drásticamente. Este método de fenotipado de alto rendimiento permite evaluar una gran cantidad de plantas en poco tiempo, evitando el sesgo del observador potencialmente asociado con el conteo directo, haciéndolo preciso, eficiente y rápido.

PROTOCOLO DE MICROPROPAGACIÓN DE ARÁNDANO NATIVO DE COSTA RICA (*VACCINIUM CONSANGUINIUM*)

Jiménez-Bonilla, V.¹, Abdelnour-Esquivel, A.¹

En Costa Rica existen seis especies silvestres de arándano (Ericaceae) y una ellas fue identificada como *Vaccinium consanguinium*. Se determinó el contenido de antioxidantes por ORAC, así como tamaño y color de frutos. La principal ventaja de estos materiales es estar bien adaptados a Costa Rica, lo que facilita la promoción de su cultivo e incentivar la diversificación de la actividad agrícola, principalmente en zonas vulnerables por la intensiva explotación hortícola. El objetivo de esta investigación fue desarrollar la micropropagación de esta especie para la obtención de material de siembra clonal. Para el establecimiento *in vitro* se utilizaron mini estacas tomadas directamente del campo, con 2 y 3 nudos. Se eliminaron las hojas y se lavaron con agua y jabón quirúrgico luego fueron incubadas en Agrimicin y Benomil. Los tratamientos de desinfección consistieron de la combinación de jabón enzimático (5ml.l⁻¹) e hipoclorito de sodio (3% i.a.) por varios periodos. Se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril. Las estacas fueron cultivadas en el medio WPM al 50% y se valuó el efecto de tres reguladores del crecimiento BA (0, 3, 5, 10, 15 y 20 mg.l⁻¹), Z (0, 0,1, 0.5 mg.l⁻¹), observándose que ambas fueron efectivas en concentraciones de 3 mg.l⁻¹ y 0,1 mg.l⁻¹ respectivamente, pero el mejor procedimiento para la brotación y multiplicación consistió en la exposición de las microestacas a un choque térmico a 5°C por 15 días, utilizando el mismo medio con 120 gl⁻¹ de sacarosa y 0,1 mg.l⁻¹ de Z. Posteriormente, los materiales fueron transferidos al medio WPM líquido suplementado con 30 gl⁻¹ de sacarosa y 0,1 mg.l⁻¹ de Z con puente de papel de filtro, lo que disminuyó la oxidación de los explantes y mejoró las condiciones nutricionales del cultivo reflejándose en mayor crecimiento y mejor apariencia de los brotes y el desarrollo de raíces.

¹ Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica

AN ECONOMIC VIEW ON INTEGRATING MARKER-ASSISTED SELECTION AND RAPID GENERATION ADVANCE INTO PUBLIC RICE-BREEDING PROGRAMS IN DEVELOPING COUNTRIES

Bonnecarrere V.*, Rosas J.E.*, Ferraro B.*

Plant breeding for the generation of cultivars adapted to local situations has been an important and strategic concern of developing countries with an agriculture-based economy. Considering the economic constraints, breeders must improve genetic gain to increase the delivery of better cultivars with lower costs, through the implementation of molecular breeding and rapid generation advance. The aim of this work was to assess the actual economic impact of the implementation of these technologies on genetic gain for yield, rice blast disease resistance and grain amylose content in a conventional rice breeding program. This analysis is intended as a case study of public breeding programs in developing countries. To accomplish this objective, cost analyses and genetic gain estimations were performed on four rice breeding scenarios: conventional and marker-assisted selection, with and without rapid generation advance. These estimations were used to develop a cost index reflecting the breeding efficiency. The most efficient method depends on the objective trait. For yield, there are small variations in genetic gain, but in terms of costs, the application of technology increases the breeding efficiency. For rice blast resistance, marker-assisted selection is not an efficient option when not using rapid generation advance. Conversely, the efficiency of MAS increases when using RGA. For grain amylose content, the greatest effect on genetic gain is obtained when using MAS. RGA always increases the breeding efficiency. The use of new technological tools is recommended in terms of the cost-benefit function.

NUEVAS ALTERNATIVAS FORRAJERAS PARA LA GANADERÍA DEL CARIBE SECO COLOMBIANO

Esteban Burbano Erazo; José Edwin Mojica; Guillermo Brochero

La oferta de recursos forrajeros en regiones con baja disponibilidad hídrica resulta un reto de gran interés para la ganadería del mundo (Bell, Moore y Thomas, 2018). Por lo anterior es fundamental valorar los recursos genéticos de gramíneas que contribuyan a mitigar los efectos del cambio climático sobre las fuentes de alimento para pastoreo.

Metodología: para conocer el comportamiento productivo de las pasturas se utilizó la metodología de la RIEPT y para la determinación del contenido nutricional un análisis por Espectroscopia de Infrarrojo Cercano (NIRs), en 11 accesiones de *Cenchrus ciliaris*, en el C.I. Motilonia-Agrosavia Colombia. Resultados: se encontró un comportamiento promisorio en la accesión CIAT 1098, con la mayor producción de 3281 kg/MS/ha, respecto al testigo Colosuana, *Botriochloa pertusa*, que tuvo una producción de 1242.8 kg/MS/ha; sin embargo el contenido de proteína fue mayor en el testigo con 8%, mientras que el resto de las accesiones presentó un rango entre 6.43 y 8.5 %; para el caso de FDA se encontraron valores entre 32 y 36 %; la FDN osciló entre 63 y 68 %, finalmente la digestibilidad estuvo entre 53 y 55 %.

Conclusión: La respuesta adaptativa por capacidad productiva y componente nutricional mostró que *Cenchrus ciliaris* podría convertirse en una posible oferta forrajera del Caribe seco colombiano; sin embargo se requieren más evaluaciones productivas y respuesta animal. Como alternativa biotecnológica vegetal, este tipo de evaluaciones resulta de gran importancia, ya que permite aprovechar los recursos genéticos disponibles para el país, mediante el uso de especies con capacidad de soportar condiciones de estrés abiótico y biótico.

IDENTIFICACIÓN DE REGIONES Y GENES RELACIONADOS CON LA APOMIXIS POR MEDIO DE LA SECUENCIACIÓN DE TRES GENOMAS DE *ERAGROSTIS CUVULA*

Carballo J.^{1,4}, Santos B.A.C.M.², Zappoacosta D.^{1,4}, Garbus I.¹, Selva J.P.¹, Albertini E.³, Caccamo M.⁵, Echenique V.^{1,4}

Apomixis es un modo de reproducción asexual por medio de semillas que produce individuos genéticamente idénticos a la planta madre. Esta característica ha sido definida como «el santo grial de la agricultura» debido a que su transferencia podría fijar el vigor híbrido por varias generaciones, manteniendo características deseables en los cultivos de mayor importancia económica.

Con el objetivo de identificar los genes y regiones que regulan la apomixis se secuenciaron tres genomas de *E. curuvula* un diploide sexual ($2n=2x=20$, ~600Mb) cv. Victoria y dos alotetraploides apomícticos ($2n=4x=40$ ~1200Mb), cvs Don Walter y Tanganyka-INTA. El genoma diploide fue secuenciado por las tecnologías PacBio, Chicago y Hi-C, mientras que Don Walter y Tanganyka-INTA POR Chromium 10X e Illumina, respectivamente. El cultivar Victoria fue originado por la reducción cromosómica de Tanganyka-INTA, resultando en un modelo único para el estudio de la apomixis diplospórica, donde el saco embrionario no reducido proviene de la célula madre de las megasporas.

Se identificaron 89.644 y 96.821 genes en los genomas de Tanganyka-INTA y Don Walter, respectivamente y 56.469 genes en Victoria. Como es de esperarse, los análisis de homología indican una mayor cercanía evolutiva entre Tanganyka-INTA y Victoria en relación a Don Walter. A fin de posicionar la/s regiones condicionantes de la apomixis, se mapearon *in silico* un grupo de marcadores ligados a este carácter. Un análisis de sintenia entre los tres materiales permitió comprobar que existen genes dentro de una región que se encuentran conservados mientras que algunos son exclusivos de los genomas tetraploides. En este grupo se encontraron transcritos diferencialmente expresados entre plantas sexuales y apomícticas que solo pudieron ser amplificados en individuos apomicticos indicando que estos genes estarían vinculados al modo reproductivo

Este nuevo hallazgo provee un avance significativo para entender la apomixis y los genes y regiones que la gobiernan.

¹. Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (CERZOS) y Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur, CCT CONICET Bahía Blanca, Argentina

². NIAB, Cambridge, Reino Unido

³. Department of Agricultural, Food and Environmental Science, University of Perugia, Perugia, Italy

⁴. Depto Agronomía, Universidad Nacional del Sur (UNS) Bahía Blanca, Argentina

jcarballo@cerzos-coicet.gob.ar

IDENTIFICACIÓN DE LAS TRANSLOCACIONES 1BL.1RS Y 7DL.7AG EN LÍNEAS SEGREGANTES DE GERMOPLASMA DE TRIGO (*TRITICUM AESTIVUM* L.) PARAGUAYO MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES

Cardozo Téllez, L.¹ y M. Kohli²

La translocación 1BL.1RS está asociada a ventajas sobre estabilidad ambiental y rendimiento en algunos fondos genéticos. Esta fue introducida al germoplasma paraguayo en los años '80. La translocación 7DL.7Ag se correlacionó en diferentes estudios con incrementos de rendimiento en condiciones ambientales adversas, y actualmente está siendo introducida al germoplasma nacional. La obtención de genotipos que contengan ambas translocaciones simultáneamente, potenciarían el número de caracteres de interés introducidos, y permitirían el estudio de su efecto en el fondo genético local. En el presente estudio se buscó identificar ambas translocaciones en 8 plantas F2 obtenidas de la cruce de las variedades Itapúa 75 con Prointa Gaucho. Para detectar la translocación 1BL.1RS se utilizaron los primers TSM0120F/R siguiendo el protocolo de Graybosch y colaboradores (2019). Se detectó el gen *Lr19*, introgresado al trigo mediante la translocación en el cromosoma 7D, utilizando los primers GbF/R siguiendo el protocolo de Prins y colaboradores (2001). Con el fin de verificar la calidad de ADN y ausencia de inhibidores se usaron los primers XGWM400, según el protocolo de Roder et al (1998). Todos los productos de amplificación fueron separados en geles de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio. De las 8 plantas F2 analizadas: todas presentaron la translocación 1BL.1RS, lo que constituye un resultado esperado, dado que ambos parentales (Itapúa 75 y Prointa Gaucho) portan dicha translocación. Además, 6 de estas plantas dieron positivo para el gen *Lr19*, presente en el cromosoma 7D, proveniente del parental Prointa Gaucho, indicando la presencia de la translocación 7DL.7Ag en estas líneas. Estas líneas, que contienen ambas translocaciones simultáneamente, serán utilizadas para posteriores estudios.

¹ Centro de Investigación Hernando Bertoni – Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria (IPTA)

² Cámara Paraguaya de Exportadores y Comercializadores de Cereales y Oleaginosas (CAPECO)

PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE GRANADA (*PUNICA GRANATUS L.*)

Castañeda-Nava J.J., Qui-Zapata J.A. Gómez-Entzin V., Gutiérrez-Mora A.

La granada es de gran importancia económica en México, por sus características alimenticias y otras como farmacéuticas y cosmetológicas debido al alto contenido de antocianinas. El objetivo de este trabajo fue la propagación *in vitro* por yemas axilares para su posterior uso en la experimentación con elicitores proteicos. Fue establecida *in vitro* a partir de semillas, mismas que fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 2 % por 10 min, seguido de tres enjuagues con agua estéril durante 5 minutos. Las semillas se sembraron en medio MS a la mitad de la concentración de las sales. La germinación inició a partir de los 60 d después de la desinfección. Las plántulas obtenidas se transfirieron a medio MS suplementado con 7.0 mg L⁻¹ de Bencilaminopurina (BAP) y 0.1 mg L⁻¹ de Ácido Giberélico (GA3). En este medio se obtuvo el material suficiente para realizar un experimento con diferentes concentraciones de BAP. Los resultados mostraron que la mejor concentración para la proliferación de yemas axilares fue de 1.5 mg L⁻¹ con una tasa de propagación de 3 plantas por yema. Para el enraizamiento se evaluaron dos factores: Ácido Indolbutírico (IBA) 1.0 y 1.5 mg L⁻¹ y sacarosa 3 y 4 %. En el análisis estadístico se observó que en las concentraciones de 1.0 y 1.5 mg L⁻¹ de IBA se presentaron los mejores promedios con una tasa de 1.5 y 2.3 raíces por explante, respectivamente. Por medio de estos resultados se observa que se puede realizar la proliferación de yemas axilares con menor cantidad de reguladores de crecimiento a lo reportado, reduciendo el costo de la propagación. Este trabajo está financiado por CONACYT en el proyecto FORDECYT 292399.

APLICACIÓN DE HERRAMIENTAS BIOTECNOLÓGICAS PARA GENERAR VARIABILIDAD EN ESPECIES FORESTALES DE INTERÉS ECONÓMICO

Castillo¹ A.M., López¹ V., Tavares² M.E., Santiñaque³ F. y M. Dalla Rizza¹

Eucalyptus dunnii Maiden produce pulpa de celulosa de buena calidad, crece muy bien en climas templados con inviernos fríos mostrando buena tolerancia a las heladas. Sin embargo, presenta una fase juvenil que se extiende por varios años; en las condiciones de Uruguay requiere más de 6 años hasta alcanzar la etapa reproductiva. Esto determina que los programas de mejoramiento genético insuman mucho tiempo para completar un ciclo de selección. Como estrategia se propuso utilizar la duplicación del genoma que representa una alternativa para obtener variabilidad genética. En este trabajo se evaluó la aplicación de inhibidores de la mitosis para inducir la duplicación cromosómica en explantes creciendo in vitro. Se aplicaron dos agentes antimitóticos: colchicina y oryzalin en diferentes concentraciones y tiempos de exposición en dos tipos de explantes: explantes creciendo in vitro y semilla pre-germinada. El número de cloroplastos en las células guarda de los estomas se usó como estimador rápido del nivel de ploidía en las plantas tratadas y luego éste se confirmó mediante citometría de flujo. Para el conteo de cloroplastos se usó como tinción el diacetato de fluoresceína (FDA) aplicado en hojas de explantes in vitro. El número promedio de cloroplastos fue de 5,5 en plantas control diploides y más de 7 en tetraploides; el recuento del número de cloroplastos en las células guarda de los estomas fue un método útil para seleccionar los poliploides putativos, con lo que disminuyó el número de plantas a evaluar por citometría de flujo. El oryzalin fue efectivo para inducir plantas duplicadas en *E. dunnii* a partir de explantes in vitro. En semillas pre-germinadas, ambos agentes antimitóticos indujeron poliploides. Las plantas poliploides obtenidas fueron clonadas, aclimatadas y trasplantadas con éxito en el invernáculo. Este es el primer reporte de poliploides artificiales obtenidos en *E. dunnii*.

¹Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Unidad de Biotecnología, Estación Experimental INIA Las Brujas. Canelones, Uruguay

² UPM, Paysandú, Uruguay

³ Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay

DPV COMO FACTOR ASOCIADO A LAS RESPUESTAS GENÉTICAS AL DÉFICIT HÍDRICO EN SOJA

Castro A.,* Casaretto E., Borsani O., y Vidal S.

En Uruguay, el cultivo de soja constituye en la actualidad el principal cultivo agrícola del país, con más del 85% del área de cultivos agrícolas de verano. El estrés generado por factores ambientales, provoca grandes pérdidas en los cultivos. Una de las posibles causas del estancamiento en la productividad en el cultivo de soja, es la ocurrencia de periodos de déficit hídrico, impuestos por las situaciones de cambio climático, que afectan en especial durante la etapa reproductiva (diciembre y enero) y compromete los rendimientos potenciales del cultivo.

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar las bases moleculares involucradas en la respuesta al déficit hídrico en soja. A partir de una población de 190 genotipos se evaluaron las respuestas bioquímico-fisiológicas al déficit hídrico en condiciones de alto Déficit de Presión de Vapor (DPV), identificándose genotipos con respuestas contrastantes. Con la finalidad de determinar si dichas respuestas estaban asociadas al DPV, se evaluaron dos genotipos con respuestas contrastantes en condiciones de alta y baja demanda (DPV). Para esto se realizaron estudios fisiológicos y análisis transcriptómicos en ambos genotipos. Los resultados fisiológicos mostraron que las características contrastantes de los genotipos podrían estar asociadas a una respuesta diferencial al DPV y al contenido hídrico del suelo. Los estudios de expresión génica indican que el genotipo menos sensible al déficit hídrico responde tempranamente a la sequía activando la expresión de genes que codifican para enzimas involucradas en el ajuste osmótico. En particular identificamos dos genes *GmADC1* y *GmADC2*, que codifican para una arginina descarboxilasa, enzima involucrada en la síntesis de poliaminas putrescina, espermidina y espermina. Los resultados obtenidos sugieren un rol de las poliaminas en la tolerancia a la sequía en el cultivo de soja.

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE 84 ACCESIONES DE TOMATE NATIVO Y SILVESTRE DE MÉXICO

Cervantes S.I.*, Rodríguez J.E., Godínez J.C., Sahagún J., Gaspar R.

Debido a que el tomate (*Solanum lycopersicum* L.) fue domesticado en México, la diversidad genética es abundante en prácticamente todo este país. Sin embargo, su conservación y uso sustentable exige inicialmente su caracterización. El objetivo de la presente investigación fue caracterizar 84 accesiones de tomate nativo y silvestre de México mediante descriptores morfológicos de la guía *International Plant Genetic Resources Institute* y con marcadores moleculares ISSR, con el fin de generar estrategias de conservación. Las accesiones se establecieron en invernadero bajo sistema hidropónico y sustrato de arena volcánica. Con 68 caracteres morfológicos se realizó un análisis de agrupamiento (distancias de Gower y método de Ward) que generó 7 grupos. Un análisis discriminante usando como referencia estos grupos, describió 86 % de la variación mediante dos variables canónicas. La clasificación de accesiones fue debida principalmente a los caracteres: forma, tamaño y color antes de madurez del fruto, presencia de capa de abscisión, tipo de racimo, disposición de hojas y forma del estilo. La caracterización mediante 9 iniciadores ISSR generó 59 productos amplificados, de los cuales 88% fueron polimórficos. Con estos se realizó un análisis de agrupamiento (distancias de Jaccard y método de Ward), el cual sugirió la conformación de 7 grupos. En la combinación de ambas clasificaciones (morfológica y molecular) no hubo asociación entre ellas, ni con los orígenes de las accesiones estudiadas. La conservación sustentable de esta variabilidad genética en bancos de germoplasma puede ser eficiente al considerar sólo al 34 % de las colectas estudiadas.

REMOCIÓN DE CONTAMINANTES EMERGENTES EN MEDIO ACUOSO UTILIZANDO LA ESPECIE VETIVER (*CHRYSOPOGON ZIZANIOIDES*)

Checa M. M.^{1*}, Sosa D.^{2.}, Ruiz O.H.^{1,3}, Barcos M.S.²

Los contaminantes emergentes (CE) como productos farmacéuticos, compuestos de alteración endocrina, productos de cuidado personal y sus productos de transformación a niveles traza en las aguas residuales tratadas son una preocupación de gran actualidad para la salud humana y el ecosistema acuático.

En este contexto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el porcentaje de remoción de cinco fármacos considerados como contaminantes emergentes (acetaminofén, sulfametaxazole, ibuprofeno, ciprofloxacina y diclofenaco) del vetiver (*Chrysopogon Zizanioides*) en medio acuoso en condiciones controladas. Todas las muestras colectadas fueron analizadas mediante espectrofotometría UV-Vis a fin de determinar el porcentaje de remoción de cada fármaco.

Se utilizó el diseño 2² con dos puntos internos: Concentración (3 y 12 mg/L) y Tiempo (48 y 192 horas); los puntos internos fueron: 9 mg/L a las 96h y 6 mg/L a las 144h. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante la técnica de superficies de respuesta para determinar tiempos y concentraciones que maximicen el porcentaje de remoción para cada fármaco. Se utilizó el software estadístico R versión 3.6.0 y R Studio versión 1.1.453.

Los resultados obtenidos mostraron una reducción de la concentración de la ciprofloxacina, ibuprofeno, sulfametaxazol, diclofenaco y acetaminofén en un porcentaje de 96%, 76%, 75%, 70% y 41% respectivamente. La metodología superficie de respuesta permitió observar que para obtener los tiempos y concentraciones óptimos, se deberá aumentar o reducir las concentraciones y el tiempo, de acuerdo con el comportamiento de cada fármaco. Asimismo, los porcentajes máximos de remoción se obtuvieron a bajas concentraciones.

En este estudio se ha demostrado la capacidad removedora de cada uno de los cinco fármacos estudiados de la especie Vetiver (*Chrysopogon Zizanioides*) en medio acuoso en condiciones controladas. En este sentido, esta especie vegetal tiene un gran potencial en el ámbito de la biotecnología ambiental para el tratamiento terciario de aguas residuales.

Palabras clave: Contaminantes emergentes, fármacos, aguas residuales, superficie de respuesta, Vetiver (*Chrysopogon Zizanioides*).

¹Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Campus Gustavo Galindo Km 30.5 Vía Perimetral, ESPOL, Apartado Postal: 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador

²Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, Campus Gustavo Galindo Km 30.5 Vía Perimetral, ESPOL, Apartado Postal: 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador

³Departamento de Estadística, Universidad de Salamanca, USal, Salamanca-España

*Autor para correspondencia: mcheca@espol.edu.ec.

DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA DE REPLAZO ALÉLICO OPTIMIZADA PARA SOJA UTILIZANDO UN MODELO DE RESISTENCIA A HERBICIDA

Coronel M.P., Fleitas A.L., Vidal S

Dentro de las tecnologías utilizadas para realizar edición genómica el sistema CRISPR/Cas9 es la más utilizada y robusta. Recientemente, se han comenzado a utilizar metodologías «libres de ADN», las cuales garantizan la no incorporación de ADN foráneo y reducen los efectos off-target sobre el resto del genoma.

Este trabajo busca desarrollar una metodología de reemplazo alélico optimizada para soja utilizando el sistema CRISPR/Cas9 como herramienta. Se propone modificar un gen de la 5-enolpiruvatolshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) de soja con el propósito de conferir resistencia al herbicida glifosato. Esta estrategia simplifica la detección de las plantas editadas ya que confiere un marcador fenotípico fácil de detectar. Para ello, se pretende incorporar mutación puntual Pro106-Ser en conjunto con la mutación Thr102-Ile (TIPS) o Thr102-Ala (TIPA). Estas mutaciones se han identificado como causantes de la insensibilidad al glifosato en múltiples organismos.

Aquí se presentan avances en pos de dos objetivos: por un lado evaluar si la incorporación de estas mutaciones confiere de hecho resistencia al herbicida *in vivo*; por otro lado generar herramientas para modificar el genoma de soja sobre el locus de la EPSPS.

Para abordar el primer objetivo, la secuencia codificante para una EPSPS de soja fue modificada generando las variantes TIPS y TIPA. Las variantes mutantes fueron utilizadas para transformar *Arabidopsis thaliana* donde se evaluará si las plantas transgénicas son resistentes al herbicida.

En cuanto al segundo objetivo, se diseñaron RNAs guía (SgRNAs) y se sintetizaron mediante transcripción *in vitro* (IVT). Su eficiencia de corte sobre la secuencia genómica de la EPSPS fue evaluada mediante ensayos de corte *in vitro*.

Las mutaciones TIPS y TIPA también fueron incorporadas sobre el fragmento genómico que será incorporado en un vector de reemplazo. Este vector de reemplazo será utilizado junto con los complejos Cas9-SgRNA para realizar el reemplazo alélico en soja.

PHYLOGENETIC ANALYSES AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THE CYCLING DOF TRANSCRIPTION FACTORS FROM TOMATO SPECIES AND ANALYSIS OF THEIR ROLE IN ABIOTIC STRESS RESPONSES

Corrales A.R.^{1,2}, Carrillo L.², J. Dominiguez-Figueroa, B. Renau-Morata³, Gonzalez M., Granell M.A.⁶, Pollmann S.², Nebauer S.G.³, Vicente-Carbajosa J.², Molina R. V.³, Medina J²

Tomato is one of the horticultural crops of major economic importance in Spain. However, its production is being affected by adverse environmental conditions such as salinity, drought, and extreme temperatures. Recent studies have shown that the use of regulatory genes such as transcription factors (TFs) represents a powerful tool to obtain new tomato varieties with greater tolerance to abiotic stresses. The DOF (DNA binding with One Finger) proteins form a family of plant-specific TFs that are involved in the regulation of particular plant processes but their precise roles in abiotic stress tolerance are almost unknown.

Using the complete set of DOF genes from *Solanun lycopersicum*, we have searched for DOF genes in different tomato species. Sequence and phylogenetic analyses allowed us to classify them into four groups A-D, similar to the situation in *Arabidopsis*. In group D, we have identified DOF genes that show similar characteristics to the *Cycling Dof Factors (CDFs)* of *Arabidopsis*. These genes were considered orthologous to the *Arabidopsis CDF1 - 5* named *Solanum lycopersicum CDFs* or *SICDFs*.

The expression analysis of the *Solanun lycopersicum CDF1-5* genes showed distinct diurnal expression patterns. Also, the *SICDF1-5* genes were differentially induced in response to osmotic, salt and low and high-temperature stresses. Overall, our data provided new ideas of the evolution of DOF gene family in tomato and their roles during plant development and in response to different abiotic stress conditions.

¹ Universidad Santiago de Cali (USC), Calle 5 # 62-00 Campus Pampalinda, Santiago de Cali, Colombia

² Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (UPM-INIA), Campus Montegancedo, Autopista M40 (km 38), 28223 Madrid, Spain

³ Departamento de Producción Vegetal, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain

⁶ Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), Ingeniero Fausto Elio s/n, 46022 Valencia, Spain

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE *VISMIA CAULIFLORA*

Costa W. R. S., Espinar M. T. F., Pedroza L. S., Osório M. I. C., Nunez C. V.

A família Hypericaceae caracteriza-se pela produção de metabólitos com grande potencial farmacológico. No Brasil, esta família apresenta dois gêneros, sendo um deles o gênero *Vismia* com 30 espécies de maior diversidade na floresta amazônica, sendo estas produtoras de flavonoides, terpenóides e antraquinonas. Dentre estas espécies têm-se a *Vismia cauliflora* A. C. Sm., uma planta pouco explorada da região amazônica, utilizada normalmente para o tratamento de dermatoses e inflamações na pele, podendo ser uma fonte interessante de compostos bioativos, uma vez que estudos químico e biológico com espécies deste gênero já foram realizados. Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antioxidante dos extratos hexânicos e metanólicos das folhas de *V. cauliflora* A. C. Sm. Para isso, realizou-se uma coleta das folhas de *V. cauliflora*. O material vegetal foi seco, moído e extraído com hexano e metanol, utilizando ultrassom por 20 min, 3 vezes com cada solvente e seco utilizando Rotaevaporador. Os extratos obtidos foram avaliados pelo ensaio antioxidante por meio dos métodos de DPPH e Fe+3/fenantrolina, utilizando a equivalência com o ácido ascórbico para se analisar os resultados obtidos. Os extratos hexânicos não se mostraram ativos perante o teste, contudo, os extratos metanólicos apresentaram valores de 1,35 e 1,52 respectivamente para a equivalência com ácido ascórbico, sendo classificados como ativos. Até o momento a *V. cauliflora* foi encontrada apenas no estado do Amazonas, sendo este trabalho o primeiro relato de estudo para as folhas de *V. cauliflora*, uma vez que os trabalhos existentes foram realizados apenas com as flores e as cascas do caule desta espécie.

Palavras chave: metabólitos secundários, *Vismia cauliflora*, atividade antioxidante.

Agradecimentos: As agências brasileiras de fomento Fapeam e CAPES pelos auxílios concedidos.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIANGIOGÊNICA DE EXTRATOS *WARSEWICZIA COCCINEA* (VAHL) KLOTZSCH (RUBIACEAE)

Crispim, G. S. ^{a*}; BÜCKER, N. C. F.^{a*}; NUNEZ, C.V.a

Introdução: A investigação de moléculas bioativas é essencial para o aprimoramento no arsenal de medicamentos antineoplásicos. Sendo que metabólitos secundários demonstram ser uma notável fonte na busca de novos fármacos por apresentarem capacidade de desencadear atividades biológicas. A inibição ou formação de novos vasos sanguíneos é a denominação dada ao processo da angiogênese, sendo muito relacionada na inibição do suprimento das células neoplásicas. Bioensaios que visam avaliar a atividade angiogênica são essenciais para o reconhecimento dessa atividade biológica em metabólitos secundários que ocorrem em plantas.

Objetivo: Avaliar a atividade antiangiogênica de extratos de *Warszewiczia coccinea* (Vahl) Klotzsch.

Metodologia: Utilizou-se o modelo de membrana corioalantóica de embrião de ovo de galinha (*Gallus domesticus*) avaliando os extratos hexânicos e metanólicos das folhas e extrato hexânico dos galhos de *W. coccinea* nas concentrações de 100, 500 e 1000 µg/mL em triplicata, impregnados em discos de metilcelulose. Os resultados foram obtidos 72 h depois, registrando imagens de cada ovo para contagem de vasos sanguíneos binterceptados pelo disco, obtendo-se o percentual de vasos inibidos.

Resultados: O extrato hexânico dos galhos apresentou atividade inibitória de 80%, 70% e 40% nas concentrações 1000, 500 e 100 µg/mL, respectivamente quando comparados ao controle negativo. Destacando que os extratos hexânicos e metanólicos das folhas apresentaram toxicidade em todas as concentrações, inclusive em 100 µg/mL, representando provável presença de metabólitos bioativos.

Conclusão: A busca por moléculas com potencial de inibir a formação de vasos é primordial para a descoberta de novos medicamentos antitumorais. Os presentes resultados de inibição dos vasos dão suporte para a busca dos metabólitos presente nos extratos que possivelmente estejam relacionados a atividade antiangiogênese, seguindo futuro fracionamento e elucidação estrutural.

Palavras-chave: bioprospecção, produtos naturais, metabólitos secundários, angiogênese.

^aInstituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia, Manaus, Brasil

*gabrielsantana852@gmail.com

AGREGADO DE VALOR A LA SOJA MEDIANTE EL DESARROLLO DE VARIEDADES NACIONALES, NO TRANSGÉNICAS, PARA CONSUMO HUMANO

Da Silva D.A., Bonnacarrère, V, Vidal S.

Actualmente Uruguay no dispone de variedades de soja adaptadas a las condiciones del país con la calidad requerida por el mercado de alimentación humana. Este proyecto busca desarrollar líneas de soja no transgénicas con mejoras en caracteres de calidad, que son importantes para el consumo humano. En particular, nos planteamos utilizar la tecnología CRISPR/Cas para generar genotipos de soja editados, con mayor contenido de sacarosa respecto al contenido de estaquiosa y rafinosa. Para ello, se generarán construcciones génicas diseñadas para generar mutaciones de tipo knock-out en el gen STS (estaquiosa sintasa). Las construcciones génicas a utilizar para el sistema de CRISPR-Cas9 se generarán utilizando secuencias de ARN guía diseñadas para el reconocimiento específico del gen STS, y evaluadas in vitro en asociación con Cas9 para determinar la eficiencia en el reconocimiento del locus STS. Las secuencias codificantes de los ARNg seleccionados, se clonarán en un vector de transformación de soja, conteniendo el gen Cas9 optimizado para esta especie. Con estas construcciones se transformará el genotipo Jack de soja mediante biolística, y los eventos resultantes serán genotipados para la presencia de mutaciones nulas en el gen SBA y en posibles regiones no blanco. Se espera contar con datos fenotípicos sobre el impacto de esta mutación en el perfil nutricional de los genotipos generados. A su vez, se espera conocer el impacto de la mutación sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas. Para ello, en paralelo se estudiará el perfil de expresión génica del gen STS a lo largo del desarrollo de la planta.

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE PPEIF5A : UN GEN INDUCIDO POR ESTRÉS TÉRMICO EN *PHYSCOMITRELLA PATENS*

Deluca C.,*, Vidal S., y Castro A.

A lo largo de la evolución, las plantas han desarrollado variados mecanismos moleculares que les permiten la adaptación frente a diversas condiciones de estrés. El control de las etapas que componen la síntesis de proteínas, es esencial en la supervivencia de plantas. Este trabajo presenta la caracterización del gen *PpelF5A* inducido fuertemente en condiciones de estrés térmico en el musgo *Physcomitrella patens*. Dicho gen codifica para una proteína con homología al factor de iniciación de la traducción eIF5A de eucariotas, la cual hasta el momento es la única proteína reportada con el aminoácido hipusina. La hipusinación es un requisito crítico para la actividad del eIF5A. eIF5A participa en la traducción de ARNm específicos, que codifican para proteínas ricas en prolina (Pro-Pro-Pro). La mayoría de los estudios se centran en humanos y levaduras, por lo cual la función biológica de este gen en plantas continúa siendo en gran medida desconocida. Los análisis de expresión por medio de RT-qPCR revelaron que el gen *PpelF5A* se induce por altas temperaturas, deshidratación y ácido salicílico y es reprimido por DTT. Con el objetivo de comprender el rol fisiológico de *PpelF5A*, se realizó una construcción génica para determinar la localización subcelular mediante ensayos de expresión transitoria en plantas. Los resultados indican que *PpelF5A* tiene una localización nuclear-citoplasmática. Por otro lado, se generó un vector de reemplazo alélico para obtener un mutante *knock-out* de este gen, así como dos construcciones génicas para la expresión constitutiva del gen *PpelF5A* en *Physcomitrella patens* y *Arabidopsis thaliana*. Actualmente estamos en la etapa de genotipado y fenotipado de las líneas generadas. Finalmente, mediante estudios *in silico* se identificaron genes candidatos a ser regulados por este factor. Identificar sus proteínas blanco puede aportar al desarrollo de herramientas biotecnológicas de mejoramiento genético enfocadas en la tolerancia a estrés en plantas.

PROYECTO: RESISTENCIA A GLIFOSATO EN RAIGRÁS ANUAL EN URUGUAY – ENTENDER, REDUCIR Y PREVENIR

Do Canto J.^{1*}, Kavanová M.¹, García M.A.¹, de Avila L.A.², Fresia P.³, Tuesca D.H.⁴, Condón F.¹, Gaines T⁵

La aparición de poblaciones de raigrás anual (*Lolium multiflorum* Lam.) resistentes a glifosato es una amenaza a los sistemas de producción agrícola-ganaderos del Uruguay al reducir las opciones de control químico disponibles. Actualmente se desconoce si las poblaciones resistentes fueron importadas con semilla comercial, se originaron localmente, o convergieron ambas causas. Este Proyecto tiene como objetivos determinar el origen de las poblaciones locales resistentes, y analizar el grado de similitud genética entre ellas. Se analizarán más de 75 poblaciones de raigrás anual incluyendo los principales cultivares sembrados en la Región, líneas experimentales del Programa de Mejoramiento de INIA, poblaciones naturalizadas de Uruguay; y poblaciones de raigrás anual resistentes a glifosato colectadas en Uruguay, Brasil y Argentina. Se utilizará la plataforma de secuenciación masiva DArTseq para detectar polimorfismos genéticos entre las distintas poblaciones. Los análisis de ADN se basarán en pools constituidos por 25-30 plantas individuales por población para captar la diversidad intrapoblacional. La estructura genética poblacional se estudiará mediante análisis multivariados y clasificación filogenética, y los resultados del análisis de clustering se compararán con la información sobre su distribución geográfica. El grado de similitud de las poblaciones resistentes con los cultivares sembrados o poblaciones naturalizadas de Uruguay, responderá a la interrogante del origen de la resistencia. La ejecución de este Proyecto será financiada con fondos de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (código FMV_3_2018_1_148682). Como resultado de la aplicación de una herramienta biotecnológica se podrá diagnosticar cuán adecuadas han sido las prácticas de manejo de raigrás anual en Uruguay, y orientar acciones y políticas específicas para mitigar la problemática de desarrollo de resistencia a herbicidas.

¹ Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Colonia, Uruguay

² Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS – Brasil

³ Institut Pasteur de Montevideo. Montevideo, Uruguay

⁴ Universidad Nacional de Rosario. Zavalla, SF, Argentina

⁵ Colorado State University. Fort Collins, CO, EEUU

*email: jdocanto@inia.org.uy

MARCADORES MOLECULARES ISSR PARA EL ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE TOMATE (*SOLANUM SPP.*)

Echeverry J.E¹., Morillo C.Y^{1*}., Ceballos A. N¹

Los marcadores de ADN son herramientas poderosas en la caracterización y evaluación de la diversidad genética dentro y entre poblaciones genéticas (Russel *et al.*, 1997). Se evaluó la diversidad genética de 55 genotipos de tomate (*Solanum spp.*) utilizando marcadores ISSR. El ADN total fue extraído a partir de hojas jóvenes, con el protocolo de Dellaporta *et al.* (1983) y se evaluaron siete marcadores ISSR. La similitud genética entre los individuos se calculó utilizando el coeficiente de similitud de Nei y Li. El análisis cluster se realizó utilizando el paquete estadístico NTSYS. Se estimó la heterocigosidad incesgada y el porcentaje de loci polimórficos utilizando el paquete estadístico TFGA. La estructura poblacional se obtuvo mediante el programa Structure v2.3.1. Los siete cebadores originaron un total de 63 bandas, de las cuales el 90.48% resultaron ser polimórficas. El promedio de heterocigosidad esperada (He) fue de 0.37, lo cual revela un alto valor de diversidad genética. El análisis de agrupamiento genético promedio UPGMA basado en el coeficiente de similaridad de Nei-Li agrupó los genotipos en cinco grupos a un nivel de similitud del 72%. La técnica ISSR no discriminó los genotipos de tomate según la especie o la región de procedencia. El análisis STRUCTURE y el dendrograma no revelaron una estructura genética en la población evaluada, lo cual se evidencia por la distribución de genotipos de diferentes especies a lo largo de los grupos formados. Los marcadores ISSR fueron efectivos para estudiar la diversidad genética y también establecer la relación de los genotipos de tomate provenientes de diferentes zonas geográficas.

RESULTADOS PRELIMINARES PARA LA PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE *BOUGAINVILLEA SPINOSA*, UNA ESPECIE CON POTENCIAL VALOR COMO FUENTE DE COMPUESTOS ACTIVOS

Espíndola M^{1,2}., Boeri P^{1,2}., Dalzotto D^{1,2}., Piñuel L^{1,2} y Sharry S^{1,2,3}

Bougainvillea spinosa es un arbusto caducifolio de valor principalmente ornamental. En otras *Bougainvilleas*, se ha demostrado la presencia de principios activos relacionados a efectos antidiarreicos, antiulcerosos y antimicrobianos, sin embargo *B spinosa* no ha sido aún estudiada. Las *Bougainvilleas* son de difícil propagación: muchas veces no producen semillas y su multiplicación por esquejes no suele dar buenos resultados. Así, ante el valor potencial de esta especie y la baja tasa de reproducción, la micropropagación se convierte en una estrategia para su futuro uso sustentable y conservación. En este trabajo, se evaluó la respuesta morfogénica de esta especie en condiciones *in vitro*. Para ello, segmentos nodales fueron cultivados en Murashige-Skoog diluido a la mitad de concentración (testigo) y suplementado con 3,0 mg/l de BAP y 0,01 mg/l de AG3 (tratamiento). Los explantes se obtuvieron de plántulas *in vitro*, de 4 meses de edad. Para ello, la desinfección de las semillas fue ajustada de la siguiente manera: una inmersión en H₂O₂ (30%) (4') y luego en etanol 70% (5'). Seguidamente, las semillas se sumergieron en OCINa 20% (46 gCl/l) (10') y se enjuagaron con agua destilada estéril. A los 50 días se observó la generación de callos (100% para el tratamiento; 70% para el testigo) y múltiples brotes (100% para el tratamiento; 40% para el testigo). El valor promedio de brotes obtenidos/explante fue de 6,3 ± 2,3 para el tratamiento y 2 ± 0,8 para el testigo. Estas respuestas están directamente relacionadas a la presencia de los reguladores de crecimiento en el medio del cultivo. Este es el primer reporte de propagación *in vitro* de *B. spinosa* y el primer paso tanto para masificar su producción ante las dificultades reproductivas que presenta, como para la búsqueda de metabolitos secundarios en condiciones *in vitro*.

¹Universidad Nacional de Río Negro, Sede Atlántica. CIT-CONICET-Río Negro

²Bioali-Cyted

³Laboratorio de Investigaciones de la Madera (LIMAD), Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata. Calle 60 y 117, La Plata, Buenos Aires, Argentina

ssharry@gmail.com

AISLAMIENTO DE TRIPTAMINA Y ACTIVIDAD ANTIANGIOGÉNICA DE *WARSEWICZIA SCHWACKEI* (RUBIACEAE)

Fachin-Espinar M. T., Bücken N. C. F., Nunez C. V.

Las especies de la familia Rubiaceae, son reconocidas principalmente por ser productoras de una gran variedad de metabolitos secundarios de importancia farmacológica, destacándose los alcaloides. En ese sentido, el presente trabajo tiene por objetivo realizar la caracterización química y evaluar el potencial anti angiogénico de los extractos y sustancias obtenidas de la especie *Warszewiczia schwackei*. Los extractos fueron preparados utilizando hojas y ramas que habían sido colectadas en la Reserva Forestal A. Ducke/INPA, Manaus-Brasil. El material vegetal fue separado, seco, molido y extraído con hexano y metanol. El extracto metanólico fue sucesivamente fraccionado por cromatografía, hasta la obtención de las sustancias, las cuales fueron caracterizadas utilizando Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y espectrometría de masas (EM). La evaluación de la actividad antiangiogénica de los extractos y sustancia, fue realizada mediante el método de la membrana corioalantoica (CAM), con huevos fertilizados de gallina (*Gallus domesticus*). El fraccionamiento de los extractos metanólicos de las hojas permitió el aislamiento del alcaloide triptamina el cual fue caracterizado mediante análisis de los espectros de RMN y EM. Este alcaloide es considerado un importante precursor en la ruta biosintética de los alcaloides indólicos. Por otro lado los resultados de la actividad antiangiogénica mostraron que los extractos metanólicos y hexánicos de las ramas en la concentración de 100 mg/mL fueron los más activos presentando una reducción de la formación de vasos de 80 y 70% respectivamente ya los extractos metanólicos de las hojas también en la concentración de 100 mg/mL redujeron la formación de vasos en 60% y los hexánicos en 40%. La sustancia triptamina presentó potencial antiangiogénico, reduciendo la formación de vasos en 60% en la concentración de 1 mg/mL. Todos los resultados obtenidos demuestran el elevado potencial biológico y biotecnológico de la especie *Warszewiczia schwackei* principalmente como productor de sustancias antiangiogénicas.

Agradecimientos: CNPq y CAPES.

COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES LIBERADOS DESDE CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUCTURADOS PARA INDUCIR EL CRECIMIENTO EN *SOLANUM LYCOPERSICUM*

Fincheira P^{1,3}., Quiroz A^{2,3}., Hermosilla E^{1,3}., Tortella G^{1,3}., Rubilar O. ^{1,3}

Estimulantes del crecimiento vegetal basados en nanopartículas (NPs) se han propuesto como alternativa sustentable. Acarreadores lipídicos nanoestructurados (ALN) caracterizados por su naturaleza orgánica, biocompatibilidad y biodegradabilidad constituyen un «carrier» para encapsulación de compuestos. Adicionalmente, compuestos orgánicos volátiles (COVs) caracterizados por su naturaleza carbonada, lipofílica y biodegradable poseen eficiente acción para inducir el crecimiento vegetal. El objetivo del presente trabajo es determinar el efecto de 2-nonanona y 2-tridecanona liberada desde ALN para inducir el crecimiento de *Solanum lycopersicum*. Para ello se formularon ALN con lípidos de triestereato de glicerilo y miristato de isopropilo, con tween 80 (surfactante), donde se encapsularon 250 ppm de 2-nonanona o 2-tridecanona. NPs fueron caracterizadas a través de microscopía electrónica de barrido y dispersión dinámica de luz durante 3 semanas. Bioensayo de crecimiento se realizó en placa Petri bicompartimentada conteniendo medio Murashige y Skoog (pH 5.7). En la superficie de un compartimento se colocaron 4 plántulas de *S. lycopersicum* y en el segundo 10 iL de ALN conteniendo 2-nonanona o 2-tridecanona. Se determinó el crecimiento foliar y el desarrollo radicular. Al encapsular COVs en ALN, el tamaño en promedio fue 268 nm, índice de Polidispersidad (IPD) de 0,25 y potencial zeta de -26.87 mV. Incrementaron los al día 9 que 2-nonanona y 2-tridecanona liberada desde ALN tienen a incrementar el crecimiento de raíz principal y foliar (~10%). Ambos COVs liberados incrementan fuertemente (26 al 77%) la longitud raíces laterales de *S. lycopersicum* al día 6 y 9. Al día 9 ambos COVs incrementan en un 97% la densidad de pelos radicales. La encapsulación de COVs en ALN constituye una estrategia biotecnológica de innovación para incrementar la tasa de crecimiento de *S. lycopersicum*, con potencial aplicación en cultivos de invernadero.

¹ Laboratorio de Nanobiotecnología Ambiental, Departamento de Ingeniería Química, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile

² Laboratorio de Química Ecológica, Departamento de Ciencias Químicas y Recursos Naturales, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile

³ Centro de Excelencia en Investigación Biotecnológica Aplicada al Medio Ambiente (CIBAMA), Facultad de Ingeniería y Ciencias, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile

p.fincheira01@ufromail.cl

NUEVAS ESTRATEGIAS PARA LA INTRODUCCIÓN DE RESISTENCIA A *RALSTONIA SOLANACEARUM* EN PAPA – INTRODUCCIÓN DEL RECEPTOR EFR DE *ARABIDOPSIS THALIANA*

Fort S.^{1,2*}; Ferreira V.¹; Murchio S.²; Schwartzman C.²; Vilaró F.²; Galván G.³; Siri M.I.¹; Dalla Rizza M.²

La papa comercial (*Solanum tuberosum* L.) representa el tercer cultivo alimenticio a nivel mundial. Su producción se ve comprometida por la marchitez bacteriana (BW) causada por *Ralstonia solanacearum* (Rs). Si bien se han identificado especies Solanaceas silvestres con resistencia, no se cuenta con cultivares resistentes de interés agronómico. Para avanzar en la introducción de resistencia a esta enfermedad, nuestro grupo incorporó en papa el receptor EFR de *Arabidopsis thaliana* (AtEFR), el cual reconoce el factor de elongación Tu conservado en bacterias. Este reconocimiento desencadena la respuesta de defensa PTI (*Patron-Triggered Immunity*). AtEFR fue transformado en un cultivar comercial susceptible (INIA Iporá) y en un clon avanzado del programa de mejoramiento con resistencia parcial por introgresión de genes de la especie silvestre *S. commersonii*, constituyendo un enfoque innovador donde se combinan estrategias de mejoramiento convencional con ingeniería genética.

El objetivo de este trabajo es caracterizar el efecto de AtEFR en la respuesta de defensa frente a BW. Se evaluó el progreso de la enfermedad mediante ensayos de inoculación en cámara de crecimiento y en macrotunel, verificando por ambos métodos, un retraso y disminución de la severidad de los síntomas de marchitamiento en los genotipos transformados. También se observaron patrones de colonización diferencial en los distintos genotipos, obtenidos mediante inoculación con cepas de Rs reporteras luminiscentes y fluorescentes. Por último, se presentarán los resultados más recientes, donde se evaluó, mediante cuantificación relativa por qPCR, la expresión de genes marcadores de la respuesta PTI, observándose una mayor inducción en las plantas transgénicas EFR. Finalmente, se presentará como perspectiva la realización de un análisis transcriptómico masivo (RNA-Seq), para identificar genes asociados a la respuesta mediada por el reconocimiento EFR/EF-Tu, así como el efecto de genes de resistencia menores introgresados por mejoramiento convencional.

¹ Laboratorio de Microbiología Molecular, DEPPIO, Facultad de Química, UDELAR

² Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Uruguay

³ Centro Regional Sur, Facultad de Agronomía, UDELAR

*sofiifort@gmail.com

MARCADORES GENÉTICOS DE RESISTENCIAS A ENFERMEDADES PARA EL MEJORAMIENTO ASISTIDO EN TOMATE (*SOLANUM LYCOPERSICUM* L.)

Fuentes A., Rodríguez J.E., Sahagún J., Lobato R., Mascorro J.O., Gaspar R.

Al ser la segunda hortaliza más cultivada a nivel mundial, el tomate está expuesto a más de 100 patógenos causales de enfermedades con alto impacto económico, por lo que la incorporación de resistencias genéticas en variedades mejoradas es obligada, al ser éste el método de control más eficiente en términos económicos y ambientales. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la eficiencia de marcadores moleculares asociados a la resistencia a enfermedades, como herramientas para el mejoramiento asistido. Se describen los métodos de aplicación de 8 pares de marcadores asociados a 7 genes de resistencia a seis patógenos: *Fusarium oxysporum*, genes *I-1* e *I-2* (At2 y Z1063), virus del mosaico del tomate, gen *Tm2* (Tm2SNP190mis), *Meloidogyne* spp., gen *Mi1* (Pmi y Mi23), *Phytophthora infestans*, gen *Ph3* (Ph3SCAR), begomovirus de la hoja rizada, gen *Ty3* (P6-25) y tospovirus de la marchitez de fruto, gen *Sw5*, (*Sw5F/R2*). Se usaron 119 líneas y 5 híbridos comerciales para verificar la eficiencia de dichos marcadores. Se detectó el gen *Mi1* en 38 líneas; el gen *Sw5* en 111, el gen *Ph3* en 20, el gen *I-1* en 110, el gen *I-2* en 120 y el gen *Tm2* en 13. El gen *Ty3* se detectó sólo en dos híbridos comerciales. La línea L51 presentó cuatro genes de resistencia; en tanto que L6, L50, L74, L79 y LRF81, tuvieron tres. En dos híbridos comerciales se identificaron 3 genes de resistencia y en otros dos más, cuatro genes. Los marcadores moleculares permiten discriminar genotipos con resistencias a seis enfermedades que afectan al cultivo del tomate. Es indispensable adaptar las metodologías a las condiciones particulares de cada laboratorio, ya que los insumos y equipos empleados pueden tener eficiencias diferentes. El uso de marcadores moleculares dentro del mejoramiento genético puede incrementar la eficiencia de la selección.

AVANCE GENERACIONAL RÁPIDO EN SOJA Y SU INCORPORACIÓN AL PROGRAMA DE MEJORAMIENTO GENÉTICO

Gallino JP*, Castillo A*, Acosta V*, Bonnacarrère V*, Ceretta S*

La creación de nuevas variedades comerciales de cultivos es una actividad de largo plazo, pueden transcurrir al menos una década desde que se inicia un programa de cruzamientos hasta que se libera al mercado el nuevo cultivar agronómicamente superior a las anteriores variedades elegidas como testigos. Un programa de mejoramiento de soja convencional consta de tres etapas básicas: a) se realizan cruzamientos iniciales («F1») entre variedades elegidas como padres, porque poseen diferentes características agronómicas deseables y complementarias, b) se dejan desarrollar 4 ciclos de autofecundación sucesivas de las plantas F1 para que los descendientes recombinen la información genética heredada de sus padres y que homogenicen y establezcan sus genotipos y c) se evalúan y seleccionan las líneas estabilizadas (genotipos altamente homocigotas) que presentan valor agronómico superior. En el contexto de un programa clásico, la etapa de autofecundaciones sucesivas es la que consume más tiempo; además, es imprescindible ya que sólo las líneas genéticamente estabilizadas (altamente homocigotas) serán predecibles en sus características agronómicas. El Avance Generacional Rápido, AGR, es una técnica que consiste en controlar los factores externos que influyen en el crecimiento de las plantas, como la temperatura, la calidad e intensidad de la luz, el fotoperiodo, la nutrición y otros, con el objetivo de acortar el ciclo desde siembra a la cosecha de vainas. En éste marco se desarrolló un protocolo que permitió acortar el ciclo de diferentes genotipos de soja a 60 días, sin utilizar el rescate de embriones en condiciones «in vitro», lo cual lo hizo más simple para la incorporación en el programa de mejoramiento, reduciendo costos y tiempo de mano de obra calificada. Por otra parte se están explorando nuevas alternativas que permitan reducir el ciclo de las plantas en condiciones de invernáculo y prescindir del uso de cámaras de crecimiento.

DISEÑO DE *SINGLE GUIDE RNAS* (SGRNAS) PARA LA MODIFICACIÓN POR CRISPR-CAS9 DE POSIBLES GENES DE SUSCEPTIBILIDAD A LA ENFERMEDAD HUANGLONGBING DE LOS CÍTRICOS

Gardella V. M., Reyes C. A.

Al producirse la infección de plantas de Naranja dulce (*Citrus sinensis*) por la proteobacteria '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' causante de la enfermedad Huanglongbing, se genera una variación en los niveles de expresión de diversos genes. Algunos de estos genes están ligados con la respuesta al estrés biótico relacionándose con la muerte celular programada y la respuesta hipersensible; y otros cumplen funciones asociadas con procesos metabólicos de la planta. El patógeno aumenta o disminuye la expresión de estos genes de forma de facilitar la colonización de la planta. Mediante la técnica de edición génica CRISPR/Cas9 se plantea modificar un grupo de estos posibles genes de susceptibilidad para aumentar la resistencia de la planta a esta importante enfermedad.

La selección de los genes blanco se realizó mediante el análisis de estudios transcriptómicos previamente publicados de plantas infectadas con *Candidatus Liberibacter*. Usando el genoma de *C. sinensis* disponible en diversas bases de datos (*Citrus sinensis* Annotation Project – <http://citrus.hzau.edu.cn/orange/>; Phytozome – <https://phytozome.jgi.doe.gov/>; entre otros) se obtuvieron las secuencias de los genes seleccionados y de las proteínas que codifican. Se analizó la secuencia de cada proteína, realizando un análisis comparativo con miembros de la misma familia y proteínas homólogas de otras especies de plantas, de forma de identificar motivos altamente conservados. Para ello se utilizó la herramienta COBALT (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/cobalt.cgi?CMD=Web>) y se seleccionaron las regiones de los genes que serán blanco de edición. Para el diseño de las guías (sgRNAs) se recurrió a las herramientas de acceso libre CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>) y Benchling (<https://benchling.com/>) y se eligieron aquellas que tuvieran puntajes *on-target* (indicando capacidad de corte) y *off-target* (indicando especificidad) altos y coincidentes en ambos programas. Posteriormente se procederá al clonado de las sgRNAs correspondientes a los genes seleccionados en vectores binarios para la transformación genética de plantas de *Citrus sinensis*.

AJUSTE DE LA DESINFECCIÓN DE EXPLANTES DE *SALIX HUMBOLDTIANA* WILLD. (SAUCE NATIVO) PARA SU INTRODUCCIÓN *IN VITRO*

Cedres Gazo, M.N³; Vocos, M.³; Dalzotto, D. ²; Boeri, P.²; Sharry, S.E^{1,2*}

Los ecosistemas y poblaciones vegetales de Argentina han sufrido profundas alteraciones antrópicas. En la Patagonia, el Sauce criollo (*Salix humboldtiana*) se encuentra seriamente amenazado. Con la introducción de otras especies de *Salix* sp, la competencia para su establecimiento en los márgenes de los ríos y la hibridación (posee igual sincronía en la polinización de las plantas), trae como consecuencia la pérdida de material genético original y hábitat. Las técnicas de propagación a gran escala son fundamentales para asegurar la base genética y la procedencia de la especie y su reintroducción en la naturaleza. El objetivo general del trabajo es optimizar protocolos de desinfección de explantes (estaquillas y hojas) de *S. humboldtiana* que permita introducirlos *in vitro*. Se utilizaron estaquillas de diferente grosor dividiéndolas en tres grupos: finas (0,2mm), medias (0,3mm), gruesas (0,5mm), se aplicaron diferentes tratamientos de desinfección. Las estaquillas gruesas se trataron **T1**= Etanol 70% 30min/NaClO 50% 30min, **T2**= fungicida sistémico carbendazim 6% 40min/Etanol 70% 15min/ NaClO 30% 20min, **T3**= carbendazim 6% 60min/etanol 70% 10min/NaClO 50% 20min; para las estaquillas medias: **T4**= Etanol 70% 30min/NaClO 50% 30min, **T5**= carbendazim 6% 60min/Etanol 70% 5min/NaClO 50% 20min, **T6**= carbendazim 6% 40min/etanol 70% 5min/ NaClO 30% 20min; y para estaquillas finas: **T7**= etanol 70% 20min/ NaClO 50% 30min, **T8**= carbendazim 60min/ etanol 70% 5min/ NaClO 50% 15min, **T9**= carbendazim 6% 15min/etanol 70% 2min/NaClO 30% 10min. Los resultados muestran que hay menos contaminación en T3 para las estacas gruesas, en T5 para las estacas medias, y en T9 para estacas finas. Se observó que cuanto mayor es el tiempo de inmersión en el etanol y en el hipoclorito de sodio, hay mayor oxidación. Ninguno de los tratamientos logró reducir en más de un 70% la contaminación endógena de las estaquillas, por lo que hay que continuar probando otros productos y tiempos de inmersión.

¹ Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de Río Negro, Subsecretaría de Recursos Forestales. Viedma, Río Negro, Argentina

² Universidad Nacional de Río Negro, Sede Atlántica, Viedma, Río Negro, Argentina

³ LIMAD, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP-CICPBA. La Plata, Buenos Aires, Argentina.

*ssharry@gmail.com

MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHANGES DURING SOMATIC EMBRYOGENESIS IN MAHOGANY, *SWIETENIA MACROPHYLLA* (MELIACEAE)

Andrés Gatica-Arias¹, Kaliana Vargas-Corrales¹, Miguel Benavides-Acevedo¹, Alejandro Bolívar-González¹, Ethel Sánchez-Chacón³, Elmer García-Díaz², Fabián Delgado-Rodríguez⁴, Nien Tzu Weng Huang⁴, Martin Hegele^{5†}, Jens-Norbert Wünsche⁵ & Marta Valdez-Melara¹

Abstract: Intensive exploitation of mahogany wood (*Swietenia macrophylla*, Meliaceae) has resulted in the loss of natural populations. Somatic embryogenesis offers an alternative to clonal propagation and conservation of mahogany. This study describes biochemical (carbohydrates, total phenols, total flavonoids, protein, and plant growth regulators content) and histological characteristics of the somatic embryogenesis process in mahogany. Calli were obtained by culturing cotyledons of seeds from immature fruits for six weeks on semi-solid MS medium supplemented with 1.0 mgL⁻¹ of kinetin and 4.0 mgL⁻¹ of 2, 4-D. Primary callus was cultured on half-strength semi-solid MS medium supplemented with 1.0 mgL⁻¹ 6-BA (6-benzylaminopurine) and embryogenic structures were obtained. Embryo development from globular-shaped somatic embryos to the cotyledonary stage was confirmed by histology and scanning electron microscopy. Shoot initiation was observed after somatic embryos were transferred to the germination and maturation medium. Endogenous concentrations of carbohydrates, total phenols, total flavonoids, protein, and plant growth regulators were determined in embryogenic (EC) and non-embryogenic (NEC) calli of mahogany. Embryogenic cultures contained significantly higher concentrations of IAA (indoleacetic acid), ABA (abscisic acid), and GAs (Gibberellins 1+3+20), whereas non-embryogenic calli contained more total phenols, flavonoids, and resistant starch. Fructose and glucose were not present at detectable levels in EC or NEC, whereas soluble starch and sucrose were only detectable in EC. Concentrations of total proteins, Z/ZR (Zeatin/zeatin riboside) and iP/iPA (N6-(Δ^2 -isopentenyl) adenine and N6-(Δ^2 -isopentenyl) adenosine) were similar in EC and NEC.

¹ Laboratorio de Biotecnología de Plantas, Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica; Costa Rica

² Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, Costa Rica

³ Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas (CIEMIC), Universidad de Costa Rica, Costa Rica

⁴ Laboratorio de Fitofarmacología, Tecnología Farmacéutica y Cosmética (LAFITEC), Instituto de Investigaciones Farmacéuticas, Universidad de Costa Rica, Costa Rica

⁵. Institute of Crop Science, University of Hohenheim, Germany

LA MICROPROPAGACIÓN: UNA HERRAMIENTA CLAVE PARA MEJORAR LA CALIDAD GENÉTICA, SANITARIA Y FISIOLÓGICA DE LAS PLANTAS MADRES UTILIZADAS EN LOS VIVEROS DE FRUTILLA DE LA ZONA LITORAL NORTE DEL URUGUAY

Giambiasi M¹, Vicente E², Arruabarrena A¹

La frutilla es un producto emblemático de la horticultura del noroeste de Uruguay. Actualmente en Salto se produce más del 50% de la frutilla nacional. La zona está especializada en la producción precoz de invierno e inicios de la primavera. Las variedades utilizadas son en su gran mayoría provenientes del programa de mejoramiento genético de INIA. Las plantas se obtienen de viveros locales realizados bajo invernáculo en los mismos predios de producción de fruta. Recientemente la producción de frutilla estuvo comprometida por causa de un grave problema de mortandad de plantas asociada a un complejo de hongos de tallo y raíz. La crisis sanitaria se logró manejar principalmente a través del uso de nuevas variedades tolerantes. La micropropagación es una herramienta biotecnológica que permite multiplicar exponencialmente un determinado número de plantas en poco tiempo. El objetivo del trabajo fue realizar ajustes en el medio de cultivo *in vitro* para maximizar el número de plantas madre de frutillas tolerantes obtenidas. Se partió de un protocolo estándar Murashige and Skoog al que se adicionó diferentes concentraciones de 6-N-Bencilaminopurina y carbón activado. Se encontró que con las concentraciones de 0,3mg/L de la hormona y 0,5g/L de carbón activado se logra obtener una relación adecuada en el número de plantas obtenidas y la calidad de las mismas. Encontramos que las plantas madres micropropagadas ofrecieron ventajas sobre aquellas multiplicadas tradicionalmente 1) se obtuvieron rápidamente miles de plantas de las variedades de interés; 2) las plantas provenientes del cultivo *in vitro* no poseen patógenos; 3) producen mayor número de estolones que las plantas madres tradicionales, por lo que se obtienen mayor cantidad de mudas. La micropropagación de plantas de frutilla ha contribuido a la sostenibilidad de los viveros y del cultivo de frutilla para el sistema productivo del noroeste de Uruguay.

¹Unidad de Biotecnología, INIA Salto Grande, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Uruguay

²Programa Nac. Inv. Prod. Hortícola, INIA Salto Grande, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Uruguay

mgiambiasi@inia.org.uy

PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE LIMÓN MEXICANO (*CITRUS AUARANTIFOLIA* L.) Y CACAO (*THEOBROMA CACAO*), COMO MODELOS DE RESISTENCIA A *FUSARIUM EUWALLACEAE*

Gómez -Entzin V., Qui-Zapata J.A., Castañeda-Nava J.J., Arana-Gutiérrez J.P.R., Gómez-Velázquez M.G., Montero-Cortez M.I. Gutiérrez-Mora A*.

El limón mexicano (*Citrus aurantifolia* L.) y el cacao (*Theobroma cacao*) representan una gran importancia para el consumo nacional además de ser cultivos de exportación y por sus características alimenticias e industriales. El objetivo de este trabajo fue realizar la micropropagación de estas especies para posteriormente utilizarse como modelos para la inducción de resistencia a *Fusarium euwallaceae*, utilizando elicitores proteicos. Para la inducción de brotes en limón se utilizó el medio de cultivo MS suplementado con Ácido Giberélico (AG3) y diferentes concentraciones de Bencil Amino Purina (BAP) y Cinetina (KIN), la mayor proliferación de brotes fue con 1.0 mg L⁻¹ de BAP y 0.5 mg L⁻¹ de KIN. El enraizamiento se llevó a cabo en medio de cultivo MS suplementado con Ácido á-nafatalenacético (ANA) y Ácido Indolbutírico (AIB) y 8.0 gr L⁻¹ de agar. Los resultados indicaron que con 1.0 mg L⁻¹ ANA se obtuvo el mayor número de raíces. Para cacao, las semillas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio (NaClO) al 5% durante 10 min, seguido de tres enjuagues con agua estéril durante 5 minutos. Las semillas se establecieron en medio DKW, estas germinaron en un periodo de 7 a 15 d. Posteriormente, se transfirieron a medio WPM suplementado con diferentes concentraciones de BAP, a los 15 d de cultivo inició el rompimiento de latencia en las yemas axilares con la dosis de 3.0 mg L⁻¹ de BAP con una tasa de propagación de 3 brotes por yema. El enraizamiento de los brotes se llevó a cabo en medio DKW adicionado de 3.0 mg L⁻¹. La regeneración de plantas establecidas en este estudio puede aplicarse para obtener un mayor número de plantas con respecto a lo ya reportado. Este trabajo está financiado por CONACYT en el proyecto FORDECYT 292399.

EDICIÓN GENÓMICA EN SOJA PARA MEJORAMIENTO DE CARACTERES NUTRICIONALES

González J.*^{1,2}, Fort S.*¹, Gallino J.P.*^{2,1}, Fleitas A.L.*¹, Bonnacarrère V.*², Vidal S.*¹

La soja es el principal cultivo producido en Uruguay y de los principales bienes exportados. Los objetivos de mejoramiento (particularmente del programa de mejoramiento de INIA) incluyen aspectos de calidad del grano, como aumento de proteína y disminución de factores antinutricionales. Entre estos factores antinutricionales se encuentran las lectinas, siendo la aglutinina (SBA: SoyBean Agglutinin), la principal lectina del grano de soja. Esta proteína se une específicamente a los carbohidratos galactosa y N-acetilgalactosamina de las células epiteliales del intestino generando hipertrofias e hiperplasias, además de afectaciones endócrinas e inmunológicas.

El objetivo de este trabajo es obtener genotipos de soja libres de SBA para ingresar al programa de mejoramiento genético. Para esto se buscará producir mutaciones de tipo knock-out en el gen que codifica SBA (LE1) mediante edición genómica utilizando el sistema CRISPR-Cas9. Para ello, se diseñaron moléculas de ARN guía, con homología para tres regiones específicas del gen LE1, y se clonaron en vectores de expresión de ARN bajo el control de los promotores U3 y U6 de Arabidopsis. La eficiencia de los ARN guías diseñados, para el reconocimiento del locus LE1, fue evaluada in vitro utilizando los complejos de Cas9/ARNg. Los módulos de expresión de ARNg fueron introducidos en un vector de transformación de plantas, conteniendo el gen que codifica Cas9 optimizado para su expresión en Arabidopsis. En paralelo, se diseñó un vector de biolística que contiene el cassette de expresión de Cas9 optimizada para soja y los ARNs guía con promotores pU6.6 de Medicago truncatula.

Con estas construcciones se transformaron plantas de soja mediante biolística, obteniéndose alrededor de 15 eventos. Las plantas transformadas serán genotipadas para la presencia de mutaciones mediante secuenciación del locus SBA. Se seleccionarán plantas de la generación T2, presentando mutaciones homocigotas en SBA, para segregar las construcciones génicas y obtener genotipos libres de transgenes.

*¹Laboratorio de Biología Molecular Vegetal (LBMV), Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay

²Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Unidad de Biotecnología, Estación Experimental INIA Las Brujas. Canelones, Uruguay

jgonzalez@fcien.edu.uy

DESARROLLO DE PLÁNTULAS DE LECHUGA (*LACTUCA SATIVA*) EN LUZ LED VIOLETA, AMARILLA, AZUL, ROJA Y VERDE

González-González R¹., Alfaro-Hernández G¹., Tafota-Cervantes J.M.¹, Cepeda-Negrete J²., Sotelo-González J.U.¹, Mireles-Arriaga A.I.¹, Ruiz-Nieto J.E.^{1*}

La luz solar se descompone en diferentes longitudes de onda y las plantas están dotadas de distintos tipos de moléculas especializadas en su percepción como criptocromos, clorofilas, carotenoides y fitocromos. La tecnología LED ha posibilitado el cultivo de plantas en ambientes controlados con menos gastos energéticos y altos niveles productivos. Sin embargo, las variaciones en componentes de la luz como su longitud de onda generan modificaciones a diferentes niveles de la biología vegetal, por lo tanto requiere un mayor entendimiento de dichas respuestas en diversas condiciones de iluminación para generar paquetes tecnológicos con luz artificial. El cultivo intensivo de lechuga depende de la disponibilidad de plántulas de alto valor agronómico que se podría obtener mediante el manejo preciso de la luz en lugar del uso excesivo de agroquímicos. El objetivo del proyecto fue evaluar el desarrollo de plántulas de lechuga en luz LED violeta, amarilla, azul, roja y verde. Se germinaron semillas de la variedad Siskiyou tipo Cos en longitudes de onda luz violeta, amarilla, azul, roja y verde en una cámara oscura de crecimiento diseñada para el presente estudio. Como controles se utilizaron luz blanca LED y natural. En dos etapas del desarrollo de plántulas (7 y 16 días), se evaluó germinación (%), vigor (%), longitud de la raíz (cm), diámetro del nudo vital (mm), área foliar (mm²), color (Lab) y concentración de prolina (µg mL⁻¹). Los resultados se analizaron en un diseño completamente al azar con 5 repeticiones, se realizaron pruebas de medias de Tukey (0.05). La luz violeta y azul permitieron el desarrollo de plántulas con características agronómicas con alto valor potencial; debido a que las plantas perciben principalmente la luz azul y roja, en la luz violeta ambas longitudes de onda se encuentran presentes, sin embargo, los resultados indican la señalización mediada por la luz azul puede inducir rutas metabólicas indispensables en esta etapa fenológica.

Palabras clave: iluminación artificial, biotecnología agrícola, espectrofotometría.

¹Departamento de Agronomía. ²Departamento de Ingeniería Agrícola, División Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato, Campus Irapuato-Salamanca, ex hacienda el Copal, km 9 Carretera Irapuato-Silao, CP 36500, Irapuato, Guanajuato, México

*jorge.ruiz@ugto.mx

ANÁLISIS GENÉTICO DEL MORTIÑO, UNA ESPECIE VULNERABLE DE LA SIERRA ECUATORIANA

Guadalupe J.J.¹, Vega P.¹, Cobo, M.M.¹, Argudo A.¹, Pinos A.¹, Ramírez D.¹, Torres M.L.¹

El mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) es un arbusto silvestre perteneciente a la familia *Ericaceae*. Tiene una distribución limitada a América del Sur, específicamente a ecosistemas de altura de Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia. Se ha reportado que la distribución altitudinal de esta especie va desde los 1600 hasta los 4200 msnm. En el Ecuador, el mortiño se encuentra en el páramo, un ecosistema único en el país y no ha sido domesticada. El mortiño tiene un alto valor comercial y cultural debido a su fruto, puesto que tiene un alto contenido de compuestos bioactivos para los cuales se ha reportado múltiples propiedades medicinales. Pese a la importancia local que tiene esta especie, su hábitat se ha visto reducido y fragmentado, por lo que podría encontrarse en un estado de vulnerabilidad. Existe limitada información sobre su diversidad genética y estructura poblacional. Por esto, mediante el uso de 16 marcadores moleculares microsátélites específicos para esta especie, se analizó un total de 100 muestras provenientes de 10 provincias de la Sierra ecuatoriana. Se encontró un total de 179 alelos en la población con un promedio de 11.2 alelos por locus. La heterocigocidad esperada global fue de 0.73 que es una diversidad genética moderadamente alta. Mediante inferencia bayesiana, se encontró cuatro clusters genéticos. Pese a que no se encontró una correlación entre distancia genética y distancia geográfica, la diferenciación entre estos clusters podría ser explicada por hechos históricos de la región andina tanto climáticos, como de composición geológica diferencial en la serranía ecuatoriana. Es interesante destacar que se encontró un cluster atípico que agrupa a individuos recolectados a más de 3900 msnm; se podría inferir que estos podrían haber pasado por procesos adaptativos diferentes. Los resultados obtenidos en este estudio pueden servir de base para el uso sostenible y conservación de este importante recurso biológico de la sierra ecuatoriana.

¹Universidad San Francisco de Quito (USFQ), Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales, Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Campus Cumbayá, Quito, Ecuador
jguadalupe@usfq.edu.ec

MANEJO DE LA CONTAMINACIÓN BACTERIANA EN EL ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE *COLOCASIA ESCULENTA* (L.) SCHOTT ANTE EL CAMBIO CLIMÁTICO

Yenisey Gutierrez Sánchez¹, Yelenys Alvarado-Capó², Damicela Reinaldo¹, Maricel Bauta Toledo¹, Ayme Rayas Cabrera¹, Arletys Santos Pino¹, Milagros Basail Pérez¹, Jorge López Torres¹, Victor Mederos Vega¹, Yoel Beovides García¹; Dayana Rodríguez González¹.

La malanga (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) es un cultivo de alta demanda en Cuba y a nivel mundial. Dentro de las tácticas de manejo de las pudriciones secas, enfermedad que afecta este cultivo, se encuentra la utilización de plantas producidas *in vitro*, única vía de plantación de semilla libre de la enfermedad. Sin embargo, las técnicas de propagación *in vitro* han tenido limitaciones debido a la contaminación microbiana, principalmente por bacterias. Este trabajo persiguió como objetivo proponer una estrategia para el manejo de la contaminación bacteriana en la propagación *in vitro* de *Colocasia esculenta* (L.) Schott. cv 'INIVIT MC-2012'. Los resultados indicaron que la incidencia de la contaminación por bacterias alcanzó más del 40% asociada al explante inicial. El empleo de alternativas para el establecimiento y multiplicación *in vitro* de malanga cv. que incluyen el tratamiento del explante inicial, la disminución de su tamaño y el trabajo por líneas permiten reducir la contaminación bacteriana en las fases del proceso. Los resultados de la aplicación de alternativas para la propagación *in vitro* de malanga cv. 'MC-INIVIT 2012' permitió proponer una estrategia para el manejo de la contaminación bacteriana en este cultivo. El tratamiento de la planta donante con medidas agrotécnicas y fitosanitarias, la aplicación de métodos de detección temprana de contaminantes, el manejo del material vegetal *in vitro* según su origen y el cumplimiento de la disciplina tecnológica permiten disminuir la contaminación bacteriana en el establecimiento *in vitro* de malanga. Estos resultados contribuyen a elevar la eficiencia de la propagación *in vitro* de este cultivo como adaptación ante el cambio climático. Así como obtener semillas de alta calidad genética y fitosanitaria para introducir en la producción y mitigar los efectos negativos de las adversidades climáticas.

¹ Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), Apdo. 6, Santo Domingo, Villa Clara. Cuba. contam.biotec@inivit.cu

² Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5,5. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54830

EFFECTOS EN EL DESARROLLO Y REPRODUCCIÓN DE *DROSOPHYLA MELANOOGSATER* CAUSADO POR ZN CONTENIDO EN BIOMASA DE SUSPENSIONES CELULARES DE BOROJO

Hoyos RA¹, López, JD²; López JF²; López JB¹

El borojo (*Borojoa patinoi*) es una especie originaria de bosques tropicales de Suramérica y la etnobotánica lo reconoce por su valor medicinal y nutracéutico. Por lo anterior, el programa de biotecnología vegetal y considerando la bioprospección de esta planta, se han iniciado cultivos *in vitro* de células en suspensión para evaluar sus propiedades biológicas y aprovechar sus potenciales biotecnológicos en el campo industrial, farmacéutico y alimentario. La biomasa rica en zinc se obtuvo de células cultivadas en el medio de cultivo MS suplementadas con 0.5 mg L⁻¹ de BAP y 0.5 mg L⁻¹ de IAA más una fuente de Zinc. El contenido de Zinc de esta biomasa fue de 204 mg kg⁻¹ de materia seca evaluada bromatológicamente, en contraste con lo obtenido en hojas y fruto que fue de 15 y 0 mg kg⁻¹ respectivamente. Los bioensayos se realizaron en *D. melanogaster* con tratamiento de (20, 50 y 100 mg) de biomasa como suplemento en medio de crecimiento normal, el control negativo fue un medio con biomasa sin Zinc, se tomó ZnSO₄.7H₂O como control positivo y un control estándar sin biomasa. Los resultados obtenidos muestran que la biomasa obtenida *in vitro* de células de borojo con Zinc aceleran el ciclo de vida larvaria y aumenta 1.6 la tasa de reproducción con respecto al control negativo y 2.1 veces con respecto al control estándar, además se encontró una toxicidad total en el control positivo. De estos resultados preliminares se puede inferir que el Zinc contenido en la biomasa del borojo influye tanto en el desarrollo larvario como en el incremento de los procesos reproductivos en *D. melanogaster* y muestran indicios de que el Zinc podría estar conjugado con moléculas orgánicas tipo péptidos que baje su toxicidad e incremente su biodisponibilidad.

¹Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín

²Semillero de Genética y Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín

rhoyos@unal.edu.co

BIORREMEDIACIÓN DE PB Y CD PRESENTES EN SUELOS AGRÍCOLAS POR EL RABO DE ZORRO *LOLIUM MULTIFLORUM* L

Dr. Félix Huaranga Moreno*; **Dr. Eduardo Méndez Garcia****; **Ing. Félix Huaranga Arévalo*****; **Alfredo León Alayo***

Los relaves mineros, es una de las más peligrosas formas de contaminación generadas por la explotación minera que se desarrollan básicamente en nuestro país en las cabeceras de cuencas, y que afectan contaminando principalmente a los recursos hídricos continentales, suelos agrícolas y zonas costeras marinas donde desembocan los ríos de la cuenca hidrográfica del Pacífico; por lo que en la presente investigación se trata de cuantificar la absorción de los metales pesados Pb y Cd por el rabo de zorro *Lolium multiflorum* L, utilizando suelos contaminados por material de relave que contienen estos metales pesados, provenientes de la zona de Samne, La Libertad, Perú. Para determinar la concentración de los metales pesados Pb y Cd, se utilizó la digestión húmeda y la cuantificación mediante la metodología de la espectrofotometría de absorción atómica. Los resultados encontrados, indican que los valores de la concentración de los metales pesados absorbidos Pb y Cd, siguieron la siguiente tendencia: $Pb > Cd$, siendo el Pb, el que presenta mayor nivel de absorción a los 65, 95 y 125 días de experimentación.

Palabras claves: Relaves, Rabo de zorro, Metales pesados, Cuantificación.

(*) Laboratorio de Ecología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo, Perú

(**) Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Trujillo, Perú

(***) Agrosolutions SAC, Perú

email: rhuaran@gmail.com

ESTUDIO DE GENES CANDIDATOS PARA EL MEJORAMIENTO DE YUCA BIOFORTIFICADA

Jaramillo, A. M.^{1,2}, Castillo, D. K.³, Ocampo, J. A.², López-Lavalle, L. A. B.³, Álvarez, D.¹

Introducción: El desarrollo de variedades de yuca biofortificada con alto contenido de carotenoides provitamina A es una estrategia para combatir la deficiencia de vitamina A. El fitomejoramiento de la yuca es un proceso lento y costoso. Es por ello esencial hallar nuevos marcadores moleculares que permitan acelerar la selección de nuevas variedades. La proteína fitoeno sintasa (PSY) cataliza la primera reacción específica de la carotenogénesis. La proteína ORANGE (OR) participa en la producción y acumulación de carotenoides en cultivos como coliflor, melón, o batata. La relación entre ambas proteínas no ha sido estudiada todavía en la yuca.

Objetivo: Encontrar nuevos marcadores moleculares que permitan la obtención de fenotipos de yuca con alto contenido en carotenoides.

Metodología: Se cosecharon raíces de yuca blanca y amarilla de 11 meses. El contenido de carotenoides se analizó por HPLC, y la expresión de dos isoformas de PSY y OR, por qPCR. Se utilizó el cDNA del genotipo amarillo para secuenciar las isoformas de OR y PSY. Adicionalmente, se realizó un alineamiento de OR de yuca con otras especies.

Resultados: La concentración de carotenos totales osciló entre 0.5 y 16.4 µg/g. Se observó una mayor expresión del gen *PSY1* en las yucas amarillas, mientras que la expresión del gen *PSY2* y de ambos parálogos de *OR* no cambiaron significativamente. En la secuenciación se encontraron SNPs en *PSY* y en *OR*. Se observó un alto porcentaje de identidad (>70%) entre la proteína OR de yuca y otras especies.

Conclusiones: *PSY1* aparentemente está involucrado en una mayor producción de carotenoides. La invariable expresión de los genes *OR* en genotipos con alta acumulación en carotenoides ha sido observado en otras plantas, donde el control es post-transcripcional. La conservación de su secuencia la convierten en una proteína potencial para futuras investigaciones.

¹HarvestPlus, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Palmira, Colombia

²Universidad Nacional de Colombia, Palmira, Colombia

³Programa de yuca, CIAT, Palmira, Colombia

a.m.jaramillo@cgiar.org

EXPRESIÓN DE UN PRECURSOR DE TROMBINA EN SUSPENSIONES CELULARES DE *NICOTIANA BENTHAMIANA*

Laguia-Becher M.^{1,2}, Ricco M.V.^{1,2}, Marconi P.L.^{1,2}, Álvarez M.A.^{1,2}.

El cultivo *in vitro* de células vegetales es uno de los sistemas con mayor potencial en la industria biotecnológica ya que combina las ventajas generales de la expresión en plantas con aquéllas asociadas al crecimiento en biorreactor. La trombina es una enzima clave del proceso de coagulación y es empleada como agente hemostático para el control de hemorragias. Actualmente, se obtiene de plasma o del cultivo de células animales. Con el objetivo de desarrollar una plataforma alternativa a los sistemas actualmente en uso, se evaluó la producción de un precursor de trombina (pFIIa) en suspensiones celulares de *Nicotiana benthamiana*. Para ello, se obtuvieron líneas de callos transgénicos empleando construcciones que permiten direccionar a la proteína a la vía secretora (sec-pFIIa) o retenerla en el retículo endoplasmático (pFIIa-ER). La eficiencia de transformación para sec-pFIIa y pFIIa-ER fue de 52,2 y 66,7%, respectivamente. Se seleccionaron 14 líneas para establecer suspensiones celulares en base a los niveles de expresión de pFIIa. De todas ellas, 6 líneas se adaptaron exitosamente al crecimiento en medio líquido en Erlenmeyers agitados. Cuando estas líneas se escalaron a un biorreactor de tanque agitado de 2L, se observaron distintos inconvenientes como la formación de microcallos y la adhesión de las células a las paredes del recipiente, lo que impidió la formación de suspensiones celulares dispersas. Se seleccionó una línea por construcción para caracterizar el proceso de producción en base a los parámetros cinéticos de crecimiento celular y rendimiento de pFIIa. La proteína recombinante solo pudo ser detectada en la biomasa de la línea pFIIa-ER a una concentración de 0,25 µg/ml (0,017% de las proteínas totales solubles). En ambos casos, pFIIa resultó indetectable en el medio de cultivo. Este trabajo describe por primera vez la expresión de un precursor de trombina en plantas.

¹Departamento de Investigaciones Bioquímicas y Farmacológicas, Laboratorio de Biotecnología Vegetal, CEBBAD, CABA, Argentina

²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Ciudad de Buenos Aires, Argentina
becher.melina@maimonides.edu

PRODUCCIÓN DE LA NUCLEOPROTEÍNA DEL *VIRUS DISTEMPER CANINO* EN PLANTAS TRANSPLASTÓMICAS DE TABACO: PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE SU VALOR INMUNOGÉNICO EN EL MODELO MURINO

Laguia Becher M.¹, Romanutti K.², Gallo Calderón M.², Trentini A.¹, Alvarez M.A.¹, Veramendi J.³, Marconi P.L.¹

El uso de las plantas como biorreactores para la expresión de antígenos es una alternativa atractiva para la producción de vacunas a subunidades. En particular, las plantas transplastómicas contienen un alto número de copias del transgén (>10000/célula). Además, como la integración del mismo es sitio específica se evitan los efectos de posición y silenciamiento. Estas características, en combinación con la compartimentalización de la proteína en los cloroplastos, permite obtener altos niveles de acumulación de la proteína recombinante. El Virus Distemper Canino (VDC) provoca moquillo, una enfermedad multisistémica altamente contagiosa para perros y otras familias de animales. Aunque la inmunización con cepas atenuadas del VDC ha demostrado ser eficaz, en los últimos años se ha registrado un aumento en el número de animales vacunados que contraen esta enfermedad. Por este motivo, resulta necesario el desarrollo de nuevas vacunas que contengan inmunógenos actualizados. Con el objeto de evaluar una vacuna vegetal contra el moquillo, se obtuvieron plantas transplastómicas de tabaco que producen la nucleoproteína (NP) de una cepa Argentina del VDC. La proteína NP fue purificada de las hojas de las plantas transplastómicas en condiciones desnaturizantes obteniéndose un rendimiento de 0,07 mg/g de peso fresco. La inmunización de ratones por vía subcutánea (sc) con la proteína NP produjo una respuesta específica de anticuerpos IgG anti-NP, con títulos significativamente mayores al grupo control. Asimismo, se detectaron niveles significativos de IgG1 e IgG2a en los ratones inmunizados con NP. Los resultados obtenidos muestran que la proteína NP producida en plantas es capaz de inducir una respuesta inmune humoral específica en el modelo murino.

¹-Departamento de Investigaciones Bioquímicas y Farmacológicas, Laboratorio de Biotecnología Vegetal, CEBBAD-UMAI, CABA, Argentina

²-Instituto de Ciencia y Tecnología Dr. César Milstein-CONICET, CABA, Argentina

³-Instituto de Agrobiotecnología, Universidad Pública de Navarra-CSIC, Pamplona, España

becher.melina@maimonides.edu

RESPUESTA DE LÍNEAS DE TOMATE TRANSFORMADAS CON EL GEN *AtAVP1* ANTE NaCl EN GERMINACIÓN Y PLÁNTULA

López-Méndez A.G.¹, Mascorro-Gallardo J.O., Rodríguez-Pérez J.E., Rodríguez-de-la-O J.L. y Gaxiola R.A.

La resistencia al estrés causado por salinidad y sequía, ha sido uno de los objetivos de mayor interés en el mejoramiento genético de plantas, ya que la mayoría de los cultivos, incluido el tomate, son sensibles a estas condiciones. El objetivo de la presente investigación fue valorar la respuesta ante sal durante la germinación y desarrollo de plántula de eventos transformados con el gen *AtAVP1* de una línea experimental de tomate. Se emplearon concentraciones de 80 mM de NaCl en la solución de riego durante la germinación en cámara con 25 °C y 80% de humedad relativa. En plántula se empleó solución nutritiva adicionada con 200 mM de NaCl aplicada entre 15 y 35 días después de la emergencia. Los eventos transformados fueron obtenidos mediante la cepa de *A. tumefaciens* C58C1 con la constitución pTF101.1-35S::*AtAVP1*::NOS. La regeneración de brotes se realizó en medio MS suplementado con BAP, AIA y vitaminas Gamborg y con fosfinotricina como agente de selección. La etapa de enraizamiento se hizo en medio MS adicionado con AIB. Se obtuvieron 12 plantas T₀, de las cuales 7 (58%) fueron positivas de acuerdo con la prueba de PCR. En la generación T₁ se analizaron 70 plantas de las cuales 48 fueron positivas (68%), lo que indica una segregación de 3:1 (P<0.05). Durante germinación se observó adecuado desarrollo de seis eventos T₁ (provenientes de 5 plantas T₀), al expresar alto porcentaje (85%) y velocidad de germinación; así como mayor acumulación de materia seca. Durante la prueba de tolerancia a sal en plántula se identificaron 12 transformantes T₁ (provenientes de 7 plantas T₀) con alta velocidad y porcentaje (95%) de emergencia, que correspondieron a mayor acumulación de materia seca, porcentaje de sobrevivencia y vigor de plántula. Solo cuatro transformantes mostraron la mayor tolerancia a sal en ambas pruebas.

¹Departamento de Fitotecnia. Instituto de Horticultura. Universidad Autónoma Chapingo. km 38.5 carretera México-Texcoco, 56230, Chapingo, Estado de México

PROPAGACIÓN IN VITRO DE FAMILIAS DE PLANTAS SELECTAS DE TOMATE DE CÁSCARA (*PHYSALIS IXOCARPA* BROT. EX HORM.)

Luna-Vicente H., Peña-Lomelí A., Rodríguez-de la O J. L., Martínez-Solís J., Magaña-Lira N.

En México, el tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.) es la sexta hortaliza más importante. Con el objetivo de propagar *in vitro* plantas selectas de tomate para hacer cruza interclonales, fue evaluada la respuesta *in vitro* de ápices de tallo en familias de las poblaciones Tecozautla, Manzano y Morado. Las plantas producidas *in vitro* se aclimatizaron y trasplantaron en invernadero para dar seguimiento a su ciclo fenológico. Los ápices se cultivaron en un medio básico con las sales inorgánicas Murashige y Skoog (100 %) suplementado con 0.4 mg·L⁻¹ tiamina, 60 mg·L⁻¹ de L-cisteína, 100 mg·L⁻¹ de myo-inositol, 0.5 mg·L⁻¹ de ácido nicotínico, 0.5 mg·L⁻¹ de ácido pantoténico, 3 % de sacarosa, 7 g·L⁻¹ de agar, sin reguladores del crecimiento y un pH a 5.7 ± 0.1. El enraizamiento *in vitro* se hizo durante 30 días con 16 horas de luz a 3000 μmol·m⁻²·s⁻¹. Las variables evaluadas *in vitro* fueron altura de plántula, vigor, callo, longitud de raíz, número de hojas, raíces, tallos y botones, bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. Las variables evaluadas en invernadero en aclimatización fueron altura de planta, número de hojas, botones, y flores, en tanto que durante el ciclo fenológico se midió altura, número de hojas, flores y frutos. En ambos casos bajo invernadero se usó un diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones. Se estableció con éxito el protocolo de cultivo *in vitro* y aclimatización, con un porcentaje de sobrevivencia del 100 % para todas las familias clonales de las tres variedades. La respuesta al cultivo *in vitro* en las familias clonales dependió del genotipo. Sobresalieron las familias clonales de las variedades Tecozautla y Manzano. La fenología de las familias clonales presentó un desarrollo normal y similar a la fenología de las plantas provenientes de semilla.

PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS: BÚSQUEDA, PURIFICACIÓN Y PRODUCCIÓN

Maidana M.¹, Feijo M.³, Murchio S.¹, Leoni C.¹, Señorale M.³, Marín M.³, Blumwald E.⁴, Dalla Rizza M.¹

Desde el descubrimiento de la penicilina, el control de microorganismos patógenos sigue siendo un gran desafío que involucra tanto a salud pública como a la producción agrícola e inocuidad de alimentos. En los últimos 20 años los péptidos antimicrobianos (PAM) han despertado interés en este tema por presentar especificidad de organismos blanco y baja presión de selección de cepas multirresistentes. Los PAM son péptidos de cadena corta, entre 10 y 100 aminoácidos, de carga neta positiva y anfipáticos. Son producidos por la mayoría de los organismos, incluyendo animales y plantas. Los objetivos de este trabajo se centraron en la búsqueda, purificación y producción de nuevos PAM con la capacidad de controlar fitopatógenos de interés agronómico. La búsqueda de nuevos PAMs se realizó mediante RNAseq comparando la expresión de genes en dos etapas de desarrollo de semillas de Alcachofa. Se encontraron 119 transcritos, de los cuales 4 tienen alta homología con PAMs experimentalmente validados. Por otro lado se trabajó en la purificación de un péptido con dominio de unión a quitina a partir de semillas de *Amaranthus quitensis*, logrando purificar dos péptidos Aq-AMP1 y Aq-AMP2 con actividad inhibitoria frente a hongos fitopatógenos. Se seleccionó Aq-AMP2 para su producción heteróloga en *Pichia pastoris* buscando la producción extracelular y usar el dominio de unión a quitina para su posterior purificación. Finalmente también se probó la expresión en *Brachypodium distachyon* buscando la producción y acumulación en el endospermo de semilla. En ambos casos se logró seleccionar clones productivos restando la purificación para evaluación actividad funcional y avanzar hacia ensayos in-situ.

¹Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Uruguay

²Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay

³Centro Universitario Regional Este, Universidad de la República, Uruguay

⁴Plant science department, University of California, Davis, USA

INTERACCIÓN YUCA – ÁCARO VERDE: DESCUBRIENDO LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA A PLAGAS MEDIANTE UNA APROXIMACIÓN PROTEÓMICA

Jaime Marín^{1,2}, Kumar Vasudevan³, Jonas Grossmann⁴, James Montoya²,
Hervé Vanderschuren³

Yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es considerado el mayor cultivo en zonas tropicales para la seguridad alimentaria. Son más de 200 especies de plagas que atacan yuca, dentro de las que causan mas daño hasta generar un 80% de perdidas en la producción se encuentra el ácaro verde (*Mononychellus tanajoa*). Este trabajo permite analizar la interacción entre yuca y el ácaro verde mediante una aproximación proteómica utilizando dos genotipos contrastantes para la resistencia al ácaro verde (i.e. 60444 (susceptible) and NAT31 (resistente)). Se identificaron y cuantificaron 7426 proteínas únicas en hojas de ambos genotipos usando proteómica cuantitativa mediante etiquetado-libre. 1200 y 1292 proteínas fueron detectadas en los genotipos 60444 y NAT31 respectivamente, además se identificaron y cuantificaron 361 proteínas únicas en el ácaro verde, de los cuales se estableció una regulación significativa de 42 y 12 proteínas detectadas en el ácaro cuando se alimenta del genotipo susceptible (cv. 60444) y resistente (NAT31) respectivamente. La respuesta de yuca durante la interacción es la de activar varias vías como la biosíntesis de glucosinolatos, hormonas de plantas, metabolitos secundarios, aminoácidos y esteroides. Y la respuesta del ácaro verde esta relacionado con resistencia a insectos como; proteína de unión a quitina y derivación y desarrollo de tricomas solo para el genotipo resistente (NAT31). Este trabajo establece los posibles mecanismos de resistencia contra artrópodos plaga en yuca.

¹Departamento de Biología, Universidad del Valle, Cali, Colombia

²Programa de Biología, Universidad de los Llanos, Villavicencio, Colombia

³Plant Genetics, Gembloux Agro-BioTech, University of Liège, 5030 Gembloux, Belgium

⁴Functional Genomics Center, UZH/ETH 8057 Zurich, Switzerland

COMPARAÇÃO DA PRESENÇA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NO CULTIVO *IN VITRO* DE *VISMIA JAPURENSIS* SOB DOIS MEIOS DE CULTURA DISTINTOS

¹Lima L. M., ²Souza J. C., ³Nunez C. V.

A produção de metabólitos secundários é influenciada por diversos fatores como luminosidade, temperatura, fotoperíodo, disponibilidade de nutrientes e sais minerais. Na cultura *in vitro* esses fatores podem ser controlados a fim de aumentar a produção e até mesmo melhorar o estabelecimento da espécie. O estudo fitoquímico de *Vismia japurensis* permitiu o isolamento de antraquinonas e triterpenos e extratos com atividade antimalárica, antioxidante, antibacteriana e citotóxica. Assim, este trabalho objetivou comparar a produção *in vitro* de metabólitos secundários de plântulas de *V. japurensis* em dois meios de cultura distintos. As plântulas foram inoculadas em meio semi-sólido Murashige e Skoog (MS) e Wood Plant Medium (WPM). Após 60 dias, 20 plântulas de cada meio foram retiradas, lavadas, liofilizadas e extraídas utilizando metanol e ultrassom. Os extratos foram analisados em cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), utilizando reveladores físicos e químicos e por ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio. As análises químicas das plântulas dos dois meios testados apresentaram muitas semelhanças. Na análise por CCDC, ambos os extratos apresentaram substâncias com duplas ligações, indicando serem flavonoides e também a presença de terpenos. A análise de RMN de ¹H evidenciou a presença de ligações duplas conjugadas (sinais entre 6 e 9 ppm), que confirmam os flavonoides, também sinais alifáticos (entre 0,6 e 1,4 ppm), que condizem com terpenos e também uma grande quantidade de sinais de açúcares (entre 3 e 4 ppm), com os sinais referentes aos hidrogênios ligados ao C anomérico de açúcares (tanto alfa quanto beta). A principal diferença está que as plântulas cultivadas em meio MS apresentaram uma maior quantidade de sinais característicos dos anéis aromáticos. Estes resultados indicam que para a produção de metabólitos secundários *in vitro*, o meio MS se mostrou mais indicado, quando comparado com o WPM, para *V. japurensis*.

MICROBIAL COMMUNITY EVOLUTION DURING RESTORATION OF STREAM MORALES (MATANZA-RIACHUELO BASIN, MARCOS PAZ MUNICIPALITY)

Agnello A.C.¹, Del Panno M.T.¹, de Cabo L.², Trentini A.G.³, y Marconi P.L.³

Stream Morales has near its coast, in Marcos Paz Municipality, a landfill (7 ha) that has been used as dumping ground during, almost, 30 years. During 2017, the waste disposal was organized and the landfill was closed. In order to restore the landfill, the wastes were removed and the landfill was covered with crushed stones (March 2017-March 2018). The restoration processes were ended in December 2018 with the assembly of a biocorridor of native flora in the Matanza-Riachuelo basin. Trees, shrubs and herbaceous plants were distributed in 3 ha according to their environmental requirements. Four months later, the vegetal ground cover reached up to 92% (initially was only 3% plant cover). The objective of the present work was to study the diversity of microbial communities developed in the rhizosphere of different plant species used to restore the ex-landfill. Soil samples were obtained from 1) a control area without a story of dumping activities, 2) a control area in the dumping site that was not restored with vegetation and 3) the rhizosphere of vegetated restored area at the beginning of the intervention process and four months later. Microbial diversity of soil and rhizosphere samples was studied by DNA extraction, PCR amplification of 16S rRNA hypervariable regions and separation of the PCR products by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Clustering analysis using the UPGMA algorithm and the Jaccard coefficient revealed a shift in microbial communities of the rhizosphere of restored areas over time. After four months, bacterial communities of vegetated areas became more similar to the microbiome of the control soil that was never used as landfill. The results of this first monitoring indicate that the development of a plant cover could be an auspicious initial step to restore bacterial communities of the ex-landfill.

¹ CINDEFI, CONICET-UNLP, La Plata, Argentina

² MACN, CONICET, CABA, Argentina

³ U. Maimonides-CEBBAD, CONICET, CABA, Argentina

BIOTECNOLOGÍA ANIMAL

**ESTRATEGIAS DE GENÉTICA MOLECULAR Y GENÓMICA
APLICADAS A LA DETECCIÓN DE GENES RELACIONADOS A LA
CALIDAD DE LA CANAL Y LA CARNE OVINAS**

Armstrong, E.

La genética molecular ofrece diferentes estrategias para detectar genes relacionados a la calidad de la carne, rubro que ha aumentado su importancia en producción ovina. En un estudio con genes candidatos encontramos asociaciones novedosas entre polimorfismos de nucleótido simple (SNP) presentes en genes relacionados al crecimiento y metabolismo lipídico, con predicciones de diferencias esperadas en la progenie (DEP) de varios parámetros de crecimiento, calidad de la canal y la carne en 461 corderos Texel de Uruguay. Entre otros: PPARGC1A con peso de cortes valiosos, peso canal caliente y engrasamiento; DGAT1 con peso vivo, espesor de grasa, área de ojo de bife y peso de la paleta; CAST y GHR con peso al nacimiento y espesor de grasa. Varios genes afectaron significativamente el porcentaje de grasa intramuscular y perfil de ácidos grasos, así como fuerza de corte y color. En otro estudio, secuenciamos mediante RNA-Seq transcriptomas completos de nueve músculos en corderos pesados. Se detectaron diferencias significativas en expresión génica en todas las comparaciones, siendo más pronunciadas entre músculos rápidos glicolíticos vs. lentos oxidativos, relacionadas con actividad enzimática, tipo de fibras musculares, índice oxidativo, metabolismo energético, transporte iónico y vascularización. Varios transcriptos nuevos fueron detectados, relacionados a estructura y contracción muscular, metabolismo y fosforilación proteica. Los resultados coincidieron con las características histoquímicas de los músculos, observándose interesantes relaciones (regulación positiva de genes de transporte iónico y diferencias en capacidad de retención de agua; elevada expresión de genes relacionados a la adhesión intercelular, organización del citoesqueleto, componentes de la matriz extracelular y fosforilación proteica relacionados al color y fuerza de corte; diferencias de pH y expresión diferencial de genes relacionados a la actividad glicolítica y generación de ácido láctico). Los perfiles de expresión génica generados por secuenciación masiva son una herramienta muy poderosa para explorar la arquitectura genética de caracteres complejos.

GENERACIÓN DE NUEVAS HERRAMIENTAS PARA EL CONTROL DE *NEOSPORA CANINUM* A PARTIR DE UN ENFOQUE EPIDEMIOLÓGICO Y GENÓMICO

Cabrera¹, Berná L.¹, Fresia P.¹, Silveira C.², Macias Rioseco M.², Pritsch O.^{1,3}, Riet-Correa F.², Giannitti F.², Francia M.E.^{1,3}, Robello C.^{1,3}

Neospora caninum es el agente etiológico de la neosporosis bovina, una de las principales causas de aborto bovino en el mundo. Esta enfermedad produce pérdidas millonarias con un gran impacto económico en el sector ganadero, principalmente en el ganado lechero. Sin embargo, se sabe muy poco sobre la biología de este parásito. A través de un trabajo multicéntrico, nos propusimos profundizar en la situación local y global, siendo el objetivo de este trabajo la caracterización a nivel genético y fenotípico, de las cepas circulantes y su comparación con cepas de referencia, de forma de poder adaptar las herramientas diagnósticas y profilácticas a las necesidades de la región.

Por un lado aislamos cuatro cepas de tres regiones distintas de Uruguay, y mediante un análisis de microsatélites determinamos la existencia de una importante diversidad genética en esta especie. Los diversos perfiles de tipificación por microsatélites se correlacionaron con diferencias fenotípicas en transmisión vertical, virulencia y potencial abortivo en modelos murinos. Asimismo, la tipificación por microsatélites del ADN de *N. caninum* de fetos bovinos abortados espontáneamente de granjas lecheras se correlacionó con mayor frecuencia con uno de los aislados, lo que sugiere que diferentes cepas pueden tener diferentes potenciales abortivos. A partir de estos hallazgos decidimos realizar un análisis comparativo más profundo de la diversidad genética de cepas, pero ahora a nivel global, y determinamos que *N. caninum* presenta una importante complejidad genética, exhibiendo al menos seis *clusters* o grupos de tipificación. Finalmente, la secuenciación completa del genoma usando la tecnología PacBio reveló un ensamblaje impreciso del genoma de referencia de *N. caninum*, lo que nos llevó a re ensamblar y anotar este genoma.

Financiación: FSSA_X_2014_1_106026 ANII-INIA.

¹ Institut Pasteur de Montevideo

² Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, INIA La Estanzuela. Colonia, Uruguay

³ Facultad de Medicina, Universidad de la Republica

robello@pasteur.edu.uy

PREDICCIÓN DEL VALOR DE CRÍA CON UN MODELO CAUSAL Y GAUSSIANO: LA REGRESIÓN ANCESTRAL

Cantet R.

Los modelos predictivos del «valor de cría» (BV) o mérito genético individual comprenden dos manifestaciones de incertidumbre o variabilidad. La primera y natural es resultante de la ausencia de información fenotípica y de individuos emparentados del animal evaluado, y es medida a través de la exactitud de predicción. La segunda fuente de incertidumbre se debe a la incapacidad para identificar estadísticamente al sujeto sobre el que se realiza la predicción: QTLs, marcadores moleculares, o secuencias de ADN. Con el advenimiento de los marcadores moleculares SNP, el énfasis en la información ha girado hacia el uso de modelos predictivos que asumen asociación entre marcadores y supuestas variantes causales de los caracteres bajo selección. Esta incertidumbre no ocurría cuando el modelo identificaba cada individuo, pero el anhelo de modelar efectos de marcadores introduce variabilidad predictiva debida al desconocimiento de la «arquitectura genética» de la variación aditiva, porque la «señal» de un QTL es captada por más de un marcador.

En esta presentación se describen las propiedades de un *modelo predictivo individual* recientemente desarrollado, empleando una dinámica *causal* del BV entre generaciones: la «regresión ancestral» (AR). En AR se «regresa» el BV del individuo hacia los BV de padres y abuelos, reduciendo la varianza del residuo Mendeliano. El modelo incluye dos parámetros adicionales por animal que reflejan la recombinación de los genomas de cada pareja de abuelos, e indican el parecido adicional de un abuelo o abuela por encima de 0.25. AR es Markoviano y sencillo de ajustar a millones de BV animales porque no requiere la inversión directa de la matriz de covarianzas entre los BV.

Palabras clave: valor de cría, regresión ancestral

GENOMICS TO SELECT BRAZILIAN BEEF CATTLE FOR TICK RESISTANCE AND OTHER ECONOMIC TRAITS

Cardoso F.F.^{1,2}, Campos G. S.², Gullias-Gomes C. C.¹, Sollero B. P.¹, Caetano A. R.³;

Tropical and subtropical areas have great potential to help supply increasing demands for livestock products, as cattle and other ruminants can convert fast-growing tropical grasses into high-quality protein for human consumption. Nevertheless, the sustainability of beef production systems requires the use of livestock that are both highly productive and adapted to tropical environments. Work to apply genomic tools to enhance taurine beef cattle productivity and tropical adaptation is underway in Brazil. Brazilian Angus, Braford, Brangus and Hereford cattle herds have been systematically measured for key phenotypes related to parasite resistance: tick counts; heat tolerance: eye pigmentation, hair coat at weaning and at yearling; growth: birth, weaning and longyearling weights, and post-weaning gain; and reproduction: scrotal circumference. Phenotypes and historical pedigree data animals were combined with SNP genotypes using different methods (single and multi-step) to derive prediction equations for genomic selection. Genomic predictions were demonstrated to increase genetic gain up to 93% when compared to traditional pedigree-based predictions. Moreover, genome-wide association studies detected chromosome segments that explain up to 5% of the trait genetic variability, providing candidate regions for fine mapping. Low-density marker panels based on informative tag-SNP identified within these regions, retain about 70% of the accuracy from the full panel, and represent alternatives for lower cost predictions. Finally, selection indexes have been derived for optimizing the selection of animals combining a desirable balance of economically relevant traits.

¹Embrapa Pecuária Sul, Bagé, RS, Brazil

²Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

³Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brazil

fernando.cardoso@embrapa.br

¿CÓMO AUMENTAR LA RESISTENCIA GENÉTICA A PARÁSITOS GASTROINTESTINALES EN OVINOS? LA ESTRATEGIA DE URUGUAY

Ciappesoni, C.G.

Los parásitos gastrointestinales (PGI) generan mundialmente numerosas pérdidas productivas y económicas en la producción ovina, no escapando Uruguay a esta problemática. Es por esta razón que los productores comerciales y cabañeros (vendedores de genética) sitúan a la resistencia genética a PGI como una de las características prioritarias que debería tenerse en cuenta en las evaluaciones genéticas que realizan el Secretariado Uruguayo de la Lana (SUL) y el INIA. En 1994, se definen los protocolos y se comienza con las evaluaciones poblacionales de las razas Merino y Corriedale utilizándose como criterio de selección el recuento de huevos por gramo de materia fecal (HPG), con un enfoque de control integrado de parásitos. Sin embargo, al ser una característica dificultosa de registrar se han seguido diferentes estrategias para potenciar la mejora genética de la resistencia: 1) Apoyo para la toma de registros por medio de proyectos (en el pasado con Merino, en el presente Corriedale y Merilin). 2) Búsqueda de nuevos criterios de selección más sencillos o complementarios (estudios de test de sangre oculta en heces, FAMACHA©, hematocrito, condición corporal) o que puedan simplificar el protocolo. 3) Generación de núcleos de selección por resistencia (SUL, Corriedale; Facultad de Agronomía, Merino). 4) Desarrollo de herramientas moleculares (comenzando con microsátélites y llegando al desarrollo de evaluaciones genómicas en la actualidad). Gracias a este trabajo multinstitucional y multidisciplinario se ha podido: estimar parámetros genéticos (heredabilidades de HPG y su correlación con características productivas), diseñar paneles de SNP de baja densidad, realizar estudios de asociación y de expresión génica, lograr importantes progresos genéticos a nivel experimental y comercial, redundado en un beneficio económico para los productores.

ESTRUCTURA GEOGRÁFICA DE LA MOSCA DE LA BICHERA EN AMÉRICA DEL SUR: IMPLICANCIA PARA LAS ESTRATEGIAS DE MANEJO DE LA ESPECIE

Fresia P.

La mosca de la bichera, *Cochliomyia hominivorax*, es un ectoparasito obligatorio que causa miasis en los vertebrados de sangre caliente. La miasis es la infestación de heridas o mucosas del hospedero por larvas de dípteros que se alimentan de sus tejidos vivos. *C. hominivorax* tiene una alta prevalencia en ovinos, bovinos y suinos ocasionando cuantiosas pérdidas económicas, pero también ha sido reportada en humanos, animales de compañía y silvestres cuya incidencia se desconoce. El ciclo de vida presenta metamorfosis completa, que a 22 °C promedio es de ~24 días. La temperatura es un determinante fundamental del ciclo de vida y distribución de la especie, ya que no sobrevive a temperaturas promedio inferiores a 9 °C durante tres meses o inferiores a 12 °C durante cinco meses seguidos. Originalmente, *C. hominivorax* habitaba desde el sur de Estados Unidos hasta la región central de Argentina, incluyendo el Caribe. Un programa de control basado en la Técnica del Insecto Estéril, realizado entre 1957 y 2000, erradicó *C. hominivorax* de América del Norte y Central. Actualmente, *C. hominivorax* esta presente en América del Sur y el Caribe. El análisis de la variabilidad genética del genoma mitocondrial de la especie reveló cuatro grupos, denominados CG (Cuba), DRG (República Dominicana), NAG (Jamaica, Trinidad y Tobago, Colombia, Ecuador y Venezuela) y SAG (Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay). Cada grupo puede ser considerado una unidad-de-manejo, donde un programa de control podría aplicarse independientemente. En América del Sur, los grupos NAG y SAG no comparten haplotipos mitocondriales y están estructurados genéticamente, y se estimó que la separación debió ocurrir durante la última glaciación. Se cree que la separación actual de estos grupos (NAG y SAG) se mantiene debido a una barrera ubicada al norte de la Cuenca Amazónica. Sin embargo, no se ha establecido si es una barrera geográfica, temporal o climática.

LOS MARCADORES MOLECULARES Y LA BIOTECNOLOGÍA APLICADA PARA LA CONSERVACIÓN DE LOS CÉRVIDOS EN LATINOAMÉRICA

González S.

En Latinoamérica son reconocidas 17 especies de cérvidos que se encuentran agrupadas en seis géneros: *Blastocerus*, *Hippocamelus*, *Mazama*, *Odocoileus*, *Ozotoceros*, y *Pudu*. Empleando marcadores mitocondriales el análisis filogenético muestra que existieron dos momentos claves en la historia evolutiva de los ciervos Neotropicales, uno que agrupa las especies cuyo ancestro ingresó hace 5 MYA y el otro que se estima ocurrió hace 2 MYA. Hemos desarrollado un juego de cebadores que amplifican regiones informativas del ADN mitocondrial que nos permiten discriminar entre especies y analizar la variabilidad intraespecífica. El estado de conservación fue evaluado en las listas rojas (Red List™-IUCN), mostrando que 10 especies se encuentran con alguna categoría de amenazada, 3 con datos deficientes y sólo 4 tienen bajo riesgo. A medida que logremos incorporar un muestreo más detallado de las especies crípticas podremos definir los patrones de distribución geográfica de los taxa. Con el aporte de datos genéticos y biogeográficos se espera resolver los inciertos taxonómicos y se podrá actualizar la evaluación del estado de conservación de las especies en los ecosistemas latinoamericanos.

EL GENOMA DE LA ALPACA (*VICUGNA PACOS*)

Gutiérrez Reynoso, G.¹ , Ponce de León A.F. ²

La crianza de alpaca es una actividad económica importante para los pobladores de las regiones alto andinas y para la industria textil que transforma la fibra. Se ha reportado un mapa citogenético con 230 marcadores moleculares que cubren los 37 pares de cromosomas de la alpaca (Ávila et al., 2015). Estudios recientes han localizado 6 genes relacionados con el crecimiento y 5 genes relacionados con el color de la fibra (Mendoza et al. 2019). Se cuenta con información de un genoma de referencia VicPac 3.1 ensamblado a nivel de cromosomas con una cobertura 260X (Richardson et al., 2019). Pruebas de paternidad basadas en el uso de marcadores microsatélites han sido validadas (Rodríguez et al. 2004; Agapito et al., 2008, Morón et al., 2015). Algunos estudios han reportado asociación significativa entre marcadores moleculares y fenotipos en alpacas (Gurundi et al., 2011, Jackling et al., 2012, Paredes et al 2014, Chandramohan et al., 2015, Jones et al., 2019). Nuestro objetivo es construir una micromatriz de 50,000 polimorfismos de nucleótido simple (PNS) para aplicar técnicas modernas de mejoramiento genético en alpacas. Nuestros estudios preliminares han identificado 400 (PNS) en alpacas (More et al., 2019) y 33 grupos ligados de 210 PNS de bovinos con señal positiva en alpacas (Mamani, 2018). Recientemente, secuenciando 300 bibliotecas reducidas de ADN obtuvimos > 4.5 millones de PNSs. La construcción de la micromatriz de PNSs y un estudio de asociación entre PNSs y finura de fibra se encuentran en progreso.

Palabra claves: alpaca, genoma, polimorfismos de nucleótido simple

¹ Profesor Principal, Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú

² Profesor Emérito, University of Minnesota, USA

SEROPREVALENCIA DE LA NEOSPOROSIS BOVINA EN EL URUGUAY: SITUACIÓN ACTUAL

Macchi MV, Fernández F, Suanes A, Salaberry X, Piaggio J, Gil A.

La Neosporosis bovina es una enfermedad de distribución mundial, siendo responsable de grandes pérdidas económicas en ganado bovino, dado que es una de las causas más importantes de aborto. El objetivo de este trabajo fue actualizar los datos de seroprevalencia de *Neospora caninum* en los predios bovinos ganaderos y lecheros del Uruguay, tanto a nivel individual como predial. Para esto se realizó un estudio transversal en 598 predios bovinos en el segundo semestre del año 2015. Se realizó un muestreo aleatorio estratificado a nivel de establecimientos según el tamaño de la población bovina, siendo muestreadas hasta 60 vacas adultas por establecimiento en caso de predios lecheros y hasta 20 vacas adultas en caso de predios ganaderos. La serología se determinó por medio de la prueba ELISA indirecto (ID Vet, Grabels, Francia), bajo las recomendaciones del fabricante. En los sistemas lecheros, la seroprevalencia aparente estimada proyectada a la población de bovinos en función del diseño fue de $22,3 \pm 1,8$ % (intervalo de confianza (IC) 95%, 18,7-25,9 %), con una prevalencia a nivel predial de $96,0 \pm 1,9$ % (IC 95%, 92,1-99,8%). En sistemas ganaderos, la seroprevalencia aparente estimada proyectada a la población de bovinos en función del diseño fue de $14,3 \pm 0,7$ % (intervalo de confianza (IC) 95%, 12,9-15,6 %), con una prevalencia a nivel predial de $86,5 \pm 2,9$ % (IC 95%, 80,8-92,2%). Con este estudio se concluyó que, si bien la seroprevalencia individual se ha mantenido estable con los años, hay una alta difusión del agente en los rebaños del país. Estos datos podrán ser utilizados para identificar posibles factores de riesgo o protección asociados a altas seroprevalencias en nuestras condiciones productivas, de forma de colaborar en el diseño de nuevas medidas para el control.

REVISITANDO LOS GENOMAS DE *NEOSPORA CANINUM* Y *TOXOPLASMA GONDII*

Berná L.¹, Márquez P.¹, Cabrera A.¹, Greif G.¹, Francia M.E.^{2,3}, Robello C.^{1,4}

Neospora caninum es un parásito unicelular eucariota perteneciente al filo Apicomplexa. Es en bovinos la principal causa de abortos espontáneos, resultando en importantes pérdidas económicas anuales para la industria agropecuaria.

Recientemente se obtuvieron los primeros aislados de *N. caninum* en Uruguay, de distintos establecimientos lecheros de los departamentos Colonia, Soriano y Durazno.

N. caninum comparte muchas características morfológicas con *Toxoplasma gondii*, organismo modelo del filo Apicomplexa, lo que llevó a su tardía identificación en 1988. Se cree que estas dos especies comparten gran cantidad de genes, siendo una pequeña parte de sus genomas la responsable de las diferencias fenotípicas, incluyendo los huéspedes que pueden infectar.

En 2012 Reid y colaboradores publicaron el genoma *N. caninum* (cepa Liverpool) con reads sanger, usando como referencia el genoma de *Toxoplasma gondii* para su ensamblaje, mostrando que sus genomas son muy similares, con gran cantidad de genes y sintenia conservados. Sin embargo, partieron de la hipótesis de que el orden génico, observado en experimentos previos, se mantenía a nivel cromosómico.

Recientemente, realizamos la secuenciación de la misma cepa de *N. caninum*, utilizando tecnologías de tercera generación. Estas producen reads mucho más largos, que facilitan y permiten el ensamblado completo de novo. Encontramos que existen grandes rearrreglos cromosómicos entre las dos especies, que contradicen la idea de un orden sinténico conservado a nivel cromosómico. Además pudimos identificar nuevas regiones que no habían sido secuenciadas previamente, mejorar la anotación génica y determinar que el número total de cromosomas no es 14 sino 13, dado que dos cromosomas (VIIb y VIII) son en realidad uno solo.

¹ Laboratorio de Interacciones Hospedero Patógeno / Unidad de Biología Molecular. Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay

² Laboratorio de Biología de Apicomplejos, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay

³ Departamento de Parasitología y Micología. Facultad de Medicina-Universidad de la República, Uruguay

⁴ Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina-Universidad de la República, Uruguay

CRISPR: APLICACIONES PARA LA GANADERÍA MODERNA

Menchaca A.

La generación de animales mediante la edición del genoma es la revolución actual de la biología moderna. El sistema CRISPR-Cas permite cortar y pegar secuencias muy precisas de ADN como nunca antes se había logrado. Así podemos mejorar prácticamente todas aquellas características que estén determinadas por un gen, y entonces modificar de manera precisa el fenotipo de cualquier especie. Sin embargo, si bien esta tecnología comienza a estar disponible en animales de producción, el camino desde la edición génica hasta el logro de los animales deseados no siempre conduce a un éxito fácil, rápido y seguro. Cuando se aplica en grandes animales, CRISPR requiere de proyectos que consumen tiempo y costos considerables. Las dificultades no solo radican en diseñar una estrategia acertada para la edición del genoma, sino también para la producción de los embriones, la microinyección de los cigotos, y la criopreservación y transferencia de los embriones editados. Recientemente se han logrado avances importantes en todas estas técnicas, de tal manera que el desafío ya no será técnico. Mejoras en la producción de carne, leche y lana, animales resistentes a ciertas enfermedades jamás resueltas, erradicación de pestes generadas por moscas, mosquitos o garrapatas, son solo algunas de los avances que se están logrando con la tecnología CRISPR. Frente a una creciente demanda de alimentos, la intensificación productiva junto a la sustentabilidad, la necesidad de preservar el medio ambiente, los riesgos en salud y el compromiso con el bienestar animal, han sido considerados como la tormenta perfecta de efectos globales y representan el mayor desafío de nuestra especie. Nuevas oportunidades y amenazas, controversias y consensos, beneficios y riesgos, ética y ciencia, deberán ser revisados para entrar al nuevo futuro CRISPR.

INOCUIDAD DE CARNES: PASADO, PRESENTE, FUTURO

Rovira P.

Para un país agroexportador como Uruguay, la inocuidad alimentaria es doblemente importante. Además de asegurar la salud de los consumidores, debe satisfacer los requerimientos internacionales de los distintos mercados. Adicionalmente, el concepto de inocuidad se ha ampliado incluyendo no solo al producto final, sino también al proceso de producción y su impacto sobre el medio ambiente. Ejemplo de ello son las restricciones en el uso de antibióticos en animales, tanto desde el punto de vista del potencial residuo en carne como de la generación de bacterias resistentes que pueden ser diseminadas ambientalmente.

La evolución de la investigación en inocuidad ha sido dinámica, en donde el punto de partida fue la confianza entre los actores involucrados (productores, industria, investigación, gobierno). En los últimos años se incrementaron los fondos para investigación estimulando la interacción entre instituciones públicas y privadas, reflejando la demanda de información en aspectos tales como la prevalencia de patógenos a lo largo de la cadena cárnica y la validación de intervenciones antimicrobianas. Cualquiera sea el sistema de producción, debe prevalecer el enfoque preventivo, integrado (cadena cárnica), y basado en ciencia para disminuir la ocurrencia de peligros microbiológicos y químicos.

Desde el punto de vista analítico, tradicionalmente serogrupos específicos han sido considerados como adulterantes en carnes (ej. *Escherichia coli* O157:H7). Actualmente, y ayudado por tecnologías de secuenciamiento de ADN bacteriano, cobra más importancia la combinación de genes asociados a virulencia, patogenicidad y resistencia a antibióticos, que la cepa específica en donde se encuentran. En este sentido, plataformas moleculares que permitan el secuenciado de cepas («Whole Genome Sequencing») y el estudio de genes en comunidades bacteriana (metagenómica «shotgun») deben ser integradas al enfoque microbiológico tradicional. Relacionado con peligros químicos, el incremento de sensibilidad de las técnicas analíticas genera estándares más estrictos para los residuos en carne.

BIOTECNOLOGÍA ANIMAL

PRESENTACIÓN DE POSTERS

CARACTERIZACIÓN DE LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE BOVINOS CRIOLLO URUGUAYO

Aragunde R.¹, Fila D.¹, Boggio Devincenzi J.C.¹, Armstrong E.², Llambí S.²

Con el fin de generar un banco de germoplasma para Bovinos Criollo Uruguayo se comparó la respuesta a la criopreservación de semen frente a un protocolo de congelación, con dos diluyentes comerciales utilizados en razas bovinas de carne y leche. La extracción de semen se realizó mediante electroeyaculación (PulsatorIV, Lane Manufacturing Inc., Colorado, USA). El semen fue analizado con microscopio óptico a campo y aprobado para ser sometido a un protocolo de dilución, refrigeración y congelación con dos diluyentes: Grupo A AndroMed® (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany) y Grupo T Triladyl (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany). Se descongeló en baño maría a 37° un minuto una muestra de cada diluyente de 8 toros y se analizó motilidad en microscopio óptico (Nikon Optiphot, Tokio, Japan) sobre platina térmica a 37°. El análisis estadístico se realizó con el Test de Chi-cuadrado (GraphPad Prism 5, GraphPad Software, Inc.). No hubo diferencias ($P=0,94$) en la motilidad al descongelado entre grupos. La motilidad fue: toro 850 Diluyente A 40% Diluyente T 40%, toro 853 Diluyente A 50% Diluyente T 50%, toro 1026 Diluyente A 65% Diluyente T 65%, toro 1035 Diluyente A 10% Diluyente T 10%, toro 3733 Diluyente A 30% Diluyente T 40%, toro 5834 Diluyente A 50% Diluyente T 50%, toro 9701 Diluyente A 50% Diluyente T 50%, toro 9714 Diluyente A 30% Diluyente T 40%. Los resultados obtenidos concuerdan con la información existente con estos mismos diluyentes en toros de razas comerciales. La información obtenida es de relevancia a la hora de preservar razas amenazadas por el bajo número de reproductores con potencial productivo en vías de conocimiento. Estos datos dan continuidad al banco de germoplasma y abren puertas a distintas biotecnologías de la reproducción en esta raza incluyendo la inseminación artificial para aumentar el número de individuos puros.

¹Departamento de Reproducción Animal, Facultad de Veterinaria, Udelar, Uruguay

²Departamento de Genética y Mejora Animal, Facultad de Veterinaria, Udelar, Uruguay

CARACTERIZACIÓN REPRODUCTIVA, CENSAL Y GENERACIÓN DE UN BANCO DE GERMOPLASMA DE CERDO PAMPA ROCHA Y BOVINO CRIOLLO URUGUAYO

Armstrong E.¹, Fila D.², Carballo C.³, Aragunde R.², Boggio Devincenzi J.C.², Vodanovich A.³, Espino N.³, Evia G.⁴, Mérola G.⁴, Castro G.⁵, Barlocco N.³, Llambi S¹

En el marco de la conservación de los recursos zoogenéticos, se realizó la caracterización reproductiva, se censaron las poblaciones conocidas y se comenzó a generar un banco de semen congelado para bovinos Criollo Uruguayo y cerdos Pampa Rocha, dos razas locales de gran importancia productiva potencial. Se relevaron siete establecimientos de cerdos Pampa Rocha (N total=61 animales) y dos de bovinos Criollo Uruguayo (N total=661 animales), en distintos puntos del país. La extracción de semen de toros Criollo Uruguayo se hizo con electroeyaculador en cepo, de la mayoría de los toros adultos y jóvenes (12 animales) de la reserva del Parque Nacional San Miguel (Rocha). La calidad del semen fresco fue de muy buena a excelente. Se congeló una media de 160 pajuelas por toro, existiendo actualmente en total 2055 pajuelas en el banco de semen de la raza, aptas para inseminación artificial. Además se realizaron ecografías transrectales a 114 vacas de cría para diagnóstico de gestación 60 días después de culminado el entore de 2019, habiéndose detectado un 59% de preñez. Para los cerdos Pampa Rocha se acondicionó una verraquera para la colecta de semen en el Centro Regional Sur de Facultad de Agronomía (CRS- Progreso). Dificultades en la extracción y la congelación del semen de cerdos hicieron que al día de hoy no se hayan podido incluir muestras en el banco de semen, pero se continuarán las acciones tendientes a lograrlo, probando diferentes protocolos de congelación. Un Banco de Germoplasma de razas amenazadas es imprescindible para el manejo a largo plazo y conservación de estos recursos. Se prevé expandirlo a futuro con más pajuelas de semen y otros tipos de muestras criopreservadas (ovocitos y embriones). Es necesario continuar con el estudio de estas razas locales poco conocidas, profundizando en características reproductivas específicas y evaluación productiva.

¹Departamento de Genética y Mejora Animal, Facultad de Veterinaria, Udelar, Uruguay

²Departamento de Reproducción Animal, Facultad de Veterinaria, Udelar, Uruguay

³Departamento de Producción Animal y Pasturas, Facultad de Agronomía, Udelar, Uruguay

⁴Programa de Conservación de la Biodiversidad y Desarrollo Sustentable en los Humedales del Este, Uruguay

⁵Departamento de Suinos y Animales de Granja, Facultad de Veterinaria, Udelar, Uruguay

silvia.llambi@gmail.com

IMPLEMENTACIÓN DE *REAL TIME* PCR-HRM PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL ALELO MUTANTE DE CVM EN BOVINOS HOLANDO

Branda Sica A.¹, Nicolini P.², Federici M.T.¹, Llambí S.³

La malformación vertebral compleja (CVM, OMIA 001340-9913) es una enfermedad autosómica recesiva que causa abortos y problemas perinatales en bovinos de la raza Holando. El objetivo de este estudio fue optimizar e implementar un *screening* molecular confiable y económico para la detección del alelo mutante (T) de CVM (c.559G>T; *SLC35A3*) mediante el análisis de curvas de disociación de alta resolución (HRM); así como analizar su presencia en una muestra representativa de 279 vacas Holando, pertenecientes a 6 tambos comerciales de diferentes regiones de Uruguay. La amplificación de los productos PCR de 79 pb se realizó en el equipo *RotorGene™ 6000* (Corbett Life Science, Australia) con un par de *primers* descritos por ZhiLing *et al.* (2015). Las reacciones de PCR en tiempo real fueron llevadas a cabo sobre un volumen final de 25 ml conteniendo: 50 ng de ADN genómico, 1X *HRM-PCR Master Mix* (kit *Type-it® HRM-PCR*, QIAGEN, Hilden, Alemania) y 0.7 mM de cada primer. El programa de ciclado consistió en una desnaturalización inicial de 10 min a 95 °C; 40 ciclos de: 5s a 95 °C, 25s a 60 °C y 20s a 72 °C; dos *holds* de 10s a 95 °C y 1 min a 45 °C, respectivamente; y la fase de HRM con incrementos de 2s a 0,1 °C, entre 74,5 y 84,5 °C. El análisis HRM permitió diferenciar claramente los dos genotipos: homocigota, tipo silvestre (GG), y heterocigota (GT), portadora para la mutación de CVM. La frecuencia del alelo mutante (T) para CVM fue alta (0.032), con una prevalencia de vacas portadoras de 6.45%. Se concluye que el análisis PCR-HRM es una técnica rápida, fácilmente interpretable, de bajo costo y altamente precisa para la detección de esta mutación en bovinos Holando, la cual podría ser implementada en programas de selección genética.

Fuente de financiamiento: Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII, POS_NAC_2017_1_141239).

¹Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Unidad de Biotecnología, Estación Experimental INIA Las Brujas. Canelones, Uruguay

²Universidad de la República, Centro Universitario de Tacuarembó, Instituto Superior de la Carne, Área Biología Molecular, Tacuarembó, Uruguay

³Universidad de La República. Facultad de Veterinaria, Área Genética, Montevideo, Uruguay
abranda@inia.org.uy

BANCO DE ADN GENÓMICO ANIMAL – PLATAFORMA EN SELECCIÓN GENÓMICA ANIMAL

Carracelas, B.*, Peraza, P., Vergara, A., Dalla Rizza, M., Ciappesoni, C.G., Navajas, E.A

El Banco de ADN Genómico Animal fue creado como iniciativa conjunta entre el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) y la Asociación Rural del Uruguay (ARU) en el año 2010, siendo responsable de la conservación y gestión del material genético de la pecuaria nacional. Está ubicado en la estación experimental de INIA Las Brujas, dentro de la Unidad de Biotecnología.

Forman parte del Banco de ADN casi 40 mil muestras (23.000 de ovinos y 17.000 de bovinos) provenientes de diferentes poblaciones animales que cuentan con información productiva y genética asociada. La conservación de este material genético ha contribuido al desarrollo de la selección genómica, que permite acelerar el progreso genético e incorporar a las evaluaciones genéticas poblacionales nuevas características de difícil medición. Actualmente hay varios proyectos en curso, como los estudios de asociación en eficiencia de conversión de alimento en la raza Hereford del Uruguay y el uso de herramientas genómicas aplicadas a la resistencia genética a los parásitos gastrointestinales en las razas Corriedale y Merino. En los últimos años, se ha incorporado también la conservación de otros materiales biológicos (hígado y rumen) con el fin de complementar estos trabajos con estudios de expresión génica y metagenómica.

El Banco de ADN Genómico Animal se ha consolidado como una plataforma público-privada relevante para la investigación genómica animal nacional, en coordinación con los actores involucrados en la construcción de núcleos informativos y poblaciones de referencia e implementación de las evaluaciones genéticas.

IDENTIFICACIÓN DE BOVINOS HOLANDO PORTADORES DE MUTACIONES ASOCIADAS AL SÍNDROME DE SINDACTILIA UTILIZANDO EL PANEL ARBOS1

Federici M.T.¹, Branda Sica A.¹, Artigas R.², Nicolini P.³, Rogberg A.^{4,5}, Giovambattista G.⁴, Llambí S.²

El síndrome de sindactilia (SY) conocido como pie de mula (OMIA 0009613-9913) es una enfermedad autosómica recesiva que aparece en diferentes razas bovinas y se caracteriza por una malformación de las partes distales de una o más extremidades con una fusión completa o parcial de las falanges. Algunos autores sugieren que la alta frecuencia de SY encontrada en la raza Holando puede deberse a una selección artificial a favor de las hembras heterocigotas que producen mayor cantidad de leche y sólidos grasos que las hembras homocigotas sanas. En Uruguay se reportó una frecuencia del alelo recesivo de 0,02 en terneros neonatos de tambos de la cuenca lechera del suroeste. En Holando se han identificado variantes (SNP) asociadas a SY en el exón 33 del gen LRP4 (BTA 15), que codifica para un receptor de lipoproteínas de baja densidad relacionado con la morfogénesis ósea. El objetivo de este trabajo fue realizar un monitoreo preliminar de 2 de estos SNP asociados a sindactilia (rs109636878; G>A y rs438564602; C>T) en una población de referencia de 32 vacas Holando utilizando el panel 50K ArBos1 (IGEVET, Argentina). Los resultados obtenidos fueron comparados con los valores de prevalencia en bovinos Holando de países de la región tales como Argentina y Brasil. Para el SNP rs109636878 se detectaron 3 vacas heterocigotas portadoras para la mutación (GA) y 29 homocigotas sanas (AA); mientras que para el rs438564602 no se detectaron vacas portadoras, coincidiendo con los resultados obtenidos en la región. Estos datos muestran la utilidad de las plataformas moleculares tales como ArBos1 u otras como herramientas de monitoreo para la detección de mutaciones asociadas a SY. Esta información puede ser considerada en las estrategias de manejo para el control de la segregación de dichos alelos en las poblaciones de bovinos Holando de Uruguay.

¹Unidad de Biotecnología, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, INIA Las Brujas, Uruguay.

²Área Genética, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay.

³PDU Instituto Superior de la Carne, Centro Universitario de Tacuarembó- UdelaR, Uruguay.

⁴IGEVET (Instituto de Genética Veterinaria, CONICET - Universidad Nacional de la Plata), La Plata, Argentina.

⁵ Producción Animal, Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires, Argentina

*E-mail: mfederici@inia.org.uy

FERTILIDAD IN VITRO DE SEMEN DE BOVINOS CRIOLLO URUGUAYO CONGELADO EN DOS DILUYENTES COMERCIALES

Filipiak Y., Fila D.E., Aragunde R., Armstrong E.M., Boggio Devincenzi J.C., Larocca C.E., Martínez M.S., Álvarez V., Pereira J.M., Vila F., Llambí M.S.*

En la Facultad de Veterinaria existe un banco de semen (Proyecto I+D, 2016, con más de 800 pajuelas), de la única reserva de bovinos Criollo Uruguayo (BCU). Se presentan resultados preliminares del estudio cuyo objetivo es evaluar la fertilidad in vitro de semen de cuatro toros congelado en dos diluyentes. 122 complejos cúmulus ovocitos (COC), clase A, obtenidos de folículos de 2-8mm de ovarios bovinos con menos de 5h de faenados, con aguja 18G, en buffer fosfato salino, con 5% de suero fetal bovino (SFb). Se maduraron en TCM-199 con 5% SFb y hormonas, en gotas de 100 μ l, 10-15 COC/gota, cubiertos con aceite mineral, en incubadora (38°C, 5% CO₂, 90-95% humedad), durante 22h. 8 grupos de COC fueron inseminados con semen de cuatro toros congelado en dos diluyentes: 1026-Andromed; 1026-Triladyl; 3733-Andromed; 3733-Triladyl; 5834-Andromed; 5834-Triladyl; 9701-Andromed y 9701-Triladyl. El semen se capacitó y seleccionó por gradientes de Percoll® en Talp-Sperm, centrifugando a 800G, 20m. Aspiramos el sobrenadante, al pellet le agregamos Talp-Sperm y centrifugamos durante 5m (500G), se ajustó a 2x10⁶ spz/ml con Talp-Fert. Formamos gotas, cubiertas con aceite mineral y las cocultivamos con los COC, 5h. Luego se lavaron y desnudaron con vortex y se cultivaron en SOF. Realizamos el clivaje a las 48h y evaluamos el desarrollo embrionario (DE) al día 7, de acuerdo a las normas de la IETS. El promedio del clivaje fue de 62.17% y 39.11% el DE, acorde a lo esperado. Se realizó análisis de frecuencias por el Test Exacto de Fisher con significación de 5%. No encontramos diferencias significativas entre el semen de los distintos toros, en clivaje ($p=0.32$), ni DE ($p=0.58$). Tampoco entre los diluyentes, en clivaje ($p=0.63$), ni DE ($p=0.59$). Este trabajo es importante para conocer la calidad y fertilidad espermática del semen de raza BCU del banco.

EFFECTO DE LA INCLUSIÓN DE ORUJO DE UVA EN LA DIETA DE CORDEROS SOBRE LA FERMENTACIÓN RUMINAL IN VITRO Y LA PRODUCCIÓN DE METANO

Lopez F.¹, Fernández-Yepes J. E.², Molina-Alcaide E²

Las emisiones de gases de efecto invernadero tienen un impacto importante tanto en el cambio climático como en la eficiencia energética de la producción de rumiantes (Gerber et al., 2013). Existe un interés creciente en desarrollar estrategias alimentarias para reducir la producción de metano. El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de la inclusión del orujo de uva en la dieta sobre la fermentación ruminal *in vitro* de corderos. Muestras de una dieta constituida por paja de cereal y concentrado para cebo (dieta PC) y de otra, constituida por paja y un concentrado que incluía un 7% de orujo de uva, se incubaron durante 24 h en cultivos no renovados de microorganismos ruminales inoculados con líquido ruminal procedente de corderos de raza merina adaptados al consumo de esas mismas dietas. No se observaron diferencias ($P > 0.05$) en el pH y la producción de ácidos grasos volátiles (AGV) entre ambas dietas. Sin embargo, con la dieta PCU se obtuvieron valores superiores ($P < 0.001$) de amonio (mg/100 mL) y menores de metano (mL/g materia seca incubada) que con la dieta PC. En ensayos *in vivo* con estas mismas dietas (López et al.) se observó, por el contrario, que la producción de metano fue mayor en corderos alimentados con la dieta PCU que con la dieta PC.

¹Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX), Badajoz, España

²Estación experimental del Zaidin (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), Granada, España

Autor que presentará el trabajo en el evento: Fermin López (fermin.lopez@juntaex.es)

METAGENOMIC APPROACH TO ASSIST ANIMAL GENETIC IMPROVEMENT PROGRAMS IN REDUCING METHANE EMISSIONS AND IMPROVING FEED EFFICIENCY FROM BEEF CATTLE

Navarro M.^{1*}, Navajas E. A.¹

Beef meat is one of the products with the highest intensity of greenhouse gas emissions in livestock production chains. Emissions are mainly in the form of methane (CH₄) produced by enteric fermentation. This process is carried out by the symbiotic ruminal microbiota and causes a loss of energy for the host which may decrease the feed efficiency (FE). There are numerous related studies that investigate the relationships between the rumen microbiome and diverse expressed phenotypes of ruminants. Ross et al. (2013) support that a metagenomic approach could be a powerful tool that may surpass prediction accuracies based only on host genome, and there are confirmed by Roehe et al. (2016); Wallace et al. (2017), Delgado et al. (2019), and so on. Metagenomic studies allow profiling the microbial community of a sample and infer gene functions of those species found to determine associations to studied traits. The current research defines a guideline to perform untargeted metagenomics sequencing studies with the objective of determine genetic markers associated with CH₄ emissions and FE. In order to accomplish this, we sampled ruminal contents of two groups of Hereford steers (n = 36) selected based on their high and low efficiency. Samples were frozen at -80 °C, freeze dried and stored until the time of DNA isolation and complete sequencing. At this moment, metadata information of each sample was recorded in a database and once multiple nucleotide sequences are obtained, we will perform the bioinformatic processing and statistical analysis following the present guideline. This work will be significant in animal genetic improvement programs for future selection of superior cattle using genomic information to predict phenotypes that are complex and expensive to measure, as well as contribute to the mitigation of CH₄ emissions while improving FE.

¹Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Unidad de Biotecnología, Estación Experimental INIA Las Brujas. Canelones, Uruguay

*mnavarro@inia.org.uy

RECOMENDAÇÃO DE ACASALAMENTOS BASEADA EM ALGORITMOS GENÉTICOS PARA OTIMIZAÇÃO DE MODELOS BIOECONÔMICOS

Parteli A.G.¹, Da Silva S.C.², Techera B.E.M.³, Yokoo M⁴

Programas de melhoramento animal apresentam uma deficiência na caracterização de índices de seleção, isto é, faltam incorporar outros critérios que representem por exemplo o retorno econômico do sistema de produção [8]. Este estudo tem como objetivo maximizar a seleção de acasalamentos da raça Brangus com base nos valores bioeconômicos armazenados em um banco de dados do programa de melhoramento genético Pampaplus administrado pela Embrapa Pecuária-Sul localizada na cidade de Bagé-RS. As características consideradas como critérios de seleção são: rendimento de carcaça (RC), taxa de prenhez (TP), peso da carcaça quente (PCQ), peso ao abate (PA), peso da vaca adulta (PVA), contagem de helmintos (OPG), contagem de carrapatos (TICK), taxa de mortalidade (TM) e consumo de matéria seca (CMS). Dado a variedade de combinações possíveis entre as características citadas é inviável realizá-lo em tempo polinomial, para isto, faz-se necessário aplicar técnicas de heurísticas para sua solução. Estas técnicas buscam a otimização da melhor solução para um dado problema, repetindo o processo entre várias soluções de forma a encontrar o melhor caso. Para este tipo de problema são recomendados os Algoritmos Genéticos (AG) [2]. Estes algoritmos são modelos computacionais, inspirados no processo de evolução natural, para soluções de problemas de bioinformática [6]. Neste contexto, a proposta deste trabalho é a aplicação de uma técnica baseada em algoritmos genéticos para criar recomendações de melhores acasalamentos através das características que são de interesse do produtor. Os testes serão realizados em um espaço caracterizado com 200 vacas e 15 touros.

¹Instituto Federal Sul-rio-grandense, Campus Santana do Livramento-RS-Brasil

²Universidade Federal do Pampa, Campus Bagé-RS-Brasil

³Instituto Federal Sul-rio-grandense, Campus Santana do Livramento-RS-Brasil

⁴Embrapa Pecuária-Sul Bagé-RS-Brasil

PANEL PERSONALIZADO DE 507 SNP PARA LA MEJORA GENÉTICA EN OVINOS: APLICACIONES

Peraza, P.^{1*}, Vera, B.¹, Navajas, E.A.¹, Ciappesoni, G¹.

La inclusión de la información genómica en la producción ovina del Uruguay está en su etapa de iniciación. Para este camino, INIA está implementando la utilización de un panel comercial de baja densidad que incorpora un total de 507 marcadores SNP (Single Nucleotide Polymorphism) distribuidos a lo largo del genoma ovino. Estos marcadores fueron incluidos con los objetivos principales de identificar la estructura genética de razas y sus cruzamientos, mantener la trazabilidad de los animales generando correctas asignaciones de parentesco y realizar la asociación de poblaciones ovinas a características de interés comercial y sanitario como lo son la resistencia a parásitos gastrointestinales y la presencia/ausencia de cuernos.

Existen más de 4500 ovinos que han sido genotipados con este panel para las razas Criolla, Merino, Corriedale, Highlander y Texel. Estos 507 marcadores incluidos han permitido identificar correctamente la estructura poblacional para estas 5 razas. Este panel incluye un sub-set de marcadores que se comparten entre diferentes plataformas comerciales actualmente disponibles en el mercado, permitiendo la identificación poblacional para otras 74 razas incluidas dentro del International Sheep Genomic Consortium (ISGC).

Con este panel se ha logrado también una correcta asignación de paternidades, requisito indispensable a incluir en los programas de mejoramiento genético, permitiendo mejorar las estimaciones de los valores de producción. Se ha sido validado en majadas comerciales estimando un error moderado en la asignación de parentesco entre un 6.1% padre-hijo y un 4.4% madre-hijo en 539 y 161 pares respectivamente. Se han realizado estudios de asociación del genoma completo (GWAS), utilizando como población de interés animales pertenecientes a líneas divergentes a la resistencia a parásitos gastrointestinales en la raza Corriedale, demostrando una efectiva asociación de los marcadores seleccionados para esta característica.

Este panel es un producto de desarrollo propio del INIA y se encuentra actualmente disponible sobre la plataforma Affymetrix.

¹ Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Estación Experimental INIA Las Brujas. Canelones, Uruguay

*pperaza@inia.org.uy

ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DEL GENOMA COMPLETO (GWAS) PARA TEMPERAMENTO EN OVINOS DE RAZA MERINO AUSTRALIANO EN URUGUAY

Romaniuk, E.¹, Vera, B.N.², Peraza, P.², Damián, J.P.³, Van Lier, E.¹, Ciappesoni, C.G.²

El ovino en condiciones extensivas debe ser fácil de manejo y eficiente en el uso de los recursos disponibles. El temperamento es el miedo y la reactividad de un animal frente a humanos y ambientes nuevos, extraños o amenazantes. La selección por el tipo calmo, tiene un impacto positivo sobre el desempeño de estos animales. Seleccionar a favor del temperamento calmo, podría mejorar la adaptación del ovino a condiciones extensivas y mejorar su bienestar. El objetivo de este trabajo fue identificar mediante una aproximación GWAS, regiones genómicas que pudieran estar asociadas al temperamento en ovinos de la raza Merino Australiano. El temperamento de los corderos fue caracterizado fenotípicamente con el Test de Cajón de Aislamiento, registrando el score de agitación causado por los movimientos y vocalizaciones del animal. Se estudiaron 323 ovinos provenientes de diferentes cabañas comerciales que han sido genotipados con un panel de 507 SNP, personalizado para la identificación de razas, resistencia a parásitos, cuernos y asignación de parentesco. Usando el programa PLINK v1.9 se realizó el control de calidad de datos ($-maf$ 0.01, $-geno$ 0.15, $-mind$ 0.15) y el estudio de asociación a nivel genómico. Resultaron disponibles para el análisis 438 SNPs distribuidos a lo largo del genoma; se calculó la asociación individual de cada uno de ellos con el temperamento. El total de SNPs estudiados no tuvieron un p-valor significativo ($-\log_{10} < 5$); se observaron asociaciones débiles en el cromosoma 2 y en otros SNPs, que sugieren regiones genómicas de interés. Se plantean nuevos análisis que consideren desarrollar e incorporar la Diferencia Esperada de la Progenie para temperamento en el estudio de asociación, así como genotipar con paneles de mayor densidad que permitan disminuir el sesgo de los marcadores seleccionados y poder estudiar y confirmar las regiones genómicas asociadas a la característica.

¹Dpto. de Producción Animal y Pasturas, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

²Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Estación Experimental INIA Las Brujas. Canelones, Uruguay

³Dpto. de Biología Molecular y Celular, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

* estefaniaromaniuk@hotmail.com

ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES EN DATOS DE GENOTIPADO DE OVINOS URUGUAYOS E INTERNACIONALES

Vera B.^{1*}, Marques C.B.¹, Navajas E.A.¹, Ciappesoni G.¹

El sector ovino ha sido uno de los grandes actores en la historia del desarrollo económico y social del Uruguay, constituyendo un rol fundamental en el aporte de materia prima para las industrias cárnica y lanera. El International Sheep Genomics Consortium es una asociación de científicos e instituciones que tiene como objetivo desarrollar recursos genómicos públicos que puedan proveer información genómica sobre ovinos a nivel mundial. Uno de los logros del consorcio fue la creación de un chip con 50 mil polimorfismos de nucleótido simple (SNP).

En este trabajo se incorpora la información genómica de los ovinos uruguayos a la población del consorcio como una primera aproximación para comparar la variabilidad genética entre las razas del ISGC y las uruguayas.

De los 3137 animales incluidos en el análisis, 2819 corresponden al ISGC y fueron genotipados previamente con el Illumina OvineSNP50v1, los datos están disponibles en la **Web-Interfaced next generation Database dedicated to genetic Diversity Exploration** y los 318 restantes, corresponden a ovinos uruguayos que fueron genotipados con OvineSNP50v2.

Los datos fueron analizados usando el programa PLINK v1.9 (Purcell et al., 2007) y se descartaron datos que no cumplieron los controles de calidad. Después de unificar la información y filtrar los datos, se realizó un análisis de componentes principales (PCA). Teniendo en cuenta la regla de Kaiser se eligieron 2 componentes que representan el 58% de la varianza explicada para el primer componente y un 42% para el segundo.

El PCA permitió identificar y asignar la raza a los animales en estudio. Además, este análisis sugiere una composición genética diferente entre poblaciones, logrando identificar 74 razas pertenecientes al ISGC y 3 razas nacionales. En el caso de los Merinos uruguayos, presentaron una variabilidad genética semejante a las poblaciones australianas y fueron agrupados con las razas con las que comparten ancestría.

¹Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Estación Experimental INIA Las Brujas. Canelones, Uruguay

Presenta: Camila Balconi

*bvera@inia.org.uy

BIOTECNOLOGÍA MICROBIANA

THE RHIZOSPHERE MICROBIOME - KEY FOR PLANT HEALTH AND GROWTH

Babin D.¹, Bziuk N.¹, Yim B.^{1/2}, Etlbany N.¹, Chowdhury S.³, Grosch R.⁴, Winkelmann T.², Vetterlein D.⁵, Smalla K.^{1*}

The rhizosphere microbiome - referring to bacteria, archaea, fungi, and oomycetes is assumed to play a key role in plant health and growth but also for soil properties and various ecosystem services. Recently, we could show the influence of agricultural management on the rhizosphere microbiome of lettuce and barley as well as on plant growth and health via expression studies of plant defence-related genes. Improving plant growth and health by means of soil amendments (organic fertilizer, biofumigation) or inoculants could be further strategies to influence plant growth and health directly or via microbiome and metabolome shifts. A better understanding of the rhizosphere microbiome and its interactions with the soil and plant is, therefore, the key to sustainable plant production and will ensure food safety.

The last decade brought about remarkable methodological progress for rhizosphere microbiome studies through new cultivation-independent methods (DNA/RNA- or microscopy-based analysis) but also in other disciplines of rhizosphere research (e.g. physics, chemistry, hydrology). Despite the enormous progress made in the availability of novel approaches that allow a cultivation-independent study of the rhizosphere microbiome, our present understanding of the factors that modulate the rhizosphere (microbiome, water availability, nutrient cycling, soil properties) is, however, still very fragmented and limited. Therefore a new DFG financed priority program SPP2089 was recently launched aiming at unraveling the spatio-temporal pattern in the rhizosphere that brings together the different aspects, processes and scales of rhizosphere research under a common framework to utilize this knowledge for improving our understanding of the resilience of agricultural soils.

¹Julius Kühn-Institut, Braunschweig

²Leibniz-University, Hannover

³Helmholtz Center Munich; ⁴IGZ, Großbeeren

⁵UFZ, Halle, Germany

kornelia.smalla@julius-kuehn.de

DINÁMICA Y ACTIVIDAD DE COMUNIDADES MICROBIANAS INVOLUCRADAS EN LA EMISIÓN DE GASES DE EFECTO INVERNADERO EN ROTACIONES ARROCERAS DE INTENSIDAD VARIABLE

Ferrando L.

El arroz constituye uno de los mayores rubros de exportación para Uruguay. Su producción tradicional alterna ciclos de arroz con pasturas. El cultivo permanece inundado gran parte del ciclo de cultivo, lo que generan condiciones propicias para la degradación anaerobia de materia orgánica del suelo, y la consecuente emisión de metano, gas de fuerte efecto invernadero (GEI). La reciente intensificación agrícolas y la incorporación de otros cultivos como la soja en la rotación, plantea nuevos desafíos con respecto al mantenimiento de la sustentabilidad de los sistemas arroceros y su impacto sobre el medio ambiente. Esto podría modificar la disponibilidad de nutrientes y afectar a los microorganismos involucrados en la producción y consumo metano y por tanto en su emisión en estos ecosistemas.

En este trabajo se estudiaron las comunidades microbianas de suelo de tres rotaciones arroceras (arroz intensivo, arroz-pastura y arroz-soja) de un ensayo de campo de instalado en INIA Treinta y Tres. Se determinó la abundancia de distintos grupos microbianos involucrados (qPCR de marcadores funcionales, *Bacteria* y *Archaea*) y la dinámica del microbioma de suelo mediante Illumina MiSeq gen 16SrRNA. Se determinó además la actividad metanótrofa potencial y metanogénica endógena en ensayos de microcosmos y se midió el flujo de metano en campo mediante el método de la cámara estática en distintos momentos de la rotación.

Los resultados obtenidos muestran que el flujo de metano y la abundancia de metanogénicos y metanótrofos fue afectado por el uso previo del suelo, principalmente en las primeras etapas del ciclo de cultivo. Por otra parte, se observaron diferencias en las comunidades microbianas establecidas en suelos arroceros en macollaje y floración. La intensificación arroceras afectó la composición de las comunidades microbianas presentes en suelos de arroz. Se detectaron microorganismos de suelo implicados en la producción o consumo de GEI fuertemente asociados al arroz.

DIVERSIDAD GENÉTICA, SENSIBILIDAD A FUNGICIDAS Y AGRESIVIDAD: UNA MIRADA PRÁCTICA A *MONILIOPHTHORA RORERI* EN ECUADOR

Pérez-Martínez S.¹, Villavicencio M.², Espinosa F.², Amaya D.², Romero C.², Quiroz, J.³, Mestanza, S.³, Sosa del Castillo D.^{1,2*}

La enfermedad pudrición helada del fruto, causada por *Moniliophthora roreri*, ha mantenido en jaque a los productores de cacao desde 1916, cuando fue reportada en la Costa del Ecuador. Esta misma situación se presenta en cada nuevo avance de la enfermedad en el Hemisferio, donde permanece contenida hasta el presente. En Ecuador, los estudios previos de diversidad genética del hongo tienen en común: 1) que no ha sido asociada a marcadores fenotípicos de interés fitopatológico (agresividad o la sensibilidad a fungicidas) y 2) una subrepresentación de aislados de la Amazonía. Este trabajo analiza la diversidad genética de *M. roreri* a partir de aislados de la Amazonía y de la Costa en asociación con la sensibilidad a los fungicidas flutolanil y asozystrobin, y a la agresividad *in vivo* en frutos de cacao. Se analizaron 75 aislados, incluyendo 70% de la Amazonía. La diversidad genética se determinó mediante microsatélites, la sensibilidad a los fungicidas mediante determinación de la IC50 *in vitro* ($\mu\text{g ml}^{-1}$) y la agresividad mediante inoculaciones *in vivo*.

Resultados: hasta el momento hemos encontrado que el rango IC50 del flutolanil está entre 2.6×10^{-3} y 145.6×10^{-3} , con el 3% de los aislados en el rango superior ($131.0-145.6 \times 10^{-3}$). Hubo diferencias significativas en el promedio de IC50 de Amazonía y Costa (30×10^{-3} y 50×10^{-3}), respectivamente. El promedio de diversidad genética entre ambas regiones fue $H_s=0.63$ y el índice de fijación $F_{st}=0.11$, lo que indica un bajo % de diversidad genética. Estos resultados, aunque en progreso, pueden constituir insumos para: 1) las casas comerciales de fungicidas, responsabilizados con evitar la resistencia a las moléculas, 2) gestores de las políticas públicas nacionales para la producción y la productividad del cultivo, y 3) para fitomejoradores, que pueden dirigir mejor sus ensayos en los programas de mejoramiento genético del cultivo.

¹ Universidad Estatal de Milagro, Milagro-Ecuador

² Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, ESPOL. Guayaquil-Ecuador

³ Estación Experimental Litoral Sur, INIAP. Guayas, Ecuador

dasosa@espol.edu.ec.

ROOT-ASSOCIATED MICROBIOME OF TROPICAL MAIZE AND SORGHUM GENOTYPES CULTIVATED WITH CONTRASTING PHOSPHORUS CONDITIONS IN A LONG-TERM EXPERIMENT

de Sousa S.M.^{1,2*}, Lourenço Campolino M.², Gomes de Paula Lana U.¹, Abreu de Oliverira C.¹, Coelho A.M.¹, Neal A. L.³, Gomes E.A.¹

Marginal soil fertility, soil acidity, aluminum toxicity, and low nutrient levels, especially phosphorus (P), are major limiting factors to cereal production in highly weathered Oxisols that are prominent in the tropics. Chemical fertilizers have been fundamental in the development of agriculture, however, when applied in excess, they can contaminate the environment and significantly increase the production cost. Plants have evolved several strategies to improve P acquisition, including the ability to associate with soil microorganisms that potentially enhance P uptake and plant nutrition. An alternative aiming more sustainable agriculture is to increase phosphorus (P) use efficiency using partially P-soluble sources associated with microorganisms and efficient genotypes. We performed a metagenome analysis and evaluated the rhizosphere bacterial diversity of maize and sorghum genotypes grown under different sources and levels of P in long-term (10-year) field trials in Sete Lagoas, MG – Brazil. Within each crop, no significant effect of genotype and phosphate source was observed. However, the P doses within each phosphate source affected significantly the structure of the microbial community, forming three distinct groups for maize and sorghum, indicating that P availability is the predominant factor structuring bacterial communities. The identification of phyla and microbial families revealed direct impacts of P on taxon richness and abundance. Moreover, it was observed an oligotrophic to copytrophic remodeling in relation to the P availability for both crop species. This could represent a shorter path to further studies aiming the isolation and validation of taxa described possibly involved in rhizosphere soil P release and their use in agriculture.

Financial support: Embrapa, CNPq, Newton Fund, BBSRC and Capes

¹Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, 35701-970, Brazil

²Universidade Federal de São João del-Rei, São João del-Rei, MG, 36301-160 Brazil

³Department of Sustainable Agricultural Sciences, Rothamsted Research, Harpenden, Hertfordshire AL5 2JQ, UK

*sylvia.sousa@embrapa.br

ANTIMICROBIANOS PARA EL SECTOR AGRO: ALTERNATIVAS A PARTIR DE HONGOS, BACTERIAS Y FAGOS

Zapata-Ocampo P. A., Tandioy L. S., Álvarez J. A. Vanegas-Otálvaro, D. Rojas- Vahos D.

La disponibilidad y el uso de medicamentos antimicrobianos en animales terrestres y acuáticos y en la producción de cultivos son fundamentales para la salud y la productividad. Estos contribuyen a la seguridad alimentaria, la inocuidad de alimentos y el bienestar animal, al tiempo que protege los medios de vida y la sostenibilidad de la producción animal y agrícola. Sin embargo, existe una preocupación creciente a nivel mundial por la resistencia a los medicamentos antimicrobianos, entre los que se incluyen los antibióticos, debido a los temores de que la Resistencia a los Antimicrobianos (RAM) anule estos beneficios (FAO, 2016-2020). Lo anterior, hace necesario y prioritario, desarrollar alternativas limpias y sostenibles para la agricultura de hoy, donde los antimicrobianos vienen siendo implementados en la producción agrícola y animal.

Dentro de estas alternativas es posible contemplar la utilización de hongos, bacterias y fagos, para el desarrollo de nuevos bioinsumos. En el presente trabajo se presenta el uso de metabolitos de quitina y proteínas, de origen fúngico, péptidos de bacterias y la búsqueda y selección de bacteriófagos, para el control de agentes patógenos de importancia en el sector agro. El objetivo del presente trabajo fue determinar la actividad antifúngica sobre *Pseudocercospora fijiensis* que presentan las plantas de banano, cuando son cultivadas en presencia de quitina. Así mismo extractos proteicos de *Auricularia auricula* y péptidos de *Bacillus thuringiensis* han sido analizados en el control de *Fusarium oxysporum*, *Pseudocercospora fijiensis*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella sp.* Adicionalmente, bacteriófagos aislados fueron evaluados para el control de *Enterococcus faecium*. Los resultados fueron analizados en PRISMA 6.0 mediante un diseño multifactorial categórico, donde se evaluó el efecto de diferentes agentes a diferentes concentraciones sobre la inhibición del crecimiento y se determinó la concentración efectiva del 50% (EC50), con diferencias significativas entre los tratamientos y con un valor $p < 0.05$.

BIOTECNOLOGÍA MICROBIANA

PRESENTACIÓN DE POSTERS

MICROORGANISMOS EFICIENTES NATIVOS (MEN): CONSORCIO PARA MEJORAR LA SALUD DEL SUELO Y LOS CULTIVOS

Bajsa N.¹, Trasante T.¹, García S.², Lassevich D.¹, Senatore D.¹, Azziz G.²

El consorcio de microorganismos eficientes nativos (MEN) se obtiene a partir de suelo, en un procedimiento anaeróbico de selección y multiplicación de ciertos grupos microbianos. Tiene varias aplicaciones biotecnológicas: tratamiento de aguas residuales y residuos orgánicos, y como enmienda agrícola mejorando la nutrición y salud de las plantas. Su modo de acción consiste en acelerar la descomposición de la materia orgánica, y competir con hongos y bacterias perjudiciales. El objetivo de este proyecto es caracterizar el consorcio de MEN elaborado por la Cooperativa Entrebichitos y generar información para su registro y distribución. Se realizó la caracterización microbiológica del MEN, se evaluó la estabilidad del producto y su efecto sobre los cultivos.

Se determinó que los principales grupos esperados en el MEN (levaduras y lactobacilos) mantienen poblaciones estables por al menos 4 meses a temperatura ambiente. Se identificaron algunos aislamientos bacterianos (*Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus paracasei*, *Acetobacter fabarum*, *Bacillus cereus*, *Bacillus wiedmannii*) y de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* y *Kazachstania* sp.). La estructura de la comunidad bacteriana presente en el MEN (por secuenciación masiva del gen del ARNr16S) mostró dominancia de *Lactobacillus* spp. (94 a 98%), con otros géneros minoritarios (*Acetobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Gluconobacter*, *Komagataeibacter*, *Leuconostoc*). Se evaluó el efecto del uso de los MEN sobre el cultivo de lechuga en condiciones controladas. La aplicación de MEN aumentó el peso seco de las raíces de las plantas, respecto a los controles con agua y fertilizante químico. Las poblaciones de algunos grupos de microorganismos aumentaron en los suelos con el agregado de MEN. Se evaluó la capacidad del consorcio para controlar patógenos, detectándose actividad antagónica *in vitro* contra *Botrytis cinerea*.

El uso de MEN representa una biotecnología que permite mejorar la salud del suelo y el desarrollo de los cultivos de forma accesible y sin efectos ambientales negativos.

¹Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, MEC, Uruguay

²Facultad de Agronomía - UDELAR. Montevideo, Uruguay

INOCULATION OF *AZOSPIRILLUM BRASILIENSE* ON *PINUS TAEDA* L. SEEDS GERMINATION

Baldin, D.T.S.¹, Goldbach, J.D.², Silva, K. da², Quisen, R.C.², Zuffellato-Ribas, K.C.¹

Associative bacteria, such as *Azospirillum brasiliense*, contribute significantly to promoting plant growth and development through specific physiological processes, as plant hormones synthesis. Associated with hydrogen peroxide (H₂O₂), used to break seed dormancy, these bacteria can contribute positively to the germination performance of seeds. Thus, this study aimed to evaluate the effect of peroxide hydrogen and *Azospirillum brasiliense* on seed germination of *Pinus taeda* L. The study was realized on Plant Tissue Culture and Transformation Laboratory of Forestry Embrapa, Colombo, Brazil. The seeds were treated with: T1 - distilled water (48h), T2 - H₂O₂ (60 minutes), T3 - H₂O₂ (60 minutes) and inoculated with *A. brasiliense* strain 2083, T4 - H₂O₂ (60 minutes) and inoculated with *A. brasiliense* strain 2084, T5 - H₂O₂ (60 minutes) and inoculated with *A. brasiliense* strain 2083 and 2084. Germination was conducted in plastic boxes kept in incubation room (23 ± 2 °C; photoperiod 16h). Germinated seeds were evaluated daily, and after 45 days was calculated the percentage of germinated and non-germinated seeds, incomplete germination (undeveloped root protrusion), germination speed index (GSI) and average germination time. The treatments with *Azospirillum brasiliense* and H₂O₂ did not differ statistically, reaching 92% of germinated seeds (T2), 88% (T3 and T5) and 80% (T4), while the control treatment resulted in 13% of germinated seeds. In addition, the same treatments reached higher GSI, with longer roots and higher height compared to the control treatment. Finally, there was a reduction in the average germination time: T1 - 33.4 days, T2 - 12.1 days, T3 and T4 - 11.76 days, T5 - 11.43 days. The results obtained under the conditions of the present study led to the conclusion that the application of *A. brasiliense* and peroxide hydrogen benefited *Pinus taeda* L. seed germination, decreased the average germination time and increased the germination speed index.

¹ Federal University of Paraná, Brazil

² Forestry Embrapa, Brazil

daryan.tharine@outlook.com

EVALUACIÓN DE *TRICHODERMA* SPP COMO BIOFERTILIZANTE Y CONTROLADOR BIOLÓGICO DEL HONGO *VERTICILLIUM* SPP EN CULTIVOS DE MORA (*RUBUS GLAUCUS*) EN ECUADOR

Sánchez M.¹, Bastidas C.¹

La agricultura en el Ecuador representa los mayores ingresos económicos luego de la actividad petrolera. La mora (*Rubus glaucus*) al ser un fruto blando, es susceptible a patógenos capaces de afectar fuertemente la producción. *Verticillium* spp., es un hongo patógeno con más de 200 especies vegetales como huéspedes. Actualmente, los cultivos de mora en Ecuador están siendo afectados por el hongo del género *Verticillium*. Son conocidas ampliamente las capacidades del hongo *Trichoderma* spp. para tratar enfermedades causadas por hongos, además de su efecto fertilizante. En el presente trabajo se evaluó la capacidad de *Trichoderma* para tratar la infección causada por *Verticillium* spp. en los cultivos de mora. Se desarrolló una solución a base de *Trichoderma hamatum*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma koningii* a diferentes concentraciones (1.985×10^9 conidios/ml, 1.325×10^9 conidios/ml y 2.65×10^8 conidios/ml) para evaluar sus efectos como antagonista de *Verticillium* y como fertilizante. Se evaluó la capacidad fertilizante de *Trichoderma* spp., mediante el análisis de nutrientes del suelo y el contenido de nutrientes en las hojas de las plantas infectadas, antes y después de los tratamientos. Se evidenció el incremento de los nutrientes, principalmente en la aplicación de la dosis de concentración 1.985×10^9 conidios/ml a un volumen de 15ml, encontrando incrementos entre 25% - 466%. Además, para analizar su capacidad antagonista versus *Verticillium* se realizaron pruebas *in vitro* que corroboraron los 3 mecanismos de acción de *Trichoderma* spp., resultando: 1) con la prueba de competición por nutrientes y espacio porcentajes de inhibición de crecimiento de *Verticillium* spp entre 45.5% - 55.7%; 2) la prueba de producción de metabolitos manifestó porcentajes de inhibición de crecimiento de *Verticillium* spp. entre 28%- 70% y 3) mediante microscopia se evidenció como *Trichoderma* spp. parasita a *Verticillium* spp. al introducir sus hifas. Estos resultados demuestran que el producto desarrollado controla la enfermedad en las plantas y al patógeno *in vitro*, además se evidencia su potencial aplicación para realizar una fertilización óptima.

EVALUACIÓN DEL HONGO BIOCONTROLADOR *PURPUREOCILLIUM* SP., UDEA0106, PRODUCIDO EN FERMENTACIÓN LÍQUIDA PARA EL CONTROL DE NEMATODOS FITOPATÓGENOS EN PIÑA Y FLORES

Cardona N.L.¹, Hernández D.M.¹, Medina J.D.¹, Hoyos, L.A., Vargas J.C.²

Los nematodos fitopatógenos causan grandes pérdidas en cultivos en Colombia, y afectan un gran número de plantas en el mundo. Debido a las restricciones en el uso de nematicidas químicos, se han implementado el uso de hongos biocontroladores que disminuyen poblaciones de estos en campo, y los cuales se producen generalmente sobre sustratos sólidos. Debido a la demanda de estos insumos en campo, se hace necesaria la búsqueda de sistemas más eficientes de multiplicación masiva, de efectividad comprobada en laboratorio y campo. Para ello, se trabajó con una cepa nativa del hongo nematicida *Purpureocillium* sp. (UDEA0106), la cual fue multiplicada en un fermentador de tanque agitado con parámetros establecidos. El producto obtenido, fue evaluado *in vitro* sobre nematodos de piña y flores. Se utilizaron contenedores que contenían 100 g de suelo con nematodos, a los cuales se les aplicaron como tratamiento, 10ml del hongo en una concentración de 1×10^8 conidias/ml, y como control, se aplicaron 10 ml de agua destilada estéril (ADE), con cinco repeticiones. Las muestras fueron procesadas mediante la técnica del tamiz–papel facial, se incubaron a temperatura ambiente por 48 horas y evaluadas en microscopio. La variable a evaluar fue el Número de nematodos de cada género, comparados con su respectivo control. Se realizó una ANOVA y prueba T con un valor $P=0.05$, utilizando para ello el software R estudio y Statgraphics Centurión. Hubo diferencias estadísticamente significativas entre las poblaciones de los géneros tratados con el fermentado (*Meloidogyne* spp., *Radopholus* sp., *Helicotylenchus* sp., *Paratylenchus* sp. y saprófitos), y en algunos de los géneros al ser comparados con el control, mostrando alteraciones morfológicas de los estadios. Los resultados constituyen la primera evidencia en nuestro medio, de que un hongo biocontrolador tiene la capacidad de disminuir poblaciones de *Paratylenchus* y *Helicotylenchus* spp. *in vitro*.

¹.Grupo FITOBIOL, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

².Smart Agroservices, Colombia

nadya.cardona@udea.edu.co

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y EVALUACIÓN DE UN FORMULADO COMERCIAL A BASE DE TRICHODERMA SPP. COMO BIOCONTROLADOR Y PROMOTOR DEL CRECIMIENTO VEGETAL DEL CULTIVO DE *CANNABIS*

Castro A*, Diana R, Viera F y Vidal S.

El cáñamo es una variedad de la especie *Cannabis sativa* caracterizada por tener un porcentaje de THC muy bajo (aproximadamente un 3%). Es una planta de gran interés económico debido a los diversos usos en la industria textil, en la fabricación de papel, alimentos, materiales de construcción, etc. El cáñamo, al igual que otras plantas de interés económico, puede sufrir infecciones por fitopatógenos generando grandes pérdidas a nivel productivo. La utilización de hongos como biocontroladores, se emplea comúnmente para proteger a las plantas de fitopatógenos, aunque se desconocen los mecanismos moleculares que subyacen en dicha interacción. Hongos del género *Trichoderma* spp. son los más utilizados debido a que generan una interacción benéfica con la planta, y además son muy efectivos para prevenir las grandes pérdidas productivas generadas por hongos patógenos como por ejemplo *Botrytis*. El siguiente trabajo tuvo como objetivo la identificación molecular de la especie de *Trichoderma* presente en un formulado comercial, así como el estudio de la interacción cáñamo-*Trichoderma* a nivel fisiológico y molecular. A nivel fisiológico, se comparó el crecimiento de plantas inoculadas con *Trichoderma* versus plantas testigo. A nivel molecular, se analizó la expresión de genes relacionados con el crecimiento vegetal y la resistencia a patógenos en plantas inoculadas respecto a las no inoculadas. Los resultados sugieren una acción efectiva de *Trichoderma asperellum* como promotor de crecimiento vegetal así como activador de la defensa vegetal, mostrando así que dicho formulado tiene potencial para ser utilizado en el manejo ecológico del cultivo de *Cannabis*.

RECOVERING SOIL QUALITY IN VEGETABLE FARMING SYSTEMS BY REDUCED TILLAGE AND ORGANIC FERTILIZATION – A BIOPHYSICO-CHEMICAL ASSESSMENT

Ceretto V. ^{1,2*}, Babin D. ², Gilsanz J. C. ¹, Leoni C. ¹ & Smalla K. ²

Soil being a non-renewable resource makes maintenance of soil quality mandatory for ecosystem functioning. Soil microorganisms as key players of many soil processes mediate e.g. nutrient cycling, soil structure, plant growth, and health. We are still lacking a clear understanding of how the intensification in agriculture changes the soil microbiome, physico-chemical properties and thus soil quality. Here, we selected a field experiment in Uruguay which was established in 2012 to compare conventional vs. reduced tillage treatments combined with different fertilization variants to improve soil quality in vegetable farming systems. Bulk soil and rhizosphere samples from table beet (*Beta vulgaris*) cultivated in these soils were collected in November 2017. Physico-chemical parameters of bulk soil were determined. Total community DNA directly extracted from bulk soil and rhizosphere was used for 16S rRNA gene and ITS fragment-based analysis of the microbial community by Illumina MiSeq sequencing. Additionally, quantitative real-time PCR (qPCR) was performed to quantify bacterial and archaeal 16S rRNA genes, ITS fragment and antimicrobial resistance genes (ARGs). First results showed that conventional tillage with mineral fertilization had less soil aggregates >2mm, soil available phosphorus, exchangeable potassium and labile carbon than undisturbed soil. In contrast, the treatments with organic fertilization showed similarities with undisturbed soil regarding soil bacterial community composition. PERMANOVA analysis of the sequencing of 16S rRNA genes revealed that fertilization affected soil and rhizosphere prokaryotic communities, whereas the tillage affected only the soil ones. Moreover, manure application to the soils increased the relative abundance of most of the tested ARGs. When evaluating the sustainability of agricultural management strategies, the structural and functional prokaryotic community composition along with physico-chemical parameters in soil should be considered. Based on our results, we suggest that reduced tillage combined with organic fertilization presents a promising farming alternative for restoring or improving soil quality.

¹ Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Estación Experimental INIA Las Brujas. Canelones, Uruguay

² Julius Kühn-Institut, Federal Research Centre for Cultivated Plants (JKI), Institute for Epidemiology and Pathogen Diagnostics, Braunschweig, Germany

* vcercetto@inia.org.uy

SEXUAL DEVELOPMENT OF *STEMPHYLIUM LYCOPERSICI*.

Franco M. E.¹, Medina R.¹, Gauna J. M.¹, Saparrat M. C.², Balatti P. A.¹

In filamentous ascomycetes, self-sterility, as well as fertility, depend on the mating-type (MAT) locus, whose genes code transcription factors, peptide pheromones, and their corresponding receptors. Heterothallism (self-sterility) occurs between two fungal strains with compatible mating types. On the contrary, homothallism refers to a self-fertile organism with a complete sexual cycle. Heterothallic species are characterized by the presence in each isolate of only one idiomorph, either MAT1-1 or MAT1-2, while both types are present in homothallic species. While some *Stemphylium* species are homothallic others are heterothallic. The teleomorphic state of *Stemphylium* phytopathogenic filamentous ascomycete fungi has not been described yet. Here we identified the idiomorphs within a collection of isolates of *S. lycopersici*. A set of specific primers aimed at amplifying the MAT locus was design based on available sequences of representatives of *Stemphylium* (AY335164.1, AY340940.1 and LGLR01000402.1-TW65_08925). Among 20 *S. lycopersici* isolates we found that each contained only one idiomorph. While 85% belonged to the MAT1-1 type and the remaining 15% were of the Mat1-2 type. The isolates idiomorph were unrelated with the place and plant of isolation, suggesting that in natural habitats the idiomorphs are together. The MAT1-1 idiomorph prevalence over MAT1-2 might explain why the teleomorphic state, has not been found yet. Future studies *in-vitro* might be performed to evaluate the occurrence of the sexual cycle of *S. lycopersici*.

¹Centro de Investigaciones de Fitopatologías. La Plata, Argentina

²Instituto de Fisiología Vegetal. La Plata, Argentina

rociomedinalp@gmail.com

PROPIEDADES DE SUELOS BAJO CAMPO NATURAL Y SU RELACIÓN CON LA COMPOSICIÓN DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS

Garaycochea S.¹, Romero H.², Neal A.³, Beyhaut E.¹, Altier N.¹

Los microorganismos del suelo juegan un papel clave en el ciclo del fósforo (P), mediando la disponibilidad de este nutriente para las plantas. Uruguay importa el 100% del P necesario para la actividad agrícola; por lo tanto, la búsqueda de sistemas de producción más eficientes en el uso de P es un desafío. A pesar del alto contenido total de P en los suelos uruguayos (150-700 ppm), el P disponible es relativamente bajo (generalmente <10 ppm) e independiente del total de P. Los objetivos de este estudio fueron: (1) caracterizar la diversidad estructural y la composición de las comunidades microbianas en diez sitios de muestreo, representativos de cinco unidades de mapa de suelo de Uruguay (ITA, SPO, TBO, TRO, YNG) y (2) explorar su relación con las propiedades físicas y químicas del suelo. 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. Se utilizó técnicas de secuenciación masiva del fragmento 16S rRNA para caracterizar las comunidades bacterianas de los suelos seleccionados. Un total de 4547 unidades taxonómicas operativas (OTU) se obtuvieron con QIIME v 1.9.1, con un 97% de identidad para su anotación taxonómica. El análisis Edge PCA permitió detectar los taxones clasificados dentro de *Archaea*, *Firmicutes*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia* y *Planctomycetes* como los diferenciales entre los suelos. El análisis canónico de coordenadas principales (CAP) basado en distancias Unifrac permitió identificar a las variables fisicoquímicas %arcilla, porosidad, contenido agua, capacidad de campo, P disponible y carbono orgánico como variables que explican las diferencias en composición de las comunidades bacterianas de los suelos estudiados. Estos resultados sugieren que las propiedades fisicoquímicas del suelo se encuentran entre las fuerzas impulsoras de la diversidad y composición de la comunidad bacteriana.

¹ Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Estación Experimental INIA Las Brujas. Canelones, Uruguay

² Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay.

³ Rothamsted Research, Inglaterra

CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE LA BACTERIA CAUSANTE DE LA NECROSIS DE LA YEMA DE FLOR DEL PERAL (NYFP) EN URUGUAY

Garaycochea, S.¹; Iriarte, W.¹; Silvera, M.²; Bonnacarrère, V.¹; Leoni, C.²

La necrosis de la yema de flor del peral (NYFP) incide negativamente en la productividad de los montes de pera. La gravedad de la enfermedad es muy variable entre años y, a pesar de observarse en varios países, su etiología no está claramente definida para Uruguay. Se han realizado diversos estudios tendientes a dilucidar las causas de la enfermedad: estudios de variables ambientales, estudios morfológicos e histológicos de yemas de flor afectadas, aislamiento de microorganismos patógenos potenciales de los tejidos afectados entre otros. Los aislados obtenidos de yemas enfermas fueron identificados como bacterias gram negativas, oxidasas positivas, fluorescentes en medio KingB, productoras de ácido indol-3-acético (medido por análisis colorimétrico -absorbancia a 530 nm- después de la adición del reactivo de Salkowsky a los filtrados de cultivo) y fueron positivas para la prueba de hipersensibilidad al tabaco. La clasificación taxonómica de los aislamientos realizada con el marcador 16s rRNA permitió ubicar a todos los aislamientos en el grupo de *Pseudomonas*. El genoma completo de 13 aislamientos de yemas de flor de pera y dos de tumores de madera de olivos fue obtenido por secuenciación masiva para profundizar en el conocimiento del patógeno. Los ensamblados *de novo* de los genomas se realizaron con el programa Unicycler y su anotación primaria con el pipeline PROKKA contra la base de datos UniProt. El número de regiones codificantes (CDS) identificadas en promedio fue de 5400 CDS para los ensamblados de las 15 cepas. Este número es consistente con el número de genes reportados para bacteria de vida libre (2000 – 7500 genes). Estos genomas serán integrados con los genomas del grupo *Pseudomonas* de la base de datos PATRIC, pudiendo así tener una clasificación taxonómica más precisa y evaluar la presencia de genes involucrados en la patogénesis.

¹ Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Unidad de Biotecnología, Estación Experimental INIA Las Brujas. Canelones, Uruguay

² Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Programa Nac. Inv. Producción Frutícola. Estación Experimental INIA Las Brujas. Canelones, Uruguay

EXPRESIÓN HETERÓLOGA Y CARACTERIZACIÓN DE ENZIMAS FUCOIDANASAS IDENTIFICADAS EN COMUNIDADES MICROBIANAS DE UN AMBIENTE MARINO EXTREMO

Gonzalez J. A.^{1*}, Ponce, N. M. A.², Stortz, C. A.², Lozada M.¹, Musumeci, M.³, Dionisi H. M.¹

Los fucoidanos son polisacáridos sulfatados ricos en fucosa constituyentes de la pared celular amorfa de algas pardas. Presentan importantes propiedades biológicas, sin embargo su alto peso molecular y baja absorción limitan sus potenciales aplicaciones terapéuticas. Las enzimas fucoidanasas catalizan la hidrólisis de enlaces internos de estos biopolímeros, obteniéndose fuco-oligosacáridos sulfatados con estructuras definidas y mayor absorción. Debido a las altas biomásas alcanzadas en los ambientes costeros de la Patagonia, las especies *Undaria pinnatifida* y *Macrocystis pyrifera* podrían ser utilizadas para la producción de dichos oligosacáridos. El objetivo de este trabajo es prospectar enzimas fucoidanasas (GH107, CAZy) a partir de comunidades microbianas de sedimentos intermareales de Bahía Ushuaia, Tierra del Fuego, Argentina. Partiendo de un set de datos metagenómico con 700.000 secuencias codificantes, se identificaron 5 secuencias putativas completas, las cuales compartieron bajos porcentajes de identidad con fucoidanasas conocidas (6 - 50% a nivel de aminoácidos), la mayoría de las cuales pertenecería a bacterias del filo Planctomycetes. Este grupo difícil de aislar y cultivar en laboratorio, frecuentemente está asociado a algas pardas y presenta un alto potencial para metabolizar múltiples polisacáridos de macroalgas. Se seleccionaron cuatro secuencias para su amplificación, clonado y expresión en *Escherichia coli*. Se logró una alta producción de las enzimas en forma soluble mediante la expresión a bajas temperaturas. La actividad de las enzimas purificadas fue evaluada mediante la técnica C-PAGE, utilizando como sustrato fucoidanos purificados de *M. pyrifera*. Una de las enzimas expresadas exhibió actividad en un amplio rango de temperaturas (5 - 55 °C, actividad óptima 25 - 45 °C) y pH 7,5 - 9. Los análisis estructurales de los productos permitirán evaluar la especificidad enzimática y el tamaño de los fuco-oligosacáridos.

Este estudio posibilitará contar con enzimas fucoidanasas novedosas para la producción de oligosacáridos bioactivos, con potenciales aplicaciones en industrias (farmacéutica, nutracéutica y cosmética).

¹Laboratorio de Microbiología Ambiental, CESIMAR-CONICET/IBIOMAR-CONICET, Puerto Madryn, Chubut, Argentina

²Departamento de Química Orgánica, CIHIDECAR-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

³Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas, CITER-CONICET, Concordia, Entre Ríos, Argentina.

*9gonzalezj@gmail.com

INFLUENCIA DE LAS RIZOBACTERIAS EN EL CRECIMIENTO Y CONTENIDO DE PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS EN GRINDELIA TARAPACANA PHIL. Y SU RELACIÓN CON LA BIOACUMULACIÓN DE METALES PESADOS PROVENIENTES DE RELAVE MINERO.

Huillca Y.K. ; Medina F.J. ; Choque D.L.; Martínez L.A.; Ballón J.A., Lazo H.¹

Se estudió el efecto de las rizobacterias en el crecimiento y contenido de pigmentos fotosintéticos de *G. tarapacana* y su relación con la bioacumulación de metales pesados (HM), provenientes de relave minero (RM). Se trabajó con plantas de 60 días de edad que crecieron en macetas conteniendo tierra de cultivo: arena (1:2)+15g/kg estiércol+30g/kg musgo+RM (100g/kg). Luego de 7 días, se inoculó rizobacterias aisladas de esta planta, como sigue: T0=testigo tierra de cultivo, T1=control 10% RM, T2=3 UFC x 108/ml+10% RM, T3=6 UFC x108/ml + 10% RM y T4=9 UFCx108/ml + 10% RM. Los resultados mostraron que la Tasa de Crecimiento Relativo (TCR) disminuyó a los 14 días en todos los tratamientos, pero, a los días 21 se recuperaron los valores de TCR, siendo menor en T1 y mayor en el tratamiento T2 y T3. El peso seco (p.s.) de la raíz y vástago tendieron a incrementar y disminuir sus valores, el tratamiento T1 y T2 incrementó sus valores y disminuyó en el grupo T0, T3 y T4. El p.s. de hojas, tendió a incrementarse en T2, T3 y T4, respecto T1. Pero, el contenido de clorofila a, b y carotenoides tendió a disminuir significativamente ($p < 0,05$) en T3 y T4 respecto a T1 y T2, siendo mayor el tratamiento T0. La concentración de inoculó de rizobacterias alteró diferencialmente la fitoextracción de HM, la acumulación fue: raíz>hojas>tallo. Las rizobacterias incrementaron la fitoextracción de HM, siendo mayor en el tratamiento T2 respecto a T1. El valor de BAC y TF fue elevado en Cd, Mn, Ni, Sn y Zn, respondiendo como especie hiperacumuladora, pero el valor de BCF para As, Co Cr, Cu, Fe y Pb muestra respuesta de especie acumuladora. Estas respuestas indicarían mecanismos específicos relacionados con la disponibilidad y tolerancia de la planta, mediados por la actividad de las rizobacterias.

¹Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa

HACIA EL DESARROLLO DE UN BIOINOCULANTE PARA PLANTAS DE SORGO DULCE (*SORGHUM BICOLOR*) BASADO EN BACTERIAS ENDÓFITAS-DIAZÓTROFAS NATIVAS

Lanza M¹, Mareque C.¹, Heijo G.¹, Taulé C. ¹, Battistoni F.¹

El sorgo dulce (*Sorghum bicolor*) es un cultivo multipropósito utilizado como materia prima para la producción de biocombustibles. Uno de los problemas que presenta su explotación, es la necesidad de la aplicación de grandes cantidades de fertilizante químico nitrogenado para su óptimo crecimiento, provocando graves problemas de sustentabilidad económica y ambiental. Esta problemática resalta la importancia de buscar nuevas alternativas tecnológicas más sustentables, para los sistemas productivos agrícolas. La alternativa que planteamos es el empleo de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), ampliamente reportadas como benéficas al aplicarse como bioinoculantes en cultivos de interés agronómico. La hipótesis del trabajo es que los aislamientos diazótrofos nativos asociados a plantas de sorgo son capaces de promover el crecimiento vegetal (PCV) de la planta. En este sentido el objetivo de este trabajo fue la caracterización de un conjunto de aislamientos de la colección y su posterior evaluación como inoculantes. Para esto se partió de una colección de bacterias asociadas a plantas de sorgo dulce disponible en el laboratorio, que presentan el gen *nifH*, y otras características PCV in vitro (producción de fitohormonas, solubilización de P, K o Fe). Los aislamientos se caracterizaron a nivel de género mediante secuenciación del gen ARNr 16S y a nivel de cepa mediante rep-PCR. Los aislamientos seleccionados fueron evaluados en primera instancia como inoculantes en ensayos de PCV en condiciones gnotobióticas. Los resultados mostraron la identificación de un grupo de aislamientos diazótrofos PCV los cuales serán evaluados en sistemas más complejos.

Financiamiento: ANII_FMV_1_2017_135629.

¹ Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Uruguay

*mlanza@fcien.edu.uy

THE MICROBIOME OF DISEASED AND HEALTHY PLANTS OF TOMATO

López S.M.^{1,2}, Pastorino G.N.^{2,4}, Alanís A.C.⁴, Reparaz J. M.^{1,2}, Medina R.^{2,3}, Gauna J. M.⁴, Saparrat M.C.^{3,4} y Balatti P.A.^{1,2,4}

Today bacteria that interact with plants became a relevant biotechnological resource mainly for sustainable agriculture management. The endobiome of plants contain plant growth-promoting, phytopathogenic as well as antagonistic bacteria whose activity might counteract the stresses provoked by biotic and abiotic factors. This study aimed to identify and analyze the microbial community of healthy and diseased plants.

Tomato plants (cv. Elpida) were grown in a greenhouse located in La Plata, Argentina. While several plants presented symptoms associated with *Stemphylium lycopersici*, others were healthy. Tissues samples from diseased and healthy plants were collected at flowering in May 2017. Genomic DNA of samples (seed, roots, shoots, leaves, and fruit) was extracted and used as templates for high-throughput sequencing. Concomitantly culturable endophytic bacteria within samples were isolated and identified.

The study led us to describe the phylogenetic structure of the endophytic bacteria inhabiting plants which were confirmed by high-throughput sequencing analysis. Isolates cultured in vitro belonged to the phylum with greater relative abundance found in each plant tissue analyzed. Only a few taxa of bacteria within tomato plants can be cultured and bacterial communities within plant organs were highly diverse the activity of these organisms, might affect growth and development as well as plant health. The endophytic communities associated with leaves of diseased plants were less diverse and abundant than in healthy plants. May be pathogens are competing for nutrients and favorable niches contributing in this way to a reduction in species richness and equity, leading this to an unbalanced community, at least compared to healthy plants. So most probably, the microbiome of each plant works as a shield, whose strength remains on diversity, which is crucial for the success of pathogenesis development and also for the establishment of biocontrol agents.

¹ Comisión de investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CICPBA)

² Centro de Investigaciones en Fitopatología (CIDEFI)

³ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET);

⁴ Cátedra de Microbiología Agrícola - Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (UNLP); La Plata, Argentina
smyld03@hotmail.com

CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS QUE DEGRADAN BTEX, PRINCIPALMENTE TOLUENO, AISLADAS DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS EN COLOMBIA

Lozano-Mahecha A, López-López K.

Durante las actividades de extracción, transporte y comercialización de crudos y derivados dentro de la industria del petróleo suelen ocurrir derrames y fugas de hidrocarburos, los cuales impactan negativamente los recursos naturales. En Colombia, una de las causas más importantes de la contaminación por hidrocarburos ha sido desde antaño los atentados terroristas a las mallas viales y campamentos petroleros, así como también el robo de combustibles mediante válvulas ilegales y perforaciones a los tubos de transporte de crudo. Entre los hidrocarburos contaminantes de mayor atención y con más impacto en el medio ambiente y la salud humana, debido a su naturaleza cancerígena, mutagénica y altamente tóxica, se encuentran los hidrocarburos aromáticos monocíclicos: benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (BTEX). En este estudio, se aislaron bacterias capaces de degradar compuestos BTEX, a partir de muestras de suelos colectadas en una zona contaminada con hidrocarburos en el municipio de San Pedro, Valle del Cauca, Colombia. Las bacterias aisladas fueron capaces de utilizar tolueno como fuente de carbono, adicionalmente pasaron por ensayos de biodegradación, tolerancia y crecimiento en Benceno, Etilbenceno y Xileno. Mediante estos ensayos fueron seleccionadas las cepas con mejor respuesta, las cuales se caracterizaron morfológica, bioquímica y molecularmente. Se identificaron dos especies de *Pseudomonas*: *Pseudomonas resinovorans* y *Pseudomonas taiwanensis*; los ensayos moleculares de los genes involucrados en la degradación de BTEX realizados a dichas cepas, mostraron que ambas especies son positivas para los genes todE y todC1 de la vía de degradación TOD. La presencia de dicha ruta de degradación, y el crecimiento y tolerancia a los BTEX, indica que estas bacterias son útiles para fines de bioremediación de suelos y aguas contaminadas, así como para el desarrollo de un biosensor.

Palabras clave: PCR, *Pseudomonas*, bioremediación,

AVR AND ECP POLIMORPHISMS WITHIN REPRESENTATIVES OF RACE 0 AND 2 ISOLATES OF *FULVIA FULVA* (SYN. *CLADOSPORIUM FULVUM*) THE CAUSATIVE AGENT LEAF MOLD DISEASE

Lucentini, C. G.¹; Medina, R¹; Lopéz, S. M. Y¹; Reparaz, J.¹; Gauna, J. M²; Saparrat, M. C. N.^{2,4,5}; Balatti, P. A.^{1,2,3}

Fulvia fulva is a pathogenic fungus that causes leaf mold of greenhouse-growth tomatoes. In previous studies, two races (0 y 2) of *F. fulva* were identified within isolates collected from the production areas in Argentina, whose genomes proved to be polymorphic. The purpose of this study is to analyze the population diversity at the avirulence (*Avr*) genes level using molecular markers. Four-teen monosporic cultures were typed by means of ISSR-PCR (Inter-simple sequence repeat) markers. The 7 ISSR-PCR primers selected amplified 175 bands. Among them, 54 amplicons were recorder polymorphic (31 %). All the isolates of *F. fulva* were clustered in groups at a similarity coefficient of 0.875. The *Avr*, as well as the extracellular protein (*Ecp*) genes of the same 14 isolates, were sequenced, analyzed and compared with available sequences at the NCBI. Among the polymorphisms found it can be mentioned nucleotide variations (SNPs), transversions and transitions, insertions and deletions. The latter included the deletion of a 200 pb part of *Ecp5* (CIDEFI326). *Avr4E*, presented two changes compared to available sequence (AY546101), where ³⁶⁴cytosine was substituted by timine and ³⁹⁸cytosine was replacement by timine; in this way it generated two changes from ⁸²Leucine to Phenylalanine and of de ⁹³Tyrosine to Methionine, such changes might make *Cf-4E* unrecognizable by the corresponding R gene. Here we found that *ecp* genes are highly variable though we still need to understand the biological role of such changes. Among the isolates, two representatives of race 2, CIDEFI329 and CIDEFI300 were the most polymorphic ones, we are still trying to understand the biological significance of this is still under study.

¹ Centro de Fitopatología (CIDEFI), Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (FCAYF), Universidad Nacional de La Plata (UNLP), La Plata, Argentina

² Cátedra de Microbiología Agrícola, FCAYF, UNLP, La Plata, Argentina

³ Cátedra de Fitopatología vegetal, FCAYF, UNLP, La Plata, Argentina

⁴ Instituto de Fisiología Vegetal UNLP-CONICET, La Plata, Argentina

⁵ Instituto de Botánica Spegazzini, FCNyM, UNLP, La Plata, Argentina

lucentiniegustavo@gmail.com

pbalatti@gmail.com

DINÁMICA DEL MICROBIOMA Y GRUPOS MICROBIANOS ANAEROBIOS ASOCIADOS AL CULTIVO DE ARROZ

Martínez A., Ferrando L.

Los microorganismos asociados al cultivo de arroz irrigado presentan gran importancia ambiental ya que participan en los procesos de reciclado de C y N y en la emisión de gases de efecto invernadero. La intensificación en los sistemas de producción arroceras puede modificar la disponibilidad de nutrientes y, por lo tanto, la dinámica de las poblaciones microbianas asociadas a la planta.

A partir de muestras provenientes de rotaciones arroceras con diferente grado de intensificación se estudió la estructura y dinámica de la comunidad bacteriana total y de dos grupos fisiológicos microbianos de relevancia ambiental: bacterias reductoras de sulfato (BRS) y bacterias desnitrificantes (BD), en suelo y asociadas al cultivo de arroz (rizosféricas y endófitas de raíces).

Las BRS y BD fueron detectadas y cuantificadas como endófitas y rizosféricas de raíces de arroz. La abundancia de BRS (qPCR gen *dsrA*) aumentó significativamente en la etapa inundada y tanto este parámetro como su diversidad (T-RFLP gen *dsrAB*) en la rizósfera fue diferente en los sistemas de rotación estudiados. Respecto a las comunidades de BD, los resultados de qPCR de genes *nirK* y *nirS* mostraron que las poblaciones tipo *nirK* estarían dominando este ecosistema frente a las poblaciones tipo *nirS*. Sin embargo, ambas poblaciones mostraron distinta dinámica a lo largo del ciclo y en las distintas rotaciones. La estructura de la comunidad bacteriana total, relevada mediante secuenciación masiva (Illumina MiSeq), se vio fuertemente determinada por el nicho que habitan y por la inundación del cultivo. Asimismo, mediante un análisis de especies indicadoras se encontraron, tanto en raíces como en rizósfera, algunos géneros o especies fuertemente asociadas a las diferentes rotaciones. En suma, los resultados muestran que el microbioma endófito de raíz es diferente al establecido en la rizósfera, y que las raíces estarían «seleccionando» distintas comunidades bacterianas en las diferentes fases del cultivo.

CULTURE CONDITIONS OF *STEMPHYLIUM LYCOPERSICI* IMPACTS ISOLATES VIRULENCE

Medina R¹, Franco M. E¹., Lucentini C. G¹., Lopez S. M¹., Reparaz J. M¹, Gauna J. M¹., Saparrat M. C²., Balatti P. A.¹

Stemphylium solani, *S. lycopersici* and *S. botryosum* are the causal agents of tomato grey leaf spot, a disease with high incidence and severity within tomato production areas that has a relevant economic impact. Necrotrophic fungi of the genus *Stemphylium* synthesize secondary metabolites including host (HSTs) and non-host specific toxins (*non*-HSTs). The purpose is to study the metabolites synthesized and secreted by *S. lycopersici* isolate CIDEFI-216 when it is cultured under different conditions and their effect on plant tissue. CIDEFI-216 was grown on media such as V8, potato dextrose agar (PDA) and potato dextrose broth alone or amended with a filtered macerate of a susceptible tomato hybrid leaves (PDB and PDBs). After 14 days of growth, cultures were lyophilized, mixed with water, sonicated for 3 hours and like liquid broth cultures filtered (0.22 µm). Leaflets of tomato and leaves of pepper were placed on water-soaked filter paper in plastic Petri dishes. Then they were wounded with a needle and treated with extracts as well as filtered supernatants. Extracts of V8 grown cultures provoked larger lesions on tomato leaflets than those of PDA grown cultures after five days of incubation. However, the necrotrophic effect was larger when leaflets were treated with extracts from PDB grown cultures. On pepper leaves typical symptoms of grey leaf spot only developed with the supernatant of cultures grown on V8 media. Evidently, CIDEFI- 216 synthesize and secrete HSTs and *non*-HSTs, which is dependent on the culture conditions as well as the presence of a macerate of leaves.

¹Centro de Investigaciones de Fitopatologías. La Plata, Argentina

²Instituto de Fisiología Vegetal. La Plata, Argentina

rociomedinalp@gmail.com

EFFECTO PROBIÓTICO DE BIOADITIVO OBTENIDO A PARTIR DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES SOBRE EL COMPORTAMIENTO BIOPRODUCTIVO Y CAMBIOS HISTOLÓGICOS DE POLLITOS

Miranda-Yuquilema J.E.¹, Marin A.², Serpa G.¹, Astudillo F.¹, Barros M.³

En los últimos años, el uso de antibióticos promotores de crecimiento está en declive por diversos efectos negativos y colaterales demostrados por la comunidad científica, lo cual ha promovido por la búsqueda de productos alternativos a estos. Una de las alternativas para paliar dichas necesidades es la inclusión de productos biológicos obtenidos a partir de microorganismos eficientes, enzimas, aminoácidos, semillas, entre otros; diversos estudios demuestran que la terapia biótica (probióticos) es empleada con fines profilácticos y terapéuticos en la producción animal, a pesar de las bondades que brindan estos bioproductos, el alto costo para su obtención ha limitado la introducción en forma masiva en las industrias pecuarias. Sin embargo, la inclusión de bioaditivos con acción probiótica desarrollados a partir de residuos agroindustriales podría ser una alternativa y herramienta para el tratamiento de diversas enfermedades gastrointestinales en diferentes especies de animales, en aras de sustituir medicamentos sintéticos de uso veterinario. Por la importancia que tiene el tema el objetivo del estudio fue, evaluar las diferentes dosis de bioaditivo obtenido a partir de los residuos agroindustriales, sobre el comportamiento bioproductivo y cambios histológicos de pollos (1-21 días de edad). Se emplearon un total de 400 pollos híbridos COBB 500, distribuidos en cuatro grupos de 100 pollitos. Las dosis evaluadas fueron: T1, control; T2, 0,25; T3, 0,35 y T4, 0,50 mL de bioaditivo, respectivamente. El bioaditivo se obtiene a partir de una mezcla de mosto de vinaza y melaza de caña con previo tratamiento, incubado a 37 °C durante 36 horas. Mediante un diseño completamente aleatorizado se evaluó, ganancia peso (GP), conversión alimenticia (CA), ocurrencia de diarreas, mortalidad y cambios histológicos del intestino de pollos con 21 días de edad. Para el estudio histológico se sacrificaron 10 pollos de casa grupo. La GP en los pollitos del grupo T3 y T4 (50 y 80 g) fueron superiores ($P < 0.0015$) con respecto a los demás. En cuanto a la CA fue superior en el T3 ($P < 0.0001$) frente a los demás tratamientos. La ocurrencia de diarreas y mortalidad fue menor ($P < 0.05$) en todos los grupos que recibieron tratamientos, de estos el mejor fue en el T3; en este mismo grupo no hubo mortalidad desde 1 a 21 días de edad. El tamaño y peso del intestino fue superior (164 cm y 43 g) en el T3 ($P < 0.0001$) frente a los demás grupos en estudio. Los animales que consumieron dietas que contenían el 0.35 mL de bioaditivo (T3), el tamaño del duodeno, yeyuno e ilium fue superior ($P < 0.05$). En conclusión, la inclusión de bioaditivo con acción probiótica obtenido a partir de residuos agroindustriales mejora la ganancia de peso, reducción de trastornos diarreicos, la mortalidad y la salud intestinal del pollito (1- 21 días de edad) en el periodo crítico del animal.

¹ Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador

² Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central «Marta Abreu» de Las Villas, Santa Clara, Cuba

³ Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador

CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA, MICROBIOLÓGICA Y PRUEBAS *IN VITRO* A UN BIOADITIVO OBTENIDO A PARTIR DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

Miranda-Yuquilema J.E.¹, Marin A.², Serpa G.¹, Astudillo F.¹

La inclusión de productos biológicos obtenidos a partir de bacterias ácido lácticas (BAL), levaduras, enzimas, aminoácidos, semillas, pigmentos entre otros, en la producción animal, en la última década va en aumento, los efectos positivos en la salud del animal, así como del hombre justifican la inclusión de estos productos en las empresas pecuarias, las terapias bióticas con fines profilácticos y terapéuticos en la producción animal aún están limitadas, el excesivo costo para la obtención impide la introducción de forma masiva en las pequeñas y medianas industrias pecuarias. Sin embargo, el empleo de residuos agroindustriales fermentados en condiciones anaerobias podría ser una alternativa económica y adecuada para la obtención de biopreparado con acción probiótica de uso veterinario. Por lo anterior expuesto, el objetivo del presente estudio fue, caracterizar biopreparado con posible acción probiótica de uso veterinario obtenido a partir de residuos agroindustriales. Los residuos elegidos fueron: melaza (como fuente de carbohidratos) y mosto de vinaza (como fuente de proteína). Se emplearon 50 litros de vinaza y 20 kg de melaza. Los subproductos seleccionados recibieron tratamiento térmico durante 8 horas. Las variantes estudiadas fueron: T1, 80% vinaza más 20% de melaza; T2, 70% vinaza más 30% melaza; T3, 60% vinaza más 40% melaza; T4, 50% vinaza más 50 melaza; T5, 40% vinaza y 60% melaza; T6, 30% vinaza más 70 melaza. Todas las variables se incubaron durante 36 horas a 32 °C. mediante un diseño completamente aleatorizado evaluaron los parámetros fisicoquímicos (color, olor, sabor y pH; materia seca, proteína bruta y verdadera, extracto de etéreo, ceniza), microbiológico (viabilidad, cantidad de ácidos orgánicos producidos y concentración microbiana) y pruebas *in vitro* (jugos gástricos, ácidos biliares e inhibición de crecimiento de la *E. coli* y *Salmonella* spp.). todas las variantes presentan un color marrón, olor y sabor ácido dulzón y pH inferior a 4.85 y a las 24 horas se redujo a 4.16. La proteína cruda y verdadera fue superior ($P < 0.05$) en el T1, T2 y T3, sin variación ($P < 0.05$) entre estos, con respecto a los demás; mientras que las demás variables no variaron ($P > 0.05$) entre tratamientos. En todos los tratamientos los parámetros microbiológicos fueron superiores a 94 %, 0.72 mmol/mL y 7.5×10^7 UFC/mL, respectivamente. En cuanto a las pruebas *in vitro* las variantes: T1, T2, T3 y T4 fueron los de mejor comportamiento, sin variación entre estos ($P < 0.05$), frente a los demás. En conclusión, los tratamientos T1, T2 y T3 fueron los de mejor comportamiento fisicoquímico y microbiológico, y los resultados de pruebas *in vitro* demuestran su posible acción probiótica de uso veterinario

¹ Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador

² Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central «Marta Abreu» de Las Villas, Santa Clara, Cuba

ESTABLECIMIENTO DE UN SISTEMA DE TRASFORMACIÓN DE *DIAPORTHE CAULIVORA*, MEDIANTE *AGROBACTERIUM* PARA SU USO EN EL ESTUDIO DE PATOGENESIS EN SOJA

Montoya M.R.A.¹, Massa G.A.^{2,3,4}, Colabelli M.N.⁴, Ridao A. del C.⁴

Diaporthe caulivora (*Dc*) es el hongo causante del cancro del tallo, una de las enfermedades más importantes de la soja en Argentina. Existe poca información sobre esta interacción planta- patógeno. Un modo de visualizar estos procesos es mediante la utilización de aislamientos transformados con el gen de la proteína verde fluorescente (del inglés GFP). La transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (TMA_t) es una técnica para introducir genes de interés en el genoma de los microorganismos. El objetivo del trabajo fue ajustar un sistema de TMA_t para incorporar el gen de la GFP en *Dc*. Para ello se utilizó el vector pFAT+GFP, que contiene el gen para resistencia a higromicina y la cepa EHA105 de *A. tumefaciens*. Se determinó la concentración inhibitoria mínima (MIC) de higromicina para *Dc* la cual fue de 100 µg/mL. La TMA_t de un aislamiento de Balcarce (Buenos Aires, Argentina) se realizó en dos experimentos independientes modificando protocolos previos. Se verificó la incorporación del T-ADN mediante PCR y por la expresión de la GFP en el micelio observado bajo microscopio de fluorescencia.

La TMA_t tuvo una eficacia de 100 % obteniéndose 27 y 29 aislamientos transgénicos en cada experimento. Luego de cinco repiques consecutivos en medio sin antibiotico, se verificó la estabilidad mitótica de los aislamientos transgénicos cultivados en medio con higromicina. La patogenicidad de 13 aislamientos transgénicos se evaluó inoculando el cultivar susceptible DM3810 y el aislamiento salvaje como control. Los aislamientos transgénicos presentaron una patogenicidad variable ($p < 0,05$) y en algunos fue similar a la del aislamiento salvaje. Este es el primer reporte de una metodología simple para transformar a *Dc* que ofrece perspectivas para especies fúngicas cercanas. Resultados derivados del uso de esta herramienta tendrán impacto en epidemiología, mejoramiento y manejo sanitario.

¹ Laboratorio de Patología Vegetal, INTA Balcarce, Ruta 226 Km 73.5, Balcarce, B7620, Argentina

² Laboratorio de Agrobiotecnología, INTA Balcarce, Ruta 226 Km 73.5, Balcarce, B7620, Argentina

³ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), C1425FQB, Godoy Cruz 2290, CABA, Argentina

⁴ Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata, Ruta 226, Km 73.5, Balcarce, B7620, Argentina

montoya.marina @inta.gob.ar

BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM A PLANT GROWTH PROMOTING BACTERIA OF RICE

Reparaz J.M.¹, Bezus R.², Gauna M.², Martinez Alcántara V.², Lopez S.M.¹, Degrassi G.³, Balatti P.A.¹

Rhizospheric bacteria might promote plant growth and they are known as plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). They establish different types of interactions with plants that directly or indirectly promote plant growth and development. Among other things, these bacteria might also indirectly inhibit the development of phytopathogens. On the other hand, plant growth promotion might be due to nitrogen fixation, phosphate solubilization, production of hormone-like molecules, enzymes and siderophores. *Bradyrhizobium* is a soil PGPR that fixes nitrogen within nodules developed mainly by members of the Fabaceae. We evaluated the ability of several isolates of *Bradyrhizobium japonicum* to promote growth of rice plants (*Oryza sativa*) both under controlled conditions and also in field trials. In the lab rice seeds were surface sterilized and then they were soaked in *Bradyrhizobium* cell suspensions of 1×10^8 bacteria ml^{-1} . Plants were grown for 35 days and then plant growth was measured by means of plant length and dry weight. Field tests were conducted with two rice varieties Yerúa La Plata and Gurí INTA that were inoculated with three *Bradyrhizobium* strains selected based on the results of laboratory tests. All inoculated plants performed better than uninoculated controls, however only strain 85 yielded independently of the cultivar, 1000 kg/ha that is significantly more than uninoculated controls. Evidently, Bradyrhizobia promoted not only plant growth but also yield though we still need to know the mechanisms involved.

¹ Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI) Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CICBA) Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina

² Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata (FCAyF), La Plata, Argentina

³ International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), Buenos Aires, Argentina

ACTIVIDAD Y DIVERSIDAD FUNCIONAL EN COMUNIDADES MICROBIANAS DE ROTACIONES ARROCERAS DE INTENSIDAD CONTRASTANTE

Rodríguez-Blanco M.A.⁽¹⁾, Beyhaut E.⁽²⁾

La producción de arroz en Uruguay está basada en sistemas en rotaciones donde este cultivo alterna con pradera perennes. En los últimos años se ha observado una tendencia a la intensificación de estos sistemas por el aumento de la frecuencia del cultivo de arroz, la incorporación otros cultivos, y la menor duración de las praderas en las rotaciones. Los cambios de manejo del suelo tendientes a la intensificación pueden modificar algunos parámetros biológicos como la actividad de los microorganismos que cumplen roles clave en la funcionalidad del suelo y en el ciclado de nutrientes. El objetivo de este trabajo fue evaluar el impacto de la intensificación agrícola en sistemas arroceros sobre la actividad y diversidad funcional de los microorganismos del suelo. El estudio se realizó en la Plataforma de Largo plazo instalada en el año 2012 en «Paso de la Laguna», INIA Treinta y Tres. Se extrajeron muestras de suelo en fase arroz de las rotaciones: arroz-cultivos (R2); arroz-pradera corta (R3); arroz-pradera larga (R4) y arroz-soja-pradera (R5). La actividad fosfatasa alcalina y ácida, el número de actinobacterias y de hongos fueron significativamente mayores en la rotación arroz-soja-pradera en los dos años evaluados. El perfil fisiológico de la comunidad (CLPP), evaluado mediante Biolog® Ecoplates, mostró mayor actividad, riqueza y diversidad en las rotaciones menos intensivas que incluyen pradera larga (R4 y R5). Las comunidades de R5 mostraron mayor capacidad de metabolizar ácidos carboxílicos y aminos que las de R2, pero no se diferenciaron de las otras dos rotaciones que incluyen praderas. El análisis multivariado de los datos (NMDS y ANOSIM) discriminó tres grupos: rotaciones que incluyen pradera larga, la rotación que incluye pradera corta y la rotación arroz-cultivos que no incluye pradera. El abordaje empleado puso en evidencia cambios en las propiedades biológicas del suelo en los primeros años de un experimento de largo plazo, y conocer los valores de base. La continuación en el tiempo de estas evaluaciones permitirá monitorear el efecto de la intensificación agrícola en el potencial funcional del suelo.

⁽¹⁾ Universidad de la República, Facultad de Agronomía, Microbiología. Departamento de Biología Vegetal. Montevideo, Uruguay

⁽²⁾ Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Microbiología de Suelos, Bioinsumos. Estación Experimental INIA Las Brujas, Canelones, Uruguay
andrearb@fagro.edu.uy

EFFECTO BENÉFICO DE *BACILLUS* SP. P12 SOBRE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL SUELO Y COMO AGENTE DE BIOCONTROL EN EL CULTIVO DEL POROTO

Sabaté D.C.^{a,b}, Álvarez M.D.^a, Audisio M.C.^{b,c}, Pérez Brandan C.^a

Los suelos son la base de la agricultura y el medio en el que crecen casi todas las plantas destinadas a la producción de alimentos. El extensivo uso de agentes químicos afecta la calidad del suelo, y dejan residuos perjudiciales, por lo que en los últimos años se buscan alternativas naturales amigables con el ambiente.

En este trabajos se estudio el potencial de una cepa de *Bacillus* sp. P12 para mejorar la calidad del suelo y consecuentemente favorecer el crecimiento del cultivo del poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) y además su capacidad para controlar el hongo fitopatógeno *Macrophomina phaseolina*. Se determinó que P12 inhibió *in vitro* el desarrollo de seis cepas nativas de *M. phaseolina* con valores de inhibición fúngica que variaron entre 55 y 70 %. Bajo condiciones de invernadero, la incidencia de éste patógeno fue del 100 % en el poroto cv. Alubia en los ensayos control, mientras que en las semillas inoculadas con P12, la incidencia del patógeno disminuyó 40 %, respecto al control. La inoculación con P12 incrementó las actividades enzimáticas FDA, DHA y AP (22, 31 y 6,2 %, respectivamente); disminuyó el coeficiente metabólico; e incrementó la cantidad de proteínas de suelo relacionadas a la glomalina, respecto al control. Además, P12 favoreció el desarrollo de microorganismos benéficos nativos como *Trichoderma* spp. y *Gliocladium* spp. Estos resultados demostraron que *Bacillus* sp. P12 no solo es un potencial agente de biocontrol, sino que también mejora la calidad del suelo, lo cual permitiría mantener un suelo sano, rico en nutrientes y microorganismos benéficos nativos, por lo tanto se mejoraría así la producción agrícola.

^a Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)-Estación Experimental Salta, Argentina

^b Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Universidad Nacional de Salta, Argentina

^c Instituto de Investigaciones para la Industria Química (INIQUI), Salta, Argentina

APROVECHAMIENTO DE LOS RESIDUOS DE CAFÉ, YERBA MATE Y TÉ PARA PRODUCIR ÁCIDOS GRASOS DE LA SERIE OMEGA 3 Y 6, USANDO *THRAUSTOCHYTRIDOS*

Silva D.,^{*(1)} Navarro C.R.⁽¹⁾, Angulo E.R.⁽²⁾, Quilodrán B.H.⁽¹⁾

La sociedad del siglo XXI es cada vez más consciente de reutilizar los residuos agroindustriales, con el fin de obtener productos o materia prima con valor agregado. Todos los días se generan toneladas de residuos provenientes del café, yerba mate y té que son arrojados a la basura, sin pensar en otra alternativa posible. Usando estos residuos como sustrato y empleando protistas marinos *thraustochytridos* (TH), se producirán los ácidos grasos linoleico, linolénico, araquidónico, eicosapentaénoico (EPA) y docosahexaénoico (DHA), cuantificando la producción por biomasa y producción por volumen. Estos ácidos grasos de la serie omega (ω) 3 y 6 presentan amplios beneficios a la salud humana, por lo cuál son usados para suplementar alimentos. A partir de cultivos batch en un fermentador de 1 L, 180 rpm, 25 °C y cultivados por 7 días, se hizo crecer *thraustochytrium kinney* sobre tres residuos (a 5 g/L), después se centrifugaron a 4 °C, liofilizando la biomasa para extraer los ácidos grasos y cuantificarlos por cromatografía gaseosa. El mayor valor de biomasa generada fue 5,10±0,61 g/L al usar residuo de café, superando en 70,81% y 31,43% los valores con yerba mate y té. La mayor producción por biomasa se obtuvo para ácido linoleico (ω 6) con 371,72±27,73 mg/g y EPA (ω 3) con 95,19±7,53 mg/g empleando residuo de café. Respecto al DHA que es el ω 3 más importante de la serie, al usar té se obtuvo el mayor valor seguido de la yerba mate, con 36,13±2,61 y 31,19±1,19 mg/g respectivamente. La producción por volumen arrojó el mayor valor usando café con 1896,61±95,83 mg/L, superando en más de 70% lo producido con yerba mate y té. Por tanto se concluye que TH aprovechan de mejor forma el desecho café, siendo esta una alternativa biotecnológica microbiana importante para producir ácidos grasos esenciales que benefician la salud humana.

Palabras clave: Omega 3 y 6, *thraustochytridos*, ácidos grasos y desechos agroindustriales.

(1) Universidad de Los Lagos, Depto. Recursos Naturales y Medio Ambiente, Puerto Montt, Chile

(2) Universidad del Atlántico, Grupo de Investigación de Microalgas, Barranquilla, Colombia

david.silva2@ulagos.cl

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ALELOPÁTICO E QUÍMICO DOS EXTRATOS METANÓLICOS DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS *COLLETOTRICHUM DIANESEI* E *XYLARIA* SP. ISOLADOS DE *PALICOUREA CORYMBIFERA*

¹Silva W. L., ²Lima L. M., ³Nunez C. V.

A ação alelopática pode ser conferida pela presença de substâncias fitotóxicas, tais moléculas são alvo para o setor agroindustrial visando principalmente o controle biológico de espécies vegetais indesejadas. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a composição química dos extratos metanólicos dos micélios de *Colletotrichum dianesei* e *Xylaria* sp. e o potencial fitotóxico sobre *Lactuca sativa*. Os fungos foram cultivados em meio líquido Sabouraud suplementado com 0,2% de extrato de levedura, mantido em incubadora orbital a 120 rpm, a 30 °C por 20 dias. Os micélios foram extraídos com diclorometano, depois com acetato de etila e finalmente com metanol, cada uma usando ultrassom (20 min) e repetido 3 vezes. Pela massa obtida, apenas o extrato MeOH pôde ser testado. A atividade alelopática foi avaliada na concentração de 1000 µg/mL em quadruplicata, avaliando: porcentagem e velocidade de germinação e crescimento das plântulas. Foi realizada a análise química por Ressonância Magnética Nuclear de 1H (RMN) e cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC). O extrato de *Colletotrichum dianesei* reduziu a germinação em 36%, e atrasou a velocidade de germinação em 63,8%. O extrato de *Xylaria* sp. atrasou em 43,9% a velocidade de germinação. O crescimento radicular sofreu interferência negativa de 30,5% e 51,1% sob influência dos extratos de *Xylaria* sp. e *C. dianesei*, e também uma redução no comprimento da parte aérea de 33,1 e 31,8%, respectivamente. As CCDCs evidenciaram a presença de substâncias aromáticas e terpenos, para ambos os extratos e de alcaloides somente para *C. dianesei*. Nos espectros de RMN de 1H, de ambos os extratos, observam-se sinais entre 6 e 8,5 ppm (substâncias aromáticas), sendo relativamente mais intensas para *Xylaria* sp., sinais entre 3 e 4 ppm (açúcares, mostrando anoméricos apenas para *Xylaria* sp.) e metilas entre 0,7 e 1,3 ppm, sugerindo terpenos.

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES INVOLUCRADOS EN LA ACTIVIDAD DE MINERALIZACIÓN DEL FÓSFORO EN *RHIZOBIUM TROPICI* CIAT899

Suárez C.¹, Margenat M.¹, Maidana M.¹, Villarino A.², Garaycochea S.¹

El fósforo es el segundo elemento limitante para el crecimiento vegetal luego del nitrógeno, siendo así un nutriente esencial para la producción agropecuaria. Los microorganismos del suelo juegan un papel importante en los procesos que afectan la transformación de los compuestos fosforados, y por tanto en la fitodisponibilidad de este nutriente. Muchos de ellos pueden solubilizar el fósforo orgánico (fitato), mediante la liberación de fitasas. Este trabajo tiene como objetivo identificar los genes involucrados en la actividad fitasa observada en *Rhizobium tropici* CIAT899. Se está evaluando la expresión diferencial de la cepa en condiciones contrastantes de crecimiento, medio mínimo con fósforo disponible (K_2HPO_4) y medio mínimo con fitato. En paralelo, a través de genómica comparativa se identificaron dos genes candidatos para fitasas β -propeller (BPP), Fitasa 1 y 2. Ambos genes fueron clonados en un vector plasmídico de tipo T7, utilizando la estrategia de RF-cloning. En el caso de la Fitasa 1 se identificó una región de la secuencia que podría corresponder a un péptido señal, por lo cual se clonó la secuencia nucleotídica completa así como, la correspondiente a la proteína madura sin el péptido señal. Se está ajustando la metodología para la producción de las enzimas recombinantes en *E.coli* BL21 pLysS, para luego comprobar su actividad fitasa y confirmar la función para dichos genes candidatos en la cepa CIAT 899.

¹ Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Estación Experimental INIA Las Brujas. Canelones, Uruguay

² Facultad de Ciencias, sección bioquímica y biología molecular – UdeLaR - Uruguay

BIOECONOMÍA

HACIENDO DE LA BIOECONOMÍA UNA OPORTUNIDAD PARA AMÉRICA LATINA Y EL CARIBE

Anllo G.

El paradigma de la Bioeconomía, sobre la base de la convergencia de la biotecnología, nanotecnología, y las tecnologías de la información y la comunicación (TIC), propone avanzar hacia una visión y abordaje más «biológico» de los desafíos del desarrollo. Se trata de comprender cómo las entidades biológicas han resuelto, y resuelven, los desafíos que el medio ambiente les ha planteado a lo largo de millones de años, y de ahí proyectar nuevas formas de organización económica (productos y servicios) y social (consumo y nutrición, asentamientos, territorialidad, etc.). En cierta forma, un abordaje ecológico «high-tec» para sustentar un desarrollo que aúne el cuidado de la naturaleza con un aceptable estándar de consumo para amplias capas poblacionales, vía una nueva reindustrialización que tenga en cuenta resguardos ambientales y las dotaciones de recursos naturales. Los países desarrollados y los principales países en vías de desarrollo están avanzando con iniciativas en ese sentido.

Contrariamente a otras revoluciones tecnológicas, donde la región debió desarrollar sus capacidades para integrarse a las mismas desde cero, América Latina y el Caribe se encuentran preparadas para ingresar rápidamente a esta. La región posee una gran biodiversidad y una larga tradición en la producción en base a recursos naturales, con una producción de biomasa excedentaria. Ello, a su vez, ha contribuido a desarrollar capacidades locales que permiten afirmar que cuenta con un rico capital para ingresar al nuevo paradigma -una base de conocimientos genéticos y avances en lo referente al sector de bio-salud-. Existen, en consecuencia, tanto capacidades de absorción como de generación de conocimiento en los ámbitos relativos a lo biológico. Sin embargo, para poder aprovechar la oportunidad que abre el nuevo paradigma de la Bioeconomía, la región necesita replantear su matriz productiva para generar un modelo de desarrollo técnica, económica y socialmente sustentable. Rompiendo las divisiones entre agro, servicios e industria, la pregunta es cómo recrear «el desarrollismo» sobre base sólidas y acorde con las revoluciones tecnológicas en curso. Obturada la vuelta al pasado sustitutivo tradicional –los salarios de las economías asiáticas y los tiempos de aprendizaje de las nuevas tecnologías así lo desaconsejan- y acotados los impactos de un desarrollo basado estrictamente en las actividades primarias se abre la puerta a la estrategia de «industrializar la biomasa» y engazarla con la estructura industrial existente.

BIOTECHNOLOGICAL TOOLS FOR THE PRODUCTION OF HIGHLY NUTRITIONAL FOOD: THE SOLANACEAE FAMILY AS AN EXAMPLE

Canhoto J.C., Correia, S.I.

By the year 2050 It is estimated that the world population will be around 9 billion people, which means 1.5 billion more than nowadays. Feeding this ever-growing population requires not only increasing production but also bringing other plants into our eating habits. To achieve this goal, plant biotechnology tools will play a decisive role in plant breeding either by the development of new cultivars or by the improvement of the so-called underutilized or neglected crops. These are species that have the potential to be used in agriculture, but for one reason or another have not been widely exploited. The solanaceae (nightshade) family encompasses a wide range of species that have long been used not only for human consumption but also for obtaining secondary metabolites with important medical applications. This family includes well-known species, like potato, tomato, eggplant or pepper, but also less popular plants such as tamarillo, physalis, and goji that have great potential for use outside their home regions. As far as tamarillo is concerned, it is a small tree native of some Andean regions of South America that can be used both as a fruit or a legume. Tamarillo berries are rich in vitamins, minerals and antioxidant compounds, and poor in carbohydrates. In the last years, a lot of work has been carried on tamarillo breeding by our group. Tetraploid plants have been obtained as well as new genotypes through hybridization. Micropropagation protocols have been applied to clone selected trees, especially through somatic embryogenesis, and genetic transformation protocols developed whereas cytological, physiological and molecular analyses have helped to clarify the morphogenic pathways. These data on tamarillo will be discussed in the context of the role of biotechnology in the production of more nutritious foods.

This work was supported by the Project «RENATURE - Valorization of the Natural Endogenous Resources of the Centre Region» (CENTRO-01-0145-FEDER-000007) and Project PTDC/BAA-AGR/32265/2017: «Tamarillo breeding: better plants for better products

POTENCIALIDADES Y RETOS PARA LA BIOECONOMÍA EN AMÉRICA LATINA Y EL CARIBE: EL PAPEL DEL IICA

Hugo Chavarría

La bioeconomía es a la vez una necesidad y una oportunidad para América Latina y el Caribe (ALC). Es una necesidad porque en el futuro cercano deberemos incrementar sustancialmente la producción de alimentos, energías, fibras en un escenario caracterizado por una mayor degradación ambiental y competencia de los recursos naturales, a la vez que se cumplen los compromisos en temas de des-carbonización y sostenibilidad ambiental que los países han suscrito. Y es una oportunidad no solo porque ALC es una de las regiones con mayor riqueza biológica y potencial de generación de biomasa, sino también porque los avances en las ciencias naturales, sociales y las TIC se complementan para plantear senderos de desarrollo más eficientes, sostenibles e inclusivos.

Para que la bioeconomía sea un modelo de desarrollo viable y aprovechable para toda ALC, es indispensable que los desarrollos científico-tecnológicos estén acompañados de marcos normativos y políticos, así de cómo enfoques de mercado y de mecanismos inclusivos, que generen incentivos para que los agentes económicos de las cadenas de valor tomen la decisión de utilizar más eficientemente los recursos y procesos biológicos en sus modelos de producción, transformación y comercialización. Además, que aseguren que los nuevos usos serán inocuos, seguros y sostenibles.

Con el objetivo de fomentar el aprovechamiento productivo de la bioeconomía en la agricultura y en los territorios rurales de ALC, el IICA estableció un Programa de Bioeconomía y Desarrollo Productivo que ha venido trabajando junto a otros socios en: 1) Generación de evidencia, sensibilización y formación de capacidades para nuevos aprovechamientos de la bioeconomía; 2) Construcción de hojas de ruta diferenciadas para el aprovechamiento de la bioeconomía de acuerdo a potencialidades de territorios y cadenas de valor; 3) Construcción / fortalecimiento de marcos políticos, regulatorios y normativos que viabilicen y posibiliten nuevos aprovechamientos productivos de la bioeconomía en el agro y lo rural; 4) Apoyo al diseño e implementación de estrategias, planes, programas, proyectos e inversiones para fomentar negocios de la bioeconomía en los territorios rurales y en las cadenas de valor de la agricultura.

¿SUBPRODUCTO O RESIDUO? APROVECHAMIENTO DE SEMILLAS DE CALAFATE, UN DESCARTE DE LA INDUSTRIA REGIONAL, COMO FUENTE DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

Dalzotto D.¹, Piñuel L.¹, Boeri L.¹, Barrio D.¹ & Sarry S¹²³.

El calafate (*Berberis microphylla*) es un arbusto endémico de la Patagonia de Chile y Argentina ampliamente utilizado para la elaboración de productos regionales como mermeladas, helados y jugos. EL fruto posee entre 6-10 semillas, que ocupan el 70% de su tamaño. Sin embargo, para la elaboración de estos productos solo se utiliza la pulpa, siendo las semillas un descarte del proceso. Actualmente, la bioeconomía permite revalorizar estos residuos de la industria agro-alimentaria. La pulpa del calafate tiene un especial atractivo debido a su capacidad antioxidante. Sin embargo, aún se desconoce cuáles son los principios activos que presentan sus semillas. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antioxidante de aislados proteicos y péptidos a partir de harina de semillas. Para ello se realizó una extracción alcalina de proteínas (pH 9) y las proteínas solubilizadas fueron cuantificadas mediante Bradford. El aislado fue hidrolizado simulando la digestión gastrointestinal. Tanto el aislado proteico como los péptidos obtenidos de la hidrólisis, fueron caracterizados mediante SDS-PAGE y las actividades antioxidantes de los mismos fueron determinadas mediante ABTS y DPPH. En el aislado proteico se obtuvieron $50 \pm 0,7$ mg de proteína soluble/g harina. El SDS-PAGE reveló la presencia de 4 bandas principales de 6; 9.5; 35 y 53 kDa. El grado de hidrólisis del aislado proteico fue del $31,7 \pm 0,5\%$ y el patrón electroforético de los péptidos mostró bandas de 11, 14 y 23 kDa. Tanto el aislado como los hidrolizados proteicos presentaron actividad antioxidante *in vitro*, siendo la de estos últimos, significativamente mayor con los dos métodos evaluados. Así, las semillas del calafate constituyen una fuente subexplotada para la obtención de compuestos bioactivos, incorporando valor agregado a los productos regionales, en el marco de la economía circular.

¹ CIT-RIO NEGRO Sede Atlántica, Universidad Nacional de Río Negro (UNRN- CONICET). Viedma, Argentina

²Laboratorio de Investigaciones de la Madera. LIMAD-FCAyF-UNLP. CC 31.La Plata (1900) Buenos Aires, Argentina

³Comisión de Investigaciones Científicas-Buenos Aires (CICPBA), Argentina

lpinuel@unrn.edu.ar

BIOTECNOLOGÍA FORESTAL: RETOS Y OPORTUNIDADES EN LA ERA VERDE

Moncaleán P.*

Owing to the increasing human population and the increasing global demand for wood, consumption is exceeding the natural rate of regeneration in many areas (Fenning and Gershenzon, 2002). For this reason, it is necessary to enrich breeding programs with biotechnological tools to increase the quantity and quality of forestry plants. Initially, organogenesis techniques in *Pinus* species to obtain clonal plants were developed (Moncaleán et al., 2005; De Diego et al., 2011; Montalbán et al., 2011). To reproduce exactly the genotype of the donor plant, adult trees were cloned using vegetative buds in *Pinus* spp. (De Diego et al., 2008; 2010; 2010b; Montalbán et al., 2013). After getting this extraordinary goal, we realized problems associated with this technique: low in vitro rooting, small acclimatization percentage, etc.. Then, in 2007 we comprised all our efforts in the development of somatic embryogenesis systems in *Pinus* spp. Lately, we were focused in overcoming some of the bottlenecks: narrow competence window (Montalbán et al., 2014), low initiation frequencies (Montalbán et al., 2012), low rates of maturation (Montalbán et al., 2010), poor germination (Montalbán and Moncaleán 2018), low regeneration in conserved cell lines (Montalbán and Moncaleán, 2017). Moreover, we developed combined systems to increase the efficiency of SE in embryogenic cell lines with recalcitrance to be cryopreserved (Montalbán et al., 2011) and procedures in different conifers species (Montalbán et al., 2013; Hargreaves et al., 2017). Lately, our challenge is being to modulate the drought tolerance in *Pinus*; Different stressful environmental conditions have been applied along the different stages of somatic embryogenesis (Castander et al., 2019; García-mendiguren et al., 2015) to obtain clonal plants with different degrees of water stress tolerance. Preliminary results have showed that somatic plants coming from EMs initiated at lower temperatures showed higher water use efficiency (Montalbán et al., 2016).

Key words: Abiotic stress, conservation, embryogenic cell lines, metabolites, organogenesis, physiological mechanism, somatic embryogenesis.

Acknowledgements: This study was founded by MINECO (AGL2016-76143-C4-3R), DECO (Basque government), CYTED (P117RT0522) and by Portuguese Foundation for Science and Technology (FCT) (SFRH/BD/123702/2016).

HACIA UNA ESTRATEGIA DE BIOECONOMÍA SOSTENIBLE EN URUGUAY

Pittaluga L.

Uruguay no tiene aún una política explícita de fomento a la bioeconomía, aunque hay políticas de desarrollo productivo vigentes relacionadas con ella, tanto desde el Estado como desde el sector privado. Hoy, un conjunto de agencias estatales ha conformado un grupo interinstitucional para elaborar y lanzar una Estrategia de Bioeconomía Sostenible (EBS) en el año 2020, por lo que pronto Uruguay tendrá una política explícita en esta temática. Lo que distingue a Uruguay es que está elaborando la EBS dentro de un marco de planificación estratégica de largo plazo liderada por el Estado. La EBS uruguaya tienen 4 grandes objetivos específicos: la creación de empleo verde; la sostenibilidad de la producción primaria, industrial y de servicios a partir de biomasa renovable; el desarrollo territorial; y, la inserción internacional a partir de la sostenibilidad ambiental.

TECNOLOGÍA ENZIMÁTICA APLICADA A LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS Y PRODUCTOS DE INTERÉS COMERCIAL

Luisa F. Rojas¹; Andrés Ramírez-Vélez², Claudio Jimenez-Cartagena³

En los últimos años, se han venido incrementando el número de modelos de valorización de residuos a nivel mundial; especialmente, aquellos basados en tecnología enzimática. En el presente trabajo se ilustran ejemplos para el aprovechamiento de residuos de la agroindustria del café y el cacao, así como la ganadería, en la obtención de sustancias antioxidantes y saborizantes para la industria cárnica, respectivamente.

Enzimas comerciales como celulasa, pectinasa y xilansa fueron estudiadas mediante variables asociadas a procesos clásicos de extracción, sobre el contenido de polifenoles totales (CPT) en residuos de cascarilla de cacao y exocarpo de café, a nivel de laboratorio. El extracto de café, fue adicionalmente liofilizado para su caracterización química y evaluación de su capacidad antioxidante. Por otro lado, enzimas proteolíticas extraídas de residuos de piña y papaya, fueron evaluadas en función de la concentración y el tiempo de reacción, sobre el grado de hidrólisis proteica (HD) de residuos de la industria bovina. A partir de estos hidrolizados, se desarrollaron saborizantes cárnicos mediante reacción de Maillard, los cuales fueron caracterizados química y sensorialmente.

El uso de celulasa en concentraciones de 75 U/mL para tegumento de cacao y 41 U/mL para exocarpo de café, presentó mejores resultados para la obtención de CPT, con valores de 1527 ± 13 mgGAE/L y 1021 ± 6 mgGAE/L, respectivamente. El extracto hidrosoluble liofilizado de exocarpo de café, mostró una concentración de ácidos clorogénicos de $2,88 \pm 0,14$ mg/g y un valor ORAC de $653,25 \mu\text{mol ET/g}$ con aplicación potencial para la industria de alimentos y farmacéutica. En el caso de las enzimas proteolíticas, las proteasas de papaya en una concentración de 439 U/mL, mostraron mayor HD sobre el sustrato evaluado. Un total de 34 compuestos fueron identificados en los saborizantes desarrollados a partir es estos hidrolizados. Sin embargo, se presentaron diferencias entre los perfiles obtenidos para saborizantes con perfil cárnico comerciales.

¹ Universidad de Antioquia, Grupo de Biotransformación - Escuela de Microbiología, BioAli (CYTED), Calle 70 No 52-21, Medellín, Colombia

²Sanadores Ambientales, Medellín, Colombia

³Instituto de Ciencia y Tecnología Alimentaria, INTAL, Carrera. 50 G # 12 Sur 91 Itagüí, Antioquia

META-TRANSCRIPTÓMICA: AVANCES HACIA EL CONTROL DE FENOTIPOS COMPLEJOS CON INTERÉS BIOTECNOLÓGICO Y SU ESCALAMIENTO INDUSTRIAL

Sánchez, A., García, J.M.

El desarrollo de lo que se ha denominado técnicas «ómicas», particularmente aquellas que se aplican al material genético aislado directamente de muestras ambientales como la meta-transcriptómica, permite la evaluación de dinámicas tanto estructurales como funcionales en microbiomas de interés industrial. Lo anterior se refiere por una parte, a cambios en la abundancia relativa de especies y por otra parte, a cambios en la expresión genética. Cuando se aplica en el contexto de bioreactores, la meta-transcriptómica permite generar conocimiento sobre cómo la configuración de un reactor y sus condiciones de funcionamiento influyen en la comunidad microbiana que alberga. Al acoplarse con estrategias de secuenciación masiva de nueva generación, los estudios meta-transcriptómicos permiten la identificación de repertorios de transcritos casi completos que son expresados por una comunidad microbiana dada bajo un conjunto de condiciones experimentales. En la presente ponencia se describe cómo usar el conocimiento generado por estudios meta-transcriptómicos para guiar el diseño racional de consorcios microbianos a fin de maximizar fenotipos complejos para su escalado industrial. Se describen aspectos metodológicos de avanzada haciendo énfasis en los algoritmos bioinformáticos involucrados. Finalmente se ejemplifica nuestro *rationale* en el contexto de la producción de biogas en un esquema de economía circular aplicable a la realidad latinoamericana.

FORO INTERNACIONAL DE BIOECONOMÍA FORESTAL

Sharry S.

The International Bioeconomy Forum (IBF) provides a flexible multilateral mechanism where global research and innovation partners can discuss, coordinate and act on common thematic challenges in the bioeconomy. The majority of the IBF's work is undertaken in ad hoc working groups, organized into five thematic areas: *Microbiomes; Plant Health; ICT in Precision Food Systems; Bioeconomy Indicators; and, the Forest Bioeconomy*. The Key Outcomes of the Facilitated Discussion is:

Vision – «*Be a credible and globally recognized resource group that facilitates collaboration and coordinated actions among members to support the contribution of the forest sector to the bioeconomy, facilitates outreach and communication, and informs policies.*»

Areas of Focus: *Communication Strategies Data Gaps and Indicators-Addressing Bottlenecks (e.g. financial, human resource, technological, geographical, etc.)*

Potential Projects:

- Create a compendium of member country's forest contributions to the United Nations Sustainable Development Goals, highlighting the forest bioeconomy contribution.
- Create a compendium of communication practices and strategies by governments in member countries, with accompanying analysis, highlighting opportunities and gaps.
- Create national inventories of data, identifying clear indicators to report on the status of the bioeconomy for each member country.
- Compile a set of case studies with lessons-learned by member countries, addressing how to overcome identified bottlenecks to bioeconomy deployment and development.

Canadá hosted a series of International Bioeconomy Forum (IBF) working group meetings in Ottawa, from November 26-30, 2018. Over 100 representatives from countries with significant bioeconomy expertise, including the European Commission, New Zealand, Argentina, India, South Africa, and the United States, participated in IBF meetings and activities throughout the week.

BIOINNOVO DE LA IDEA AL PRODUCTO: CREAMOS HOY LA SANIDAD DEL MAÑANA

Wigdorovitz Andrés

Bioinnovo SA es una empresa biotecnológica dedicada a la investigación, diseño y desarrollo de anticuerpos IgY, Vacunas Recombinantes y prestación de servicios especializados orientados a la salud animal.

Los productos desarrollados por Bioinnovo SA están basados en dos plataformas: la tecnología IgY y la plataforma APCH1 patentada que surgió a partir de los trabajos de investigación del grupo fundador y de la empresa Algenex.

Bioinnovo representa un caso de liderazgo fruto de una sucesión de experiencias exitosas de cooperación entre **el Inta y Vetanco S.A.** El primer convenio entre ambas instituciones data del año 2007 y sembró los cimientos de la actual empresa **BIOINNOVO IgY DNT**: La alternativa para controlar las diarreas neonatales en los terneros.

IgY DNT es la alternativa para controlar las diarreas neonatales en terneros. Se trata de un producto diseñado en base a inmunoglobulinas IgY aviares específicas contra los principales agentes infecciosos responsables de las diarreas neonatales. El tratamiento con este producto minimiza la severidad y duración de la diarrea neonatal, reduciendo la pérdida de peso y mejorando la performance de los terneros. A su vez, es altamente palatable y fácil de administrar y totalmente complementario con los esquemas vigentes de vacunación y tratamiento de terneros y vacas.

VEDEVAX BLOK: Primer vacuna recombinante a subunidad registrada contra el virus de la diarrea viral bovina.

Vedevax es la primera vacuna recombinante a subunidad en el mundo aprobada contra el Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB), enfermedad que afecta a una gran parte de los rodeos bovinos. Está elaborada utilizando un enfoque diferente al de las vacunas tradicionales: es una vacuna que combina la glicoproteína E2 del virus con el anticuerpo APCH, con tiene afinidad por el sistema inmune. Este mecanismo aumenta enormemente su eficacia.

PIENSOS FUNCIONALES A PARTIR DE HONGOS: PRODUCCIÓN ANIMAL EN EL CONTEXTO GLOBAL DE MULTIRRESISTENCIA

Zapata-Ocampo P. A., Clavijo L.D., Garrido J.C., Manrique M.J., Maya L., Zapata C. D. Rojas-Vahos D.

Los microorganismos resistentes a los antimicrobianos se pueden desarrollar y transmitir entre los animales destinados a la producción de alimentos y los seres humanos por exposición directa o a través de la cadena alimentaria y el medio ambiente. Por lo tanto, la Resistencia a los Antimicrobianos (RAM) es un problema multisectorial que comprende la interfaz entre seres humanos, animales y medio ambiente. El hecho de que la salud humana y veterinaria, los sistemas de producción de alimentos y piensos, y los entornos agroecológicos contribuyan a esta resistencia y se vean afectados por ella, apunta a la necesidad de aplicar el enfoque de «Una Salud», que sea a la vez multisectorial y multidimensional para mitigar su ocurrencia. Resistencia a los Antimicrobianos (RAM) anule estos beneficios» (FAO, 2016-2020). El uso de hongos basidiomicetes, ha sido popularmente conocido debido a sus propiedades medicinales y alimenticias, entre los principales compuestos encontrados en los hongos, con actividad medicinal, están los polisacáridos, oligosacáridos, triterpenoides, péptidos y proteínas, vitaminas y aminoácidos, además, se reportan cualidades importantes como que son ricos en carbohidratos, proteína con aminoácidos esenciales, fibra y minerales. En el presente trabajo, se evaluó la producción de un alimento funcional animal, mediante el cultivo de tres especies del género *Pleurotus*, sobre residuos de capacho de maíz y bagazo de caña, suplementados con salvado de trigo. Se realizaron evaluaciones bromatológicas y determinación de la capacidad antioxidante de los sustratos agotados obtenidos, donde se logró encontrar que el residuo aumenta su capacidad nutricional y funcional, con un aumento de 45% en proteína y 23% en carbohidratos, a la vez que un aumento del 73% en capacidad antioxidante.

BIOECONOMÍA

PRESENTACIÓN DE POSTERS

VEDEVAX BLOCK: RESULTADOS DE CAMPO DE LA PRIMERA VACUNA A SUBUNIDAD DIRECCIONADA A LAS CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO DEL SISTEMA INMUNE CONTRA EL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA

Bellido D.^{1,2}, Bazarrica J.^{1,2}, Rocha L.⁵, Acosta M.², Eguinoa G.², Harguindeguy S.², Martínez Escribano J.A.³, Parreño V.^{1,2,4,5}, Wigdorovitz A.^{1,2,4,5}

El virus de la diarrea bovina (VDVB) es una causa importante de pérdida económica en la industria ganadera a nivel mundial y una de las estrategias utilizadas para el control de este virus es la vacunación. En Argentina, solo se permite el uso de vacunas virales inactivadas, aunque la inmunogenicidad y eficacia de las vacunas a virus inactivado son controvertidas. Por otro lado, las vacunas atenuadas o a virus vivos modificados están prohibidas en Argentina, por cuestiones relacionadas a la seguridad de las mismas. Es por esto que se decidió generar Vedevax Block, una vacuna capaz de combinar la potencia de las vacunas vivas con la seguridad de las vacunas inactivadas. Vedevax Block logra combinar de potencia y seguridad gracias a que es la primera vacuna a subunidad direccionada contra la diarrea viral bovina. El antígeno vacunal es la proteína E2 del VDVB fusionada a un anticuerpo de cadena simple (APCH) que es capaz de dirigir la proteína a las células presentadoras de antígeno del sistema inmune.

El objetivo de este trabajo es presentar los resultados obtenidos a campo con esta vacuna.

Para cumplir con este objetivo se realizaron 4 pruebas de 365 días de duración en distintos establecimientos del país. Cada prueba incluyó un mínimo de 100 bovinos, por lo que en total se analizaron alrededor de 600 animales entre vacas y vaquillonas. En todos los casos el 50% de los animales fueron vacunados con dos dosis de Vedevax Block y el otro 50% de los animales recibió la vacuna reproductiva tradicional de acuerdo al plan sanitario diseñado para cada establecimiento. Se tomaron muestras de suero en los días 0, 30, 60, 120, 180 y 365. Las muestras se analizaron por ELISA. Los resultados obtenidos en todas las experiencias fueron muy similares: los animales vacunados con Vedevax Block lograron un nivel de anticuerpos que es capaz de conferir inmunidad protectora durante todo el año, mientras que la vacuna tradicional induce una menor respuesta que a su vez es de menor duración. A su vez estos resultados fueron significativamente distintos en todos los tiempos ensayados.

En conclusión, la vacuna VEDEVAX Block resultó altamente inmunogénica en condiciones de campo respesentando una herramienta util para reducir las pérdidas productivas y reproductivas asociadas a la infección por el virus de la diarrea viral bovina.

¹Bioinnovo

²Vetanco

³Algenex

⁴CONICET

⁵INTA

UNLBIO: UNA ESTRATEGIA PARA UN MODELO DE DESARROLLO SOSTENIBLE

Joris, R.A., Peretti Canale, M.V., Rossin, S.U., Lottersberger, J.

La UNL cuenta con un amplio desarrollo de capacidades científicas – tecnológicas en las diferentes facultades e instituciones que la integran, con un extenso desarrollo de herramientas de gestión en vinculación e interacción entre la academia y el sector productivo.

Los paradigmas a nivel global se enfocan en el fomento de las bioeconomías regionales, la implementación de un nuevo modelo económico como es la economía circular, procesos y productos más respetuosos con el medio ambiente.

El programa UNLBio busca integrar las capacidades de la UNL y los nuevos paradigmas para fomentar la articulación con el sector productivo de las disciplinas bio que contribuyan al desarrollo social y económico de la provincia hacia una economía sustentable y sostenible, además crear un marco de trabajo innovador para promover la I+D+i bio desde una mirada global.

Desde su lanzamiento en junio del 2018 se han puesto en marcha diferentes acciones entre las cuales se creó el Comité Permanente integrado por las facultades y centros universitarios de la UNL, se generó un Buscador Bio para poder contar con la información centralizada de líneas de investigación, servicios y equipamientos, se realizaron seminarios de integración, se articularon proyectos de investigación bio con la Facultad de Ciencias Económicas para la gestión de la viabilidad económica de los mismo.

Se lanzó una convocatoria ProyectáBio que tuvo como objetivo fomentar el intercambio de conocimiento a través de la presentación de ideas proyectos por equipos multidisciplinares como una herramienta para estimular el estado emprendedor. En su primera edición se presentaron 24 ideas proyectos con la participación de aproximadamente 80 estudiantes la representación de 9 de 10 facultades. Un jurado seleccionó 8 ideas proyectos para ser financiadas luego de 3 instancias de evaluación. Las mismas están en la instancia de modelado de negocio.

UNLBio es un desafío de la UNL para el trabajo en red y multidisciplinar.

**BIOTECNOLOGÍA Y
SOSTENIBILIDAD DE SISTEMAS
PRODUCTIVOS**

BIOTECNOLOGÍA Y SOSTENIBILIDAD DE SISTEMAS PRODUCTIVOS

PRESENTACIONES ORALES

EL CONTROL BIOLÓGICO DE PLAGAS: UNA HERRAMIENTA ÚTIL HACIA UNA AGRICULTURA SUSTENTABLE Y LA VALORIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

¹Basso, C.; ²Lorenzo M. E.; ¹Bao L.; ²Méndez, L.; ¹Grille, G.; ¹Seijas, L.

A nivel mundial, el control biológico de insectos es considerado hoy no solo una herramienta fitosanitaria que no acarrea los perjuicios a la salud y al ambiente que provocan los insecticidas químicos, sino también un mecanismo de diferenciación y valorización de la producción agrícola. En efecto, existe una demanda creciente por parte de los consumidores por productos inocuos para la salud y producidos bajo condiciones cuidadosas del ambiente. En la presente década Uruguay se ha sumado a esa tendencia, impulsando la utilización de insecticidas biológicos para el control de diversas plagas de los cultivos. Ello ha sido posible gracias al personal científico calificado disponible y al conocimiento acumulado en los años precedentes, y un marco reglamentario destinado a las empresas para el registro de productos basados en entomófagos (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, 2014). La Unidad de Entomología de la Facultad de Agronomía está impulsado este proceso con proyectos de investigación y tesis de maestría y doctorado, que incluyen estudios taxonómicos y bioecológicos, y la evaluación de la eficacia, dispersión y establecimiento de varios depredadores y parasitoides en el proceso de registro de insecticidas biológicos. Estas acciones involucran a distintos entomófagos, tales como *Amblyseius swirskii* Athias-Henriot (nombre comercial: Swirskii System), *Orius insidiosus* (Say) (nombre comercial: Orius System), *Tupiocoris curcubitaceus* (Spinola) (nombre comercial: Tupio System) y *Trichogramma pretiosum* Riley (nombre comercial: Tricholine Maxi), dirigidos a controlar plagas en los cultivos de morrón, tomate, soja y cannabis. Para que este proceso se extienda sustancialmente a nivel de la producción agrícola, serán necesarias nuevas normas legales sobre el uso de insecticidas químicos, estímulos que favorezcan la adopción del control biológico por parte de los productores, y fortalecer la enseñanza y la investigación en esta temática, porque se necesitará más conocimiento científico y técnico, y agrónomos asesores capacitados en las nuevas prácticas agrícolas.

Palabras clave: insecticidas biológicos, valorización, Uruguay

¹Unidad de Entomología, Facultad de Agronomía, Montevideo. cbasso.bis@gmail.com

²Unidad de Entomología, Facultad de Agronomía, Salto

SOSTENIBILIDAD DE LOS SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA-GANADEROS EN URUGUAY

García Préchac F.¹

Desde el comienzo del siglo XXI Uruguay experimentó un aumento del orden del 300 % de su área de cultivos anuales con alta predominancia de soja. Estimaciones con modelos validados en 2004 concluyeron que 1) no serían sostenibles los sistemas de monocultivo de soja sin cobertura adicional del suelo durante el invierno, 2) el doble cultivo anual trigo-soja generaría erosión al borde de lo tolerable, pero perdería contenido de carbono del suelo (COS) a mediano y largo plazo, y 3) que el cultivo de soja podría ser parte de rotaciones de cultivos y pasturas en forma sostenible, tanto en cuanto a erosión como COS. Los resultados experimentales y de monitoreo posteriores encontraron reducciones del COS del 20% en promedio en 13 años, reducción del contenido de bases intercambiables y acidificación de los suelos utilizados predominantemente en agricultura continua, así como reducción de la productividad de cultivos. A su vez, los experimentos de larga duración muestran que esos efectos negativos no ocurren si se realizan rotaciones de cultivos y pasturas con siembra directa y se mitigan marcadamente si al menos se realizan rotaciones de cultivos en los sistemas solo de cultivos continuos. Estos resultados coinciden con las recomendaciones para el manejo sostenible de los suelos de FAO para enfrentar las 3 principales amenazas a los suelos a escala global que son, en orden decreciente, La Erosión, La Pérdida de Carbono Orgánico y el Desbalance de uso de Nutrientes. Las políticas públicas de Uruguay, como la aplicación de su Ley de Conservación de Suelos y el recientemente aprobado Plan Ambiental Nacional para el desarrollo sostenible, conducen a la aplicación de las recomendaciones de FAO, en coincidencia con los resultados experimentales nacionales.

FORAGE BREEDING STRATEGIES IN URUGUAY: FACING NEW CHALLENGES

Reyno R.¹, Dalla Rizza M.³, Castillo A.³, Do Canto J.¹, Condón F.², Meneses L.², Lattanzi F.², Monza J.⁴

Productivity and persistence of sown pastures remain the main demands of Uruguayans producers, immersed in a context of sustainable intensification of production systems, with adaptation to climate change. In INIA Uruguay we have developed a wide range of approaches to address these issues. The exploration of the productive potential of native species and the incorporation of vegetative structures that favor competition and persistence as rhizomes are examples of the works that have been carried out in such diverse species as *Paspalum notatum*, *Bromus auleticus*, *Lotus corniculatus*, and Tall Fescue. With the addition of some biotechnological tools, we have also been planned long-term research and interspecific hybridization, seeking to incorporate new and higher productivity vegetative structures into agricultural interest species. An additional venue is to investigate and to develop those microorganisms responsible for biological nitrogen fixation in legumes, and for alkaloids production for plant protection as fungal endophytes in grasses. In the case of the rhizobia, a novel strategy was developed to seek and to characterize new strains better adapted to our environmental conditions. The same strategy is now being used for developing new alfalfa strains. Fungal endophytes (from the *Epichloë* genus) present in a *Bromus auleticus* germplasm collection are being described and characterized for the first time. This presentation resumes different strategies of genetic improvement of forage plants using contrasting cases. First, the case of native species *Paspalum notatum* and *Bromus auleticus* where the breeding scheme transited collection, molecular and agronomic characterization, and selection of genotypes adapted. Secondly, interspecific hybridization between species with the aim of combining vegetative structure with reproductive strategies, and finally investigating and developing different microorganism related to the productivity and persistence of forage species.

¹Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Estación Experimental INIA Tacuarembó. Tacuarembó, Uruguay

²Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Estación Experimental INIA La Estanzuela. Colonia, Uruguay

³Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Estación Experimental INIA Las Brujas. Canelones, Uruguay

⁴Laboratorio de Bioquímica, Depto. Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Uruguay

CONTRIBUCIÓN DE LA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL AL USO SOSTENIBLE DE LA BIODIVERSIDAD

Urrea-Trujillo Aura I., Naranjo Esther J., Botero Catalina

El constante saqueo al que son sometidas las plantas, principalmente aquellas que presentan propiedades de importancia económica, ha llevado a que sus poblaciones naturales sean degradadas, en muchos casos al punto de pasar a ser catalogadas como especies en peligro o extintas. En el caso de las plantas medicinales, *Psychotria ipecacuanha*, conocida como raicilla, posee gran valor medicinal por la producción de emetina y sus derivados (Trease y Evans, 1988, Ocampo, 2007). *P. ipecacuanha*, presenta dificultades en la propagación por semilla y por la vía vegetativa, el lento crecimiento de las plantas es la principal limitante. El objetivo de este trabajo fue establecer un jardín clonal con individuos muestreados en Urabá (Antioquia-Colombia) y evaluar el potencial de regeneración vía organogénesis y/o embriogénesis somática, así como la respuesta a la conservación *in vitro*, con miras a su propagación y a mediano y largo plazo realizar programas de uso sostenible.

En proceso de adaptación *ex situ*, parte del material vegetal se necrosó, otros perdieron sus hojas y el tallo tardó entre 6 y 8 meses en desarrollar nuevos brotes. Se logró el establecimiento y propagación *in vitro* de plantas desde explantes nodulares en el medio basal MS suplementado con Kinetina (3.0 mg/L) y Bencilaminopurina (0.01 mg/L). La regeneración de plantas vía embriogénesis y organogénesis se consiguió utilizando porciones de hojas y de tallo, así como raíces adventicias inducidas *in vitro*. En el medio de cultivo basal MS adicionado con BAP (0.25 mg/L), IAA (0.5 mg/L) y Triacantanol, (2 mg/L), se alcanzó mayor número de brotes a partir de segmentos foliares. En el caso de las raíces adventicias, cuando fueron sometidas a diodos de luz (LEDs), aunque no se logró incrementar el número de raíces, se presentó desarrollo de brotes, alcanzando valores más altos en el LED blanco respecto al verde. En la respuesta embriogénica jugaron un rol clave la procedencia del material (P4), y la condición lumínica (fotoperíodo). En los experimentos de conservación por crecimiento limitado, utilizando nudos de plantas *in vitro*, una temperatura de 18 °C, sin adición de manitol al medio cultivo basal MS, permitió mantener las vitroplantas hasta por nueve meses, sin verse afectado el crecimiento y vigor posteriormente en la etapa de recuperación.

Palabras clave: raicilla, embriogénesis somática, organogénesis, explantes nodales, crecimiento limitado

BIOTECNOLOGÍA Y SOSTENIBILIDAD DE SISTEMAS PRODUCTIVOS PRESENTACIÓN DE POSTERS

EFFECTO DE BIOFERTILIZANTE A BASE DE *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* DURANTE LA ACLIMATIZACIÓN DE PLANTAS DE MALANGA Y PLÁTANO PRODUCIDAS *IN VITRO*

Beovides Y., Simó J., Rodríguez D., Pérez M.C.,² Oramas J.,² Santos A., Rayas A., Basail M., Gutiérrez Y., López J.

Un biofertilizante a base de *Pseudomonas fluorescens* (Pf), formulado y producido por LABIOFAM, puede mejorar la eficiencia de la nutrición de los cultivos. El objetivo de este trabajo fue determinar durante la fase de aclimatización el efecto este bioproducto en el desarrollo general de plantas de plátano y malanga producidas *in vitro*. Se utilizaron los cultivares comerciales 'INIVIT MC 2012' (malanga) e 'INIVIT PB 2012' (plátano), ambos obtenidos en el Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT). La efectividad del biofertilizante se evaluó con una solución de 20 Lha⁻¹ de Pf mediante inmersión de las plantas durante 0, 5, 10, 15, 20 y 25 min (previo a la siembra), y por aspersión cada siete días, desde los tres días después de la plantación (ddp); en este caso se realizaron 0, 1, 2, 3, 4 y 5 aplicaciones. Se evaluaron 20 plantas al azar por tratamiento a los 60 ddp; las evaluaciones consistieron en mediciones de altura de la planta (cm), número de hojas y de raíces por planta, y grosor del pseudotallo (cm) en malanga; en plátano además, se calculó el área foliar de la segunda hoja (cm²). Los tratamientos con Pf estimularon el desarrollo general de las plantas de malanga y plátano, expresado en hojas de color verde más intenso, y en valores significativamente superiores en las variables evaluadas. Se demostró, por primera vez, que la inmersión en el bioproducto Pf durante 20 min (malanga) o 25 min (plátano), supera significativamente los otros tratamientos; cuatro aplicaciones mostraron los mejores resultados en ambos cultivos, con diferencias significativas al resto de las variantes. Esto demostró la utilidad del biofertilizante durante la aclimatización obtener plantas con mayor calidad y mejor adaptadas para su supervivencia en campo, debido a que estimula el desarrollo vegetativo y contribuye al uso de estrategias sostenibles y amigables con el medioambiente.

Palabras clave: aclimatización, malanga, plátano, *Pseudomonas*

ESTRUCTURA GENÉTICA DE POBLACIÓN Y DISPERSIÓN DE *PINUS OCCIDENTALIS* EN LA REPÚBLICA DOMINICANA UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES CPSSR

Rodriguez L. E., Carreras R., Paulino L. A., Del Orbe D. A., Paíno O., Navarro R. M., Jorriin J.V.

Pinus occidentalis es la especie dominante de los ecosistemas forestales en la República Dominicana teniendo una distribución que varía de 200-3000 metros sobre el nivel del mar (msnm). Sus poblaciones naturales son ampliamente utilizadas y sobreexplotadas. A pesar de ser la especie con mayor incidencia en los bosques dominicanos, no existe información sobre la estructura genética entre las poblaciones naturales y los estudios se limitan a la caracterización fenológica. El uso de marcadores moleculares es necesario para evaluar estas poblaciones. Nuestro principal objetivo es realizar una caracterización molecular de *P. occidentalis*, donde determinaremos la estructura genética, la diversidad y el flujo genético entre cinco poblaciones naturales. Veinte marcadores microsátélites de cloroplastos (cpSSR) se seleccionaron para llevar a cabo este estudio y ocho se utilizaron para el análisis. Se utilizó HaplotypeAnalysis para estimar la diversidad genética y un AMOVA para determinar la estructura genética de la población. Se detectaron un total de 41 haplotipos con alta diversidad genética en las poblaciones ($HE = 0,90$). Se encontró una estructura genética poblacional significativa entre las poblaciones ($FST = 0.123$) y se detectó una asociación positiva leve en la prueba Mantel ($R^2 = 0.007$). Los resultados de esta investigación reflejan el impacto de planes de reforestación en las poblaciones naturales de especies forestales. Estos planes sin conocimiento de la geografía de los recursos genéticos podrían estar influenciando en la variabilidad que existe entre las poblaciones y en los medidores del flujo genético utilizados. Para futuros planes de manejo de la conservación deben ser también considerados patrones de dispersión de polen, las barreras naturales existentes entre poblaciones y el uso de marcadores moleculares nucleares. Finalmente, se debe realizar esfuerzos para dilucidar mejor la distribución actual y la interacción entre el exótico *Pinus caribaea* y el *Pinus occidentalis* nativo, para evitar riesgos de cruzamiento e hibridación.

OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS CON ACTIVIDADES LACÁSICA, LIGNINO PEROXIDÁSICA Y MANGANESO PEROXIDÁSICA MEDIANTE FERMENTACIÓN SÓLIDA DEL HONGO *PLEUROTUS OSTREATUS* EN ESPUMA DE POLIURETANO

Espín N.F, Soto, P. F.

Uno de los problemas ambientales es la contaminación con compuestos recalcitrantes como dioxinas, explosivos aromáticos, plaguicidas, fenoles clorinados y colorantes.

Estos pueden ser degradados con enzimas ligninolíticas producidas por hongos de podredumbre blanca. En general, la producción de enzimas se realiza por fermentación sumergida; sin embargo, en el caso de hongos, la morfología micelial dificulta la producción a gran escala. Una alternativa a la fermentación sumergida es la fermentación en estado sólido (SSF). El soporte usado en la SSF puede ser de origen agrícola o inertes como espuma de poliuretano. determinar si existe influencia del tamaño de la espuma de poliuretano (PUF), como soporte en la fermentación sólida de *Pleurotus ostreatus* para la obtención de extractos enzimáticos. El estudio de las condiciones de SSF con PUF a escala de laboratorio, permitiría determinar parámetros para su escalado. Por esta razón se evaluó el efecto del tamaño del soporte en la generación de extractos enzimáticos. Se trabajó con erlenmeyers de 250 mL en los que se colocaron 1 g de PUF cortado en cubos de 0,5 cm, o de 1 cm, 35 mL de medio nutritivo y se inocularon 5 discos miceliales del hongo desarrollado en malta agar. Se midieron diariamente las actividades lacásica, lignino peroxidásica (LIP) y manganeso peroxidásica (MnP). La actividad lacásica fue máxima entre los 10 y 14 días (2 175,56 U/L); mientras que LIP y MnP presentaron la máxima actividad de 21 U/L y 7 U/L, respectivamente. El análisis de varianza mostró que no existe diferencia significativa entre los tamaños del PUF. Adicionalmente, se determinó la estabilidad de los extractos a temperaturas de -14 °C, 2 °C, 22 °C y 30 °C. Para la actividad lacásica, los tiempos de vida media fueron 65, 26, 24 y 20 días para las temperaturas respectivas.

BIOCONTROL CON CAPSAICINOIDES DE LARVAS DE *PREMNOTRYPES VORAX* DE TUBÉRCULOS DE PAPAS (*SOLANUM TUBEROSUM*) COSECHADAS Y ALMACENADAS EN EL VALLE DEL MANTARO. REGIÓN JUNÍN

Gamarra M. N.¹, Gamarra P. R.², Claros C. J. L.³

Introducción. La producción de papas en los Andes peruanos es una actividad principal de los agricultores, sin embargo el rendimiento productivo se ve afectado durante el cultivo, en cosecha y poscosecha, en estos dos últimos, son atacados por *Premnotrypes vorax* (*Coleoptera: Curculionidae*) (Pérez - Álvarez et al., 2010) conocido como gorgojo de los Andes, cuyas larvas barrena el tubérculo y pueden causar pérdidas hasta 90% de las cosechas (Vélez, 1997), reduciendo el valor comercial del tubérculo. El uso de agroquímicos para el control de estos insectos ocasiona impacto negativo medioambiental y daño a la salud humana y de animales, lo cual sugiere el uso de bioinsecticidas disponibles, así como los capsaicinoides de residuos de la industria de *Capsicum*, que tienen propiedades biocidas (Claros et al., 2019).

Objetivo. Testear bioensayos toxicológicos con capsaicinoides en larvas de *Premnotrypes vorax* de papas blanca comercial, variedad Yungay cosechadas y almacenadas.

Métodos. Se realizó la extracción de los capsaicinoides de la placenta (residuo) de ají panca, luego se preparó diluciones 0%(T₀), 25%(T₁), 50%(T₂), 75%(T₃) y 100%(T₄) de capsaicinoides y se aplicó a 10 unidades de larvas con tres repeticiones por cada tratamiento, el tiempo de exposición fue de 6 y 12 horas

Resultados. Después de 6 horas de contacto entre larva y capsaicinoides se logró una mortalidad de 50% a más en T₂ a T₄. En T₀ las larvas se mantuvieron vivas y al cabo de 12 h, los T₁ a T₄ mostraron un efecto significativo ($P < 0.05$) letal superior al 60%.

Conclusiones. La biotoxicidad de capsaicinoides en *P. vorax* causó mortalidad en más del 65% en promedio con dosis de LD50 (T₃) y LD25 (T₂) en 12 horas de exposición. Lo que demuestra una alternativa ecoamigable con un impacto ambiental positivo e inocuo al consumidor.

Palabras clave: Bioinsecticida, Capsaicinoides, larvas, *Premnotrypes vorax*, papa

¹Facultad de Ingeniería de Industrias Alimentarias- Universidad Nacional del Centro del Perú

²Facultad de Ingeniería Agronómicas- Universidad Nacional del Centro del Perú

³Facultad de Ciencias Forestales y Ambiente - Universidad Nacional del Centro del Perú

aunonegame2016@outlook.com

nngamarra@uncp.edu.pe

VICIA VILLOSA: UN CULTIVO DE COBERTURA PARA FITORREMIEDIAR AMBIENTES CONTAMINADOS

Ibañez S.G.^a, Travaglia C.N.^b, Medina M.I.^a, Agostini E.^a

Vicia villosa es una planta leguminosa con una creciente aplicación en Argentina como cultivo de cobertura (CC), práctica que favorece el desarrollo sustentable de los sistemas agrícolas. En nuestro país, el As se encuentra de manera natural en elevadas concentraciones, afectando entre otras regiones, zonas donde el uso de este CC proporciona numerosas ventajas. Es por ello que en estudios previos, determinamos que *V. villosa* posee un rol dual como CC y como especie fitorremediadora, posibilitando una restauración ecológica de suelos contaminados con As. El objetivo del presente estudio fue analizar los cambios anatómicos e histológicos en la estructura radical de plantas de *V. villosa* tratadas con arseniato (AsV), arsenito (AsIII) o con la mezcla de ambas especies (AsV/AsIII). Las raíces tratadas con el contaminante mostraron menor turgencia, engrosamiento de capas externas epidérmicas y parenquimáticas subepidérmicas y la presencia de depósitos oscuros en células de la corteza o cercanas al cilindro vascular. Entre los parámetros morfoanatómicos, se observaron disminuciones en la longitud de la corteza, diámetro del cilindro vascular, diámetro total y área del cilindro vascular en plantas tratadas con AsV y AsV/AsIII. Por otro lado, las raíces de plantas tratadas solo con AsIII no mostraron diferencias significativas respecto a plantas control. Los resultados obtenidos reflejan los cambios producidos a nivel radical para disminuir la captación del contaminante, evitando su transporte hacia los órganos superiores y su ingreso a la cadena alimenticia. Demostrando que *V. villosa* sería una especie fitoestabilizadora de As que presenta mecanismos adaptativos para tolerar al contaminante.

^aDpto. de Biología Molecular, FCEFQyN, Universidad Nacional de Río Cuarto. INBIAS- CONICET, Río Cuarto, Argentina

^bDpto. de Ciencias Naturales, FCEFQyN, Universidad Nacional de Río Cuarto. INIAB- CONICET, Río Cuarto, Argentina

BACTERIAL ENDOPHYTES OF TREE LEGUMES FROM ARGENTINA

Martínez Alcántara V ^{1,2}, Gauna J. M.,¹ Medina R^{1,2} ., and Balatti P.A.^{1,2}

Nitrogen fixing tree legumes (Fabaceae) as well as actinorhizal plants provide nitrogen to the soils, so they are used managing silvicultural systems to prevent soil degradation and N depletion as well as to improve production. Nodules of leguminous plants might be occupied by Gram (+) as well as Gram (-) endophytic bacteria that often promote growth. In South America several studies have been, regarding the systematic and phylogenetic relationships of bacterial symbionts, particularly rhizobia, of tree legumes, as well as their ability to nodulate and fix nitrogen. The objective of this work is to study the bacteria isolated from the nodules of native tree legumes like *Poecilanthe parviflora* (Benth), *Vachellia caven* (Molina) Seigler & Ebinger and *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong.

Isolates obtained from surface sterilized nodules were characterized by Gram staining, pH alteration of culture media supplemented with bromothymol blue, phosphorus solubilization, fungal growth inhibition and by PCR amplification by means with BOX1AR (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') primer. Similarity and clustering based on band patterns were made using the DICE coefficient and the UPGMA algorithm of the NTSYS-pc software. The 16S rDNA gene sequence of selected organisms were amplified by using primers 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-ACGGTTACCTTGTTACGACTT-3') and were then analyzed.

Among 23 isolates, four alkalized the culture medium while the other ones did not modified pH; 2 isolates solubilized phosphorus and 4 inhibited growth of *Stemphylium lycopersici*, a fungus that provokes disease on tomato. Based on the genetic analysis the isolates were clustered in two groups, one corresponded to *Bradyrhizobium* sp. and the other one to *Bacillus* sp. The current study contributes to knowing about the interactions that native tree legumes established with microorganisms which might contribute to the development of biological tools to promote plant growth and health.

¹Cátedra de Microbiología Agrícola. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata (UNLP), CC31. La Plata 1900, Argentina

²Centro de Investigaciones de Fitopatología. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (UNLP), CC31. La Plata 1900, Argentina

e-mail: vmalcan@gmail.com

CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE SUSTRATO DE LIRIO (*EICCHORNIA CRASSIPES*) PARA USO AGRÍCOLA

Mosqueda-Martínez M.M., Ramírez-Sánchez R.S., Conejo-Hernández Y., Mireles-Arriaga A.I., Sanzón-Gómez D., Ruiz-Nieto J.E.*

Uno de los principales insumos en la producción hortícola en el Bajío mexicano son los sustratos agrícolas, los cuales se caracterizan principalmente por su gran capacidad para retener agua y sus propiedades fisicoquímicas. La mayoría de los sustratos disponibles se obtienen por importación y la mayoría son extraídos de manera irresponsable con el medio ambiente. En el estado de Guanajuato, el crecimiento excesivo de lirio (*Eicchornia crassipes*) en los principales cuerpos acuáticos superficiales limita el crecimiento de la fauna piscícola y la pesca. Debido a su naturaleza acuática, la biomasa de lirio potencialmente podría tener una gran capacidad de retención de agua y utilizarse como sustrato agrícola alternativo, lo cual ayudaría a reducir su impacto ambiental y complementar alternativamente las actividades económicas dependientes de la explotación de las aguas superficiales. El objetivo del presente estudio fue realizar la caracterización fisicoquímica de sustrato de lirio para uso agrícola. Se colectó material vegetal en la laguna de Yuriria y posteriormente se secó, molió y tamizó para obtener su biomasa. Se realizaron 12 mezclas experimentales con Peat Moss y perlita. Se determinó la capacidad de retención de agua, la conductividad eléctrica, pH, la resistencia a la compactación, sales totales y el contenido de NO₃, K, Na y Ca. Dichas pruebas demostraron que las mezclas que contuvieron biomasa de lirio tuvieron una capacidad de retención de agua 1.5 veces mayor a aquellos originados a partir de Peat Moss. Estos sustratos también presentaron una tendencia a la compactación 1.2 veces menor al Peat Moss y niveles de pH cercanos a neutro. En cuanto a los iones presentes en estos sustratos, las mezclas generadas con lirio tuvieron mayor concentración de todos estos elementos en comparación con las mezclas generadas a partir de Peat Moss.

Palabras clave: naturaleza acuática, impacto ambiental, sustratos agrícolas alternativos

DIVERSIDAD GENÉTICA, SENSIBILIDAD A FUNGICIDAS Y AGRESIVIDAD: UNA MIRADA PRÁCTICA A *MONILIOPHTHORA RORERI* EN ECUADOR

Pérez-Martínez S.¹, Villavicencio M.², Espinosa F.², Amaya D.², Romero C.², Quiroz, J.³, Mestanza, S.³, Sosa del Castillo D.^{1,2*}

La enfermedad pudrición helada del fruto, causada por *Moniliophthora roreri*, ha mantenido en jaque a los productores de cacao desde 1916, cuando fue reportada en la Costa del Ecuador. Esta misma situación se presenta en cada nuevo avance de la enfermedad en el Hemisferio, donde permanece contenida hasta el presente. En Ecuador, los estudios previos de diversidad genética del hongo tienen en común: 1) que no ha sido asociada a marcadores fenotípicos de interés fitopatológico (agresividad o la sensibilidad a fungicidas) y 2) una subrepresentación de aislados de la Amazonía. Este trabajo analiza la diversidad genética de *M. roreri* a partir de aislados de la Amazonía y de la Costa en asociación con la sensibilidad a los fungicidas flutolanil y asozystrobin, y a la agresividad *in vivo* en frutos de cacao. Se analizaron 75 aislados, incluyendo 70% de la Amazonía. La diversidad genética se determinó mediante microsatélites, la sensibilidad a los fungicidas mediante determinación de la IC50 *in vitro* ($\mu\text{g ml}^{-1}$) y la agresividad mediante inoculaciones *in vivo*.

Resultados: Hasta el momento hemos encontrado que el rango IC50 del flutolanil está entre 2.6×10^{-3} y 145.6×10^{-3} , con el 3% de los aislados en el rango superior ($131.0-145.6 \times 10^{-3}$). Hubo diferencias significativas en el promedio de IC50 de Amazonía y Costa (30×10^{-3} y 50×10^{-3}), respectivamente. El promedio de diversidad genética entre ambas regiones fue $H_s=0.63$ y el índice de fijación $F_{st}=0.11$, lo que indica un bajo % de diversidad genética. Estos resultados, aunque en progreso, pueden constituir insumos para: 1) las casas comerciales de fungicidas, responsabilizados con evitar la resistencia a las moléculas, 2) gestores de las políticas públicas nacionales para la producción y la productividad del cultivo, y 3) para fitomejoradores, que pueden dirigir mejor sus ensayos en los programas de mejoramiento genético del cultivo.

1 Universidad Estatal de Milagro, Milagro-Ecuador

2 Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, ESPOL. Guayaquil-Ecuador

3 Estación Experimental Litoral Sur, INIAP. Guayas, Ecuador

dasosa@espol.edu.ec

EFFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO SOBRE EL CONTENIDO DE NITRÓGENO EN *SCENEDESMUS OBLIQUUS* PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOCRUDOS

Miranda A. M.*, Mazo S., Vargas G. J., Sáez A.A.

La biofijación de CO₂ por microalgas se considera una de las tecnologías más prometedoras, ya que pueden convertir el CO₂, en cantidades masivas de biomasa y productos biológicos de manera eficiente. El uso de la biomasa, para producción de biocombustibles mediante la li-cuefacción hidrotérmica (HTL), se presenta como alternativa a energías tradicionales. Sin embargo, una brecha tecnológica que exhibe la biomasa microalgal, con respecto a los combustibles fósiles, se asocia con el contenido de nitrógeno, factor que genera problemas operativos en los biocombustibles, debido, a que disminuye la fracción de carbono en su composición y reduce su poder calorífico. Por lo anterior, se evaluó el efecto del nitrógeno del medio de cultivo sobre el crecimiento celular y el contenido de nitrógeno en la biomasa final, con el fin de disminuir la fracción de nitrógeno en la biomasa resultante.

El estudio se desarrolló, en el Centro Argos para la Innovación, ubicado en la Universidad EAFIT. Empleando un diseño experimental unifactorial por triplicado, con cinco niveles de NaNO₃ (0,1- 0,25- 0,40-0,65-0,80 g/L) agregado al medio de cultivo. La cepa empleada fue *Scenedesmus obliquus*, la concentración celular y nitrógeno total se cuantificaron mediante peso seco y Dumas respectivamente. El análisis estadístico mediante Software STATGRAPHICS Centurión XVI.

Se presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos para las variables concentración celular, productividad y porcentaje de nitrógeno. El mejor fue 0,25 g/L NaNO₃ presentando valores 1,20 g/L- 0,03 g/l.d- 4,7% respectivamente. A partir de los resultados de productividad con relación al contenido de nitrógeno, nos permite sugerir esta concentración en la producción de biomasa microalgal para biocrudo vía HTL.

BIOSEGURIDAD

ELEMENTOS PARA LA EVALUACIÓN DE RIESGO AMBIENTAL EN PAPA-EFR MODIFICADA GENÉTICAMENTE

Boschi F.^{1*}, Vilaró F.², Murchio S.², Menoni M.¹, Narancio R.², Dalla Rizza M.²

La Evaluación de Riesgo Ambiental (ERA) es una metodología que recopila información sobre el peligro y la exposición de una actividad humana específica para determinar el impacto ambiental. El programa de mejoramiento genético de INIA ha incorporado en papa mediante ingeniería genética el gen *efr* de *Arabidopsis thaliana*, para contribuir al desarrollo de genotipos resistentes a marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum*. Se transformó el cultivar INIA Iporá y el clon de mejoramiento 09509.6 con resistencia parcial proveniente de la especie silvestre *Solanum commersonii*. El receptor de membrana EFR tiene la capacidad de reconocer la presencia de ciertos patógenos bacterianos y activar en la planta la Inmunidad Inducida por PAMPs (PTI). El objetivo es aportar elementos para la ERA de la papa-EFR en el marco regulatorio Uruguayo de Bioseguridad. Para el análisis de flujo génico, en Uruguay existen dos especies emparentadas a la papa: *S. chacoense* y *S. commersonii*, que presentan diferentes barreras reproductivas que limitan la hibridación en la naturaleza con *S. tuberosum*. Para organismos no blanco, el gen *efr* no produce ninguna toxina para insectos y proviene de plantas crucíferas presentes en la naturaleza, por lo que no se identifican nuevos riesgos sobre la población microbiana del suelo. El riesgo de generar una nueva maleza es insignificante, dado que las plantas voluntarias no sobreviven fuera de cultivo y no se hibridan con otras especies malezas del género *Solanum*. La relevancia biotecnológica para el cultivo de papa sería: aumentar las posibilidades productivas en zonas limitadas y colaborar al manejo integrado de plagas en reducir la incidencia de una enfermedad que afecta al 8% del área mundial, con potenciales beneficios productivos, económicos, sociales y ambientales. Del análisis realizado se considera que el riesgo ambiental de esta tecnología sería razonablemente similar al de un cultivar generado y desarrollado por mejoramiento convencional.

¹Instituto Nacional de Semillas. Barros Blancos. Uruguay

²Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Estación Experimental INIA Las Brujas. Canelones, Uruguay

fboschi@inase.uy

TRAYECTORIA DE ILSI ARGENTINA EN BIOTECNOLOGÍA: 20 AÑOS CONTRIBUYENDO AL AVANCE DEL CONOCIMIENTO Y EL DIÁLOGO CIENTÍFICO

Lewi, D.^{1,2}, Modena, N.^{3,2}

ILSI – Instituto Internacional de Ciencias de la Vida - es una federación de entidades sin fines de lucro que reúne científicos de la academia, gobierno e industria. El fundamento del trabajo de ILSI es la convicción de que los científicos de diferentes sectores deben colaborar para impulsar el avance y los consensos en temas de impacto para la sociedad.

ILSI está presente en Argentina desde hace casi 30 años y este año, el Grupo de Trabajo sobre Biotecnología cumple 20 años de actividad ininterrumpida, contribuyendo al conocimiento de estas tecnologías y facilitando el avance de la discusión científica en temas de bioseguridad.

A lo largo de estos 20 años se han desarrollado múltiples actividades, tanto en colaboración con otras entidades de ILSI como con instituciones nacionales, regionales e internacionales, entre ellas, un programa de Bioseguridad para investigadores con RedBio Argentina. Desde 1999, se vienen realizando más de 70 clases de actividades: sesiones informativas, de actualización profesional y conferencias, así como talleres, cursos y programas de capacitación, estos últimos con la participación de más de 1500 profesionales de Argentina y otros países de la región latinoamericana.

Los espacios de intercambio científico y creación de consensos entre expertos en evaluación de riesgos han permitido avanzar en el desarrollo de herramientas conceptuales relevantes para la evaluación, tales como transportabilidad de datos y familiaridad, entre otras, generando Informes, publicaciones en revistas internacionales y presentaciones en reuniones científicas. Destacamos en particular nuestra reciente publicación sobre una novedosa metodología para la evaluación de riesgos de cultivos GM, basada en la similitud de las construcciones introducidas, que ha sido auspiciosamente recibida por la comunidad científica.

Gracias a la participación desinteresada y sostenida de expertos de gobierno, academia e industria que contribuyen con su tiempo y experiencia, ILSI Argentina es una institución de referencia en Biotecnología y Bioseguridad.

⁽¹⁾ INTA, Buenos Aires, Argentina

⁽²⁾ ILSI Argentina, Buenos Aires, Argentina

⁽³⁾ Bayer CropScience, Buenos Aires, Argentina

lewi.daliamarcela@inta.gob.ar

LA REGULACIÓN DE LA BIOTECNOLOGÍA AGROPECUARIA Y SU IMPACTO EN LA COMERCIALIZACIÓN DE LOS DESARROLLOS LOCALES

Carmen Vicién¹, Dalia Lewi², María Marta Di Paola¹, Gerardo Petri¹, Julieta Caminetsky¹

Los desarrollos tecnológicos vinculados con los organismos genéticamente modificados (OGM) hicieron necesaria la implementación de sistemas regulatorios destinados a garantizar la seguridad ambiental y la inocuidad alimentaria. Datos útiles y de calidad adecuada son cruciales para el resultado de los análisis de riesgo y en última instancia, como base para la decisión adoptada por las autoridades regulatorias, para autorizar la comercialización del material GM. Sin embargo, los requisitos en cuanto a la calidad e integridad de los datos no siempre están claramente definidos en los sistemas regulatorios. En el ámbito internacional muchas empresas multinacionales suelen emplear en sus desarrollos biotecnológicos sistemas de aseguramiento de la calidad empleando determinados estándares, que si bien resultan en mejoras de la calidad y confiabilidad de los estudios, suelen ser onerosos para las pequeñas y medianas empresas locales, y las instituciones del sistema científico-tecnológico, por el aumento en los costos regulatorios que conllevan. En forma reciente varias iniciativas han comenzado a proponer el desarrollo de sistemas de aseguramiento de la calidad que, sin alcanzar los criterios como los de las Buenas Prácticas de Laboratorio de la OCDE, permitan trabajar con estándares de alta calidad para la generación de datos para los estudios regulatorios.

En este trabajo se presentan los avances del proyecto «Normas en ciencias regulatorias para los desarrollos biotecnológicos» (UBACyT 20020160100070BA) financiado por la Universidad de Buenos Aires, cuyo objetivo es analizar diferentes condiciones de aseguramiento de la calidad e integridad de los datos regulatorios y su impacto en los costos del desarrollo de productos GM por parte de las pequeñas y medianas empresas locales y de instituciones de investigación del sistema científico-tecnológico en Argentina.

¹Universidad de Buenos Aires, Facultad de Agronomía, Buenos Aires, Argentina

²Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina

lewi.daliamarcela@inta.gob.ar

INIA Dirección Nacional

Andes 1365, P. 12
Montevideo

Tel.: 598 2902 0550

Fax: 598 2902 3633

iniadn@dn.inia.org.uy

INIA La Estanzuela

Ruta 50, Km 11
Colonia

Tel.: 598 4574 8000

Fax: 598 4574 8012

iniale@le.inia.org.uy

INIA Las Brujas

Ruta 48, Km 10
Canelones

Tel.: 598 2367 7641

Fax: 598 2367 7609

inia_lb@lb.inia.org.uy

INIA Salto Grande

Camino al Terrible
Salto

Tel.: 598 4733 5156

Fax: 598 4732 9624

inia_sg@sg.inia.org.uy

INIA Tacuarembó

Ruta 5, Km 386
Tacuarembó

Tel.: 598 4632 2407

Fax: 598 4632 3969

iniatbo@fb.inia.org.uy

INIA Treinta y Tres

Ruta 8, Km 281
Treinta y Tres

Tel.: 598 4452 2023

Fax: 598 4452 5701

iniatt@tyt.inia.org.uy

www.inia.uy