



Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria
URUGUAY

Jornada Técnica



**XI JORNADA DE
AGROBIOTECNOLOGÍA**

III Encuentro Nacional REDBIO

 25 de octubre, 09.00 h

 Sala Acuña de Figueroa, Edificio "José Artigas"
anexo del Palacio Legislativo

i'nia
Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria
URUGUAY

Unidad de Biotecnología
Serie Actividades de Difusión N° 786
25 de octubre de 2018

Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

Integración de la Junta Directiva

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

Ing. Agr., Mag. Mariana Hill - Vicepresidenta



Ing. Agr., M.Sc. Diego Payssé Salgado

Ing. Agr. Jorge Peñaricano



Ing. Agr. Pablo Gorriti

Ing. Agr. Alberto Bozzo



JORNADA TÉCNICA

**XI Jornada de Agrobiotecnología INIA
III Encuentro Nacional REDBIO**

25 DE OCTUBRE DE 2018

INIA LAS BRUJAS

TABLA DE CONTENIDOS

P. 3 – 7 Biotecnología Animal

P. 3 - Plataformas moleculares utilizadas para diagnóstico de enfermedades genéticas en bovinos Holando Uruguayo. María Teresa Federici, Andrea Branda Sica, Rody Artigas, Carolina Briano, Andrés Rogberg, Guillermo Giovambattista, Paula Nicolini, Fernando Dutra, Silvia Llambí S.

P. 4 - Avances en la identificación de vacas Holando-Uruguayo portadoras de CVM mediante real time PCR-HRM. Andrea Branda Sica, María Teresa Federici, Paula Nicolini, Silvia Llambí.

P. 6 - Principales mutaciones letales y semiletales en terneros Holando de Uruguay. Carolina Briano, Agustín Romero, Andrea Branda Sica, María Teresa Federici, Marco Dalla Rizza, Silvia Llambí, Federico Giannitti, Rubén Darío Caffarena, Carlos Omar Schild, María Laura Casaux, Fernando Dutra Quintela.

P. 8 – 13 Biotecnología Vegetal

P. 8 - La eficiencia del uso de luz y la partición energética en arroz es genotipo dependiente. Gastón Quero, Victoria Bonnacarrère, Sebastián Fernández, Pedro Silva, Sebastián Simondi, Omar Borsani.

P. 10 - Generación, y caracterización molecular y funcional de plantas de trébol blanco transgénicas con las características de senescencia retardada, tolerancia a aluminio y resistencia a Alfalfa Mosaic Virus (AMV). Rafael Narancio, Yong-Lin Ding, Yi-Han Lin, Sareena Sahab, Stephen Panter, Matthew Hayes, Ulrik John, John Mason, German Spangenberg.

P. 12 - Aportes al conocimiento de Citrus tristeza virus en Uruguay. Maeso, D.; Rubio, L.; Benítez-Galeano, M.J., Hernández-Rodríguez, L., Bertalmío, A., Arruabarrena, A. Rivas, C.; Colina, R.

P. 13 - Propagación de portainjertos de pera en biorreactores de inmersión temporal. Alicia Castillo Danilo Cabrera, Pablo Rodríguez, Roberto Zoppolo

P. 14 - 18 Biotecnología Microbiana

P. 14 - Primer uso de Marcadores Moleculares para la diferenciación de aislados de *Claviceps paspali* en Uruguay. Oberti H., Murchio S., Reyno R., Dalla Rizza M., Abreo E.

P. 15 - Metagenómica aplicada al estudio de genes de resistencia a antibióticos en comunidades bacterianas en establecimientos ganaderos. Pablo Rovira

P. 17 - Aplicación de microesclerocios del hongo entomopatógeno *Metarhizium* spp. en coberturas de semillas para el control biológico de enfermedades y plagas de suelo. Rivas F. , Hampton J., Rostás M. , Altier N., Wessman P. , Jackson T. & Travis G.

Plataformas moleculares utilizadas para diagnóstico de enfermedades genéticas en bovinos Holando Uruguayo

María Teresa Federici¹, Andrea Branda Sica¹, Rody Artigas², Carolina Briano³, Andrés Rogberg⁵, Guillermo Giovambattista⁵, Paula Nicolini⁴ Fernando Dutra³, Silvia Llambí S²

¹ Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas. E-mail: mfederici@inia.org.uy ² Sección Genética, UDELAR. ³ DILAVE Treinta y Tres, MGAP. ⁴ Instituto Superior de la Carne. Centro Universitario Tacuarembó, UDELAR. ⁵ IGEVET-CONICET, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Palabras clave

Genotipado, BLAD, CVM, Braquiespina, haplotipos de fertilidad

Introducción

Los avances en genética molecular han hecho posible la identificación en forma eficiente y rápida de animales heterocigotos mediante análisis genómico utilizando distintas técnicas. El objetivo de este trabajo fue la recopilación de información y aplicación de diferentes estrategias de análisis genómico para la detección de alelos mutantes de enfermedades hereditarias causantes de mortalidad embrionaria, abortos y mortalidad perinatal en muestras de referencia de bovinos Holando Uruguayo

Materiales y métodos

Se utilizaron las siguientes muestras de referencia: A) 190 terneras de la región este del Uruguay; B) 25 vacas de la tesis de Doctorado de A. Branda Sica (se están confirmando mediante ArBos1) y C) 30 muestras de la Sección Genética (UDELAR). Las técnicas que se aplicaron se detallan en Tabla 1.

Resultados y conclusiones

Plataformas moleculares	Alelos mutantes detectados en muestras de referencia							Factor XI	N° alelos detectados/técnica	Muestra analizada
	BL	DP	CN	CVM	BY	HH1	HH4			
PCR- RFLP y/o PCR	1	sd	0	sd	2	sd	sd	sd	1	A, C
PCR-Secuenciación	1	sd	0	2	sd	sd	sd	sd	3	A, B
GGP 26K GeneSeek	1	0	0	sd	sd	sd	sd	sd	1	A
ArBos1- 50K	0	0	0	2	0	1	0	0	5	B
Real time PCR- HRM	1	0	sd	2	sd	sd	sd	sd	3	A, B

Tabla 1: Técnicas utilizadas y alelos detectados. BL: BLAD; DP: DUMPS; CN: Citrulinemia; CVM: Complejo de malformación vertebral; BY: Braquiespina; HH1 y HH4: haplotipos de fertilidad; sd: sin datos.

Se cuenta con técnicas basadas en PCR y PCR- HRM para el diagnóstico de BLAD, DUMPS, BY y CVM para poder implementar un programa de monitoreo de las principales enfermedades hereditarias en nuestro país. Estos resultados fueron validados con los paneles de SNP disponibles comercialmente: GGP- LD 26K y ArBos1. Este último se sugiere para la detección de los haplotipos de fertilidad HH1- HH4, y su respectiva asociación con datos productivos.

Avances en la identificación de vacas Holando-Uruguayo portadoras de CVM mediante *real time* PCR-HRM

Andrea Branda Sica^{1*}, María Teresa Federici¹, Paula Nicolini², Silvia Llambí³

¹INIA Las Brujas, Unidad de Biotecnología. ²Universidad de La República, Centro Universitario de Tacuarembó, Instituto Superior de la Carne, Área Biología Molecular. ³Universidad de La República. Facultad de Veterinaria, Sección Genética. *Email: abranda@inia.org.uy

Palabras clave

Holando, CVM, curvas de disociación de alta resolución

Introducción

La malformación vertebral compleja (CVM) es una enfermedad autosómica recesiva que causa abortos y problemas perinatales. La mutación puntual determinante de esta enfermedad es una sustitución de G por T en la posición 559 del exón 4 del gen *SLC35A3*, que desempeña un papel esencial en el desarrollo del esqueleto axial.

Objetivo general

El objetivo de este estudio fue optimizar la técnica de *real time* PCR-HRM para la detección de vacas Holando portadoras de la mutación puntual de CVM (559G>T *SLC35A3*).

Materiales y métodos

Se trabajó con una muestra de 25 vacas Holando de segunda lactancia, pertenecientes a un tambo comercial de la región Norte del Uruguay. El genotipado se realizó mediante análisis de PCR-HRM con el intercalante fluorescente *EvaGreen* (kit *Type-it® HRM-PCR*, QIAGEN, Hilden, Alemania), utilizando un par de *primers* específicos [1]. 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 y dos *holds* de 10s a 95 °C y 1 min a 45 °C, respectivamente. La fase de HRM se realizó en un rango entre 74,5-84,5 °C con incrementos de 0,1 °C durante 2s.

Resultados

Se detectó la presencia del alelo mutante (T) para CVM (559G>T *SLC35A3*) con un porcentaje de confianza mayor al 90% en dos vacas de la muestra analizada. La sensibilidad de este método fue confirmada mediante el *microarray* *ArBos1 50K* (Instituto de Genética Veterinaria de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina).

Conclusiones

La técnica *real time* PCR-HRM es un análisis rápido, fácilmente interpretable, de bajo costo y altamente eficiente para la detección del alelo mutante del gen *SLC35A3* que permite el genotipado de bovinos para la enfermedad CVM.

Referencia

1. ZhiLing, L., XiaoWei, W., Wei, K., DaoZhong, Z., ZhongYong, L., ZengRong, C., Guo XiaoFeng, G. (2015). Establishment and application of *TaqMan* real-time PCR to detect the complex

vertebral malformation in Holstein cattle. *Journal of South China Agricultural University*, 36(5):26-30.

Principales mutaciones letales y semiletales en terneros Holando de Uruguay

Carolina Briano¹, Agustín Romero¹, Andrea Branda Sica², María Teresa Federici², Marco Dalla Rizza², Silvia Llambi³, Federico Giannitti², Rubén Darío Caffarena², Carlos Omar Schild², María Laura Casaux² y Fernando Dutra Quintela¹

¹DILAVE – Regional Este. ²INIA. ³Facultad de Veterinaria-Área Genética, UdelaR.

Palabras clave

Enfermedades hereditarias, bovinos, Holstein, Braquiespina y Haplotipo Holstein

Introducción

Las enfermedades genéticas en ganado lechero han crecido exponencialmente en la mayoría de los países con ganadería lechera y Uruguay no escapa a esta realidad.

El objetivo de este trabajo fue investigar la presencia y difusión de las principales mutaciones causantes de mortalidad embrionaria, abortos y mortalidad perinatal en terneros de la raza Holando en Uruguay.

Materiales y métodos

Se analizaron muestras de sangre de 383 terneros lecheros neonatos de 27 tambos de la cuenca lechera suroeste de Uruguay, muestreados por INIA La Estanzuela en 2016. El ADN extraído (kit Zymo[®]) se remitió a Neogen GeneSeek, Lincoln, Nebraska, EEUU para su genotipado usando el “GeneSeek Genomic Profiler (GGP) Bovine 50K Bead Chip”, en busca de mutaciones responsables de las enfermedades listadas en la Tabla 1.

Resultados y discusión

Se destaca el alto número de terneros heterocigotos portadores de al menos una o más mutaciones letales o semiletales: 82 en 383 (21,4%), la alta prevalencia de predios afectados, 85%, y la variedad de mutaciones encontradas: 9 en total (Tabla 1).

Tabla 1: Resumen de las mutaciones descubiertas en el transcurso de la investigación (PI: Prevalencia individual, PP: Prevalencia predial, FA: Frecuencia alélica, NTA: número de terneros afectados, NPA: número de predios afectados).

MUTACIÓN	PI (%)	PP (%)	FA	NTA	NPA
DEFICIENCIA DE ADHESIÓN LEUCOCITARIA BOVINA	1,04	14,81	0,01	4	4
COMPLEJO MALFORMACIÓN VERTEBRAL	2,09	14,81	0,01	8	4
BRAQUIESPINA	3,39	25,93	0,02	13	6
DEFICIENCIA DE COLESTEROL	2,61	14,81	0,01	10	4
SINDACTILIA	4,18	22,22	0,02	16	4
Haplotipo Holstein 1	4,44	29,63	0,02	16	8
Haplotipo Holstein 3	3,13	29,63	0,02	12	8
Haplotipo Holstein 4	1,04	11,11	0,001	4	2
Haplotipo Holstein 5	0,26	3,70	0,01	1	1
Prevalencia GENERAL	21,40	85,00			

Conclusión

Las mutaciones responsables las enfermedades hereditarias analizadas están ampliamente difundidas en la población Holando de estudio, lo que permite anticipar que pueden estar generando importantes pérdidas en el ganado lechero de Uruguay. Algunas de las mutaciones identificadas no habían sido identificadas previamente en el país. El impacto económico y productivo de las enfermedades hereditarias de ganado lechero en Uruguay merece ser investigado en mayor profundidad.

La eficiencia del uso de luz y la partición energética en arroz es genotipo dependiente

Gastón Quero^{1,2}, Victoria Bonnacarrère*², Sebastián Fernández³, Pedro Silva¹, Sebastián Simondi⁴, Omar Borsani¹

*¹Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, UdelaR, ²Unidad de Biotecnología, INIA, ³Instituto de Ingeniería Eléctrica, Facultad de Ingeniería, UdelaR, ⁴Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Cuyo, Argentina.
E-mail: vbonnacarrere@inia.org.uy*

Palabras clave

Disipación de la energía, análisis de quenching, análisis de relajación, rendimiento cuántico.

Resumen

Una de las principales limitantes del rendimiento de arroz en regiones de alta performance productiva, como el Uruguay, es la eficiencia del uso de la luz (EUL). La EUL puede determinarse a nivel de planta entera o a nivel del aparato fotosintético. En este último caso la EUL es medida como rendimiento cuántico del fotosistema II (PSII).

El objetivo de este estudio fue analizar la dependencia genotípica de la EUL a nivel de planta entera y del rendimiento cuántico, usando cuatro genotipos de arroz (INIA Parao, INIA Tacuarí, INIA Olimar y El Paso 144) y cuatro ambientes lumínicos diferentes.

Para llevar a cabo los objetivos se diseñaron y desarrollaron para este estudio dos Sistemas de Luces: el Sistema de Luces I que genera ambientes lumínicos blancos (calidad espectral de 400 a 700 nm) y el Sistemas de Luces II que genera ambientes lumínicos azul-rojo (calidad espectral de 400 a 500 nm y de 600 a 700 nm).

La partición de la energía en el PSII fue determinada mediante el rendimiento cuántico de los tres procesos de de-excitación usando parámetros de fluorescencia de la clorofila. Para este objetivo, un análisis de quenching seguido de un análisis de relajación fue realizado. La EUL a nivel de planta fue determinada como diferencia de biomasa de parte área sobre radiación incidente acumulada.

Los ambientes lumínicos condicionaron la EUL y el rendimiento cuántico del fotosistema II (PSII) de todos los genotipos evaluados. En los ambientes blancos, la LUE disminuyó cuando la intensidad lumínica era duplicada, mientras que en los ambientes lumínicos azul-rojo no hubo diferencias en la LUE entre ambientes de diferente intensidad.

Solamente, en ambientes lumínicos blancos, bajos niveles de energía incrementaron el daño del PSII llevando a una disminución de los procesos fotosintéticos mediante el cierre de los centros de reacción. Todos los genotipos de arroz evaluados en este estudio fueron sensibles a bajos niveles de radiación, pero la respuesta fue dependiente del genotipo. INIA Parao fue el

genotipo con mayor foto inactivación en estas condiciones. Por el contrario, INIA Tacuarí no se vio afectado en ninguna de las condiciones evaluadas.

Generación, y caracterización molecular y funcional de plantas de trébol blanco transgénicas con las características de senescencia retardada, tolerancia a aluminio y resistencia a Alfalfa Mosaic Virus (AMV)

Rafael Narancio^{1,2,3}, Yong-Lin Ding¹, Yi-Han Lin¹, Sareena Sahab¹, Stephen Panter¹, Matthew Hayes¹, Ulrik John¹, John Mason^{1,2}, German Spangenberg^{1,2}

1. Agriculture Victoria Research, AgriBio the Centre for AgriBioscience, La Trobe University VIC 3086, Australia
2. School of Applied Systems Biology, La Trobe University, VIC 3086, Australia
3. Instituto de Investigación Agropecuaria (INIA). Unidad de Biotecnología. Estación Experimental INIA Las Brujas, Ruta 48 km 10, Canelones, Uruguay.

El trébol blanco (*Trifolium repens* L.) es una leguminosa forrajera perenne cuyo uso es extendido en áreas templadas. En Australia, el uso de trébol blanco es un componente importante de los sistemas productivos del sudeste. Sin embargo, estreses como toxicidad por aluminio, estrés hídrico, e infección por virus reducen la productividad de la especie.

En trabajos previos a este proyecto se reportó la generación de plantas de trébol blanco genéticamente modificadas con resistencia a Alfalfa Mosaic virus (AMV), senescencia retardada en hojas, y tolerancia a aluminio. Se observó que eventos transformados con el gen *Isopentenil transferasa (IPT)*, controlado por el promotor *Atmyb32*, exhibieron senescencia retardada en hojas, y eventos que expresaban el gen *CP-AMV* que codifica para la proteína de la cápside del virus presentaron resistencia a AMV en condiciones de campo. Además, eventos transformados con dos transgenes, *TrneMDH*, que codifica para la enzima Malato deshidrogenasa, y *CP-AMV*, en un T-DNA único, exhibieron resistencia a AMV y un crecimiento superior de raíz en condiciones de toxicidad por aluminio.

En este proyecto, se diseñó un constructo con los tres transgenes mencionados en un único T-DNA, *Atmyb32:IPT::TrPt1:TrneMDH::CaMV35S:CP-AMV* y se generaron plantas transgénicas utilizando transformación mediada por *Agrobacterium*. Se realizó una caracterización molecular de los eventos, que incluyó presencia de los transgenes, número de copias y expresión de los tres transgenes. Se fenotiparon los eventos para senescencia retardada en hojas, estrés hídrico, y tolerancia a aluminio.

Se generó un total de 30 eventos transgénicos que contenían el inserto completo con los tres transgenes de interés. Un 43% de los eventos presentó copia única del inserto. Se verificó la expresión de los transgenes, lo que confirma la funcionalidad del T-DNA insertado. Doce eventos de los 30 evaluados presentaron un retardo en la senescencia, y dos eventos exhibieron mayor producción de forraje en condiciones limitantes de agua. Asimismo, se identificaron dos eventos con potencial tolerancia a aluminio en suelo. Al menos cinco eventos

con bajo número de copias, T-DNA funcionales, y con los fenotipos esperados serán seleccionados para ser utilizados en los pasos siguientes de mejoramiento.

Aportes al conocimiento de *Citrus tristeza virus* en Uruguay

Maeso, D.¹; Rubio, L.¹; Benítez-Galeano, M.J.², Hernández-Rodríguez, L.¹, Bertalmío, A.¹, Arruabarrena, A.¹ Rivas, C.¹; Colina, R.²

¹ Programa Nacional de Producción Citrícola, INIA. dmaeso@inia.org.uy

² UdelaR, Laboratorio de Virología Molecular, CENUR Regional Norte, Salto.

Palabras claves: Citrus tristeza virus, CTV, caracterización de aislamientos

La tristeza de los cítricos causada por *Citrus tristeza virus* (CTV) es una de las enfermedades a virus más importantes del cultivo. En Uruguay causó importantes pérdidas a mediados del siglo pasado obligando a la plantación exclusivamente sobre portainjertos resistentes (*Poncirus trifoliata* y sus híbridos) para prevenir la muerte de plantas. Sin embargo, actualmente es común observar acanaladuras de ramas y tronco en naranjo dulce y pomelo, así como reducción en el tamaño de frutos que evidenciarían la presencia de aislados severos de este virus. Se ha demostrado la coexistencia en una misma planta de aislados con diferente capacidad de producir síntomas y la capacidad que tienen algunas cepas débiles para proteger de los efectos de cepas severas está siendo utilizada comercialmente en varias regiones citrícolas (protección cruzada). Dada la importancia de las enfermedades transmitidas por materiales de propagación, desde algunos años es obligatorio el uso de plantas cítricas certificadas, las cuales se encuentran libres de CTV por análisis. Sin embargo, ante la presencia de un vector eficiente (*Toxoptera citricida*) y de cepas severas, existe el peligro que éstas predominen en la reinfección en el campo de los materiales certificados generando efectos no deseados. Para ello se comenzó una línea de trabajo tendiente a implementar la pre-inmunización de las plantas saneadas (protección cruzada). En una primera etapa se realizó la caracterización biológica y molecular de 38 aislados colectados en plantaciones comerciales. La intensidad y tipo de síntomas en cuatro indicadoras (lima mejicana, pomelo Duncan, naranjo dulce, naranjo amargo) en condiciones controladas evidenció el predominio de cepas "severas" (70-80%). La caracterización molecular mediante RT-PCR usando primers para los genes p25, p20 y p23 mostró la gran diversidad de poblaciones virales presentes siendo los genotipos mayoritarios los genotipos VT concordando con lo encontrado en la región y genotipos que se denominaron "NC" (nuevo clado) con características singulares. También se constató la presencia de genotipos RB (resistance breaking), de reciente reporte, con capacidad de quebrar la resistencia de los portainjertos en uso. Un relevamiento masivo posterior confirmó esa información siendo la infección por CTV en plantaciones comerciales superior al 85% con predominancia del genotipo NC. En una segunda etapa los aislados de campo promisorios (reacción leve) fueron separados mediante transmisión por un único áfido (SAT) obteniéndose 40 sub-aislados, de los cuales, luego de ser caracterizados biológica y molecularmente, dos están siendo evaluados en pruebas de desafío con cepas severas. Las actividades incluidas en esta línea de trabajo, comenzada en 2011, han confirmado el predominio de cepas severas de CTV, correspondientes en su mayoría a los genotipos VT y NC, la presencia de genotipos RB con la importancia que eso significa y han permitido identificar dos sub-aislados suaves derivados de SAT promisorios que están siendo evaluados en desafíos con cepas severas para conocer su potencial en protección cruzada.

Propagación de portainjertos de pera en biorreactores de inmersión temporal

Castillo¹ Alicia, Cabrera² Danilo, Rodríguez² Pablo y Roberto Zoppolo².

1. Unidad Técnica de Biotecnología, INIA Las Brujas Ruta 48 km 10, Canelones.
2. Programa Nacional de Fruticultura, INIA Las Brujas Ruta 48 km 10, Canelones.

Palabras clave: micropropagación, medio líquido, vitrificación.

La pera es uno de los frutales de clima templado más importantes a nivel mundial. Uruguay produce pera de muy buena calidad con un tonelaje variable a través de los años, siendo una de las frutas con un valor de exportación destacado. Desde el Repositorio Nacional de Germoplasma de Corvallis (NCGR), se introdujeron a nuestro país algunos portainjertos nuevos de una serie de Old Home x Farmingdale (OHxF) de la colección de germoplasma de pera del Departamento de Agricultura de E.E. U.U. El objetivo fue evaluar nuevos pies y tratar de identificar materiales mejor adaptados a las condiciones locales del suelo y del clima. Entre ellos se seleccionó el OHxF40, debido a sus características de menor vigor así como a la resistencia al fuego, a la podredumbre de la corona, al pulgón lanífero y al decaimiento del peral. Para alcanzar un alto número de plantas en el menor tiempo posible, se evaluaron diferentes sistemas de multiplicación in vitro: medios sólidos y biorreactores de inmersión temporal con dos medios de cultivo diferentes en cada sistema. La automatización de la micropropagación en biorreactores ha sido considerada como una posible forma de reducir el costo de propagación, el éxito en estos sistemas depende de una mejor comprensión de las respuestas fisiológicas y bioquímicas de la planta a las señales del ambiente y de una optimización de las condiciones físicas y químicas específicas de la especie en la regulación de la morfogénesis de las plantas de pera en ambos sistemas. Se evaluaron dos medios de cultivo: el medio convencional de Murashige Skoog (MS) que fue comparado con un medio enriquecido en tres elementos: calcio, magnesio y potasio, donde la cantidad normal de esos elementos en el MS se incrementó 2,5 veces. En todos los casos se utilizó 4,44 μ M de benciladenina como único regulador de crecimiento. En medio sólido, se observaron diferencias significativas en la altura de la planta; el mejor tamaño de la planta se logró con los medios enriquecidos con sales en comparación con la composición convencional del MS. En medio sólido no hubo diferencia significativa en la tasa de multiplicación en los dos medios de cultivo. La mayor tasa de multiplicación (24) se observó en biorreactores de inmersión temporal con medios enriquecidos con sales, mientras que la más baja se encontró en medios sólidos con composición convencional de MS (4). En ninguno de los sistemas de cultivo se observó la aparición de plantas vitrificadas. La calidad de planta obtenida fue excelente en todos los medios de cultivo, y permitió el pasaje a enraizamiento de plantines de más de 2 cm de altura.

Primer uso de Marcadores Moleculares para la diferenciación de aislados de *Claviceps paspali* en Uruguay.

Oberti H.¹, Murchio S.¹, Reyno R.², Dalla Rizza M.¹, Abreo E.³

1-Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas. 2- Programa Nacional de Forraje y Pasturas, INIA Tacuarembó. 3-Laboratorio de Bioproducción, INIA Las Brujas.
hoberti@inia.org.uy

Palabras Claves: *Claviceps paspali*, Diversidad Genética, RAPD, UPGMA, *Paspalum spp.*

El ascomycete fitopatógeno *Claviceps paspali* es altamente específico de gramíneas del género *Paspalum*. Infecta exclusivamente ovarios jóvenes, reduciendo la formación de semillas, y en su lugar forma esclerocios que contienen alcaloides tóxicos que generan cuadros clínicos en el ganado que lo consume. Aunque la infección con *C. paspali* es una de las principales causas que limita el uso de gramíneas con alta calidad forrajera como *Paspalum dilatatum*, muy pocos estudios se han realizado sobre este hongo y su diversidad. Se realizó una prospección de material vegetal con síntomas de la enfermedad, tanto de esclerocio como de mielecilla en diferentes regiones de Uruguay. Se obtuvieron aislamientos con las características de *C. paspali*, y luego se realizó su identificación filogenética basada en secuencia parcial del gen que codifica para la β -tubulina. El estudio de la variabilidad genética se realizó mediante el análisis de Amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) por su facilidad de uso. Esta es la primera aplicación del sistema de marcadores RAPD en el estudio de diferentes aislados de esta especie. De trece *primers* evaluados dos de ellos fueron seleccionados para diferenciar los 23 aislados. Estos aislados fueron obtenidos de material vegetal enfermo de dos especies (*P. dilatatum* y *P. plicatulum*) y de dos regiones del país (Norte y Sur del Río Negro). El análisis mediante UPGMA basado en presencia-ausencia de bandas permitió diferenciar cinco grupos: uno asociado a la especie *P. plicatulum* y cuatro a *P. dilatatum*. Dentro de estos últimos, se pudo observar un agrupamiento según origen geográfico. En conclusión, se demostró que existe diversidad de poblaciones de *C. paspali* en Uruguay, y que estas pueden estar asociadas al origen geográfico y al huésped. Se continuarán estudios buscando asociar los genotipos con las características de virulencia y toxicidad de las cepas.

Metagenómica aplicada al estudio de genes de resistencia a antibióticos en comunidades bacterianas en establecimientos ganaderos

Ing. Agr. MSc. PhD. Pablo Rovira
Programa Nacional de Producción de Carne y Lana
INIA Treinta y Tres, provira@inia.org.uy

Palabras claves: ganadería, metagenómica, resistencia antimicrobiana

El análisis metagenómico consiste en el secuenciado de ADN bacteriano para determinar la abundancia relativa de grupos taxonómicos y la presencia de genes de interés, como genes bacterianos que confieren resistencia a antibióticos (R-Ab). Actualmente, existe una discusión sobre la contribución relativa del uso de antibióticos en animales y humanos a la problemática global de la resistencia antimicrobiana. Una alternativa en discusión es eliminar drásticamente el uso de antibióticos en ganadería, como ocurre en los protocolos de producción “naturales” u “orgánicos”.

La aplicación del análisis metagenómico en estudios realizados en Estados Unidos y Canadá permitió estudiar el conjunto de genes R-Ab (“resistoma”) en comunidades bacterianas (“microbiomas”) en establecimientos ganaderos criando animales con o sin el uso de antibióticos (C-Ab y S-Ab, respectivamente). Se tomaron muestras de heces de los animales, de efluentes en las lagunas de almacenamiento y del suelo donde los efluentes habían sido aplicados. Luego de la extracción y secuenciado de ADN bacteriano, las secuencias metagenómicas fueron alineadas a bases de datos para la clasificación taxonómica e identificación de genes R-Ab a través del uso de diferentes procedimientos bioinformáticos.

En primer lugar, todas las muestras contenían genes R-Ab, incluso aquellas obtenidas de establecimientos S-Ab, confirmando que la resistencia antimicrobiana es un fenómeno natural dable de esperar en genomas bacterianos. Sin embargo, en general, las heces de los animales criados C-Ab presentaron una mayor abundancia relativa de genes R-Ab comparado con muestras de animales S-Ab. En total se encontró resistencia a más de 10 clases de antibióticos, predominando genes resistentes a tetraciclinas, macrólidos y β -lactámicos. Esto sugiere que, si bien la resistencia antimicrobiana es natural, puede ser favorecida mediante el uso de antibióticos en animales a través de la promoción de grupos bacterianos portadores de genes R-Ab. La composición del resistoma y microbioma en heces de animales, efluentes y suelos fue diferente, sugiriendo nichos ecológicos distintos y una baja probabilidad de que la aplicación esporádica de efluentes de animales genere cambios significativos en suelos agrícolas.

El análisis metagenómico es un enfoque promisorio para la vigilancia y control de comunidades bacterianas y sus genes R-Ab en ambientes agropecuarios. Es necesaria

mayor investigación para clasificar los distintos resistomas en términos del riesgo para salud pública, no sólo determinar la presencia del gen R-Ab sino también el huésped (bacteria comensal o patógeno) y su ubicación en el genoma (en cromosoma bacteriano o en elemento genético móvil).

Aplicación de microesclerocios del hongo entomopatógeno *Metarhizium* spp. en coberturas de semillas para el control biológico de enfermedades y plagas de suelo

Rivas F.¹, Hampton J.², Rostás M.², Altier N.¹, Wessman P.², Jackson T.³ & Travis G.²

¹INIA, Las Brujas (Uruguay); ²Bioprotection Research Centre (Lincoln, Nueva Zelanda);

³AgResearch (Lincoln, Nueva Zelanda), frivas@inia.org.uy

Palabras clave: *Metarhizium* spp., biocontrolador, rizosfero-competente, cobertura de semillas, microesclerocios

Introducción

Metarhizium spp. es un hongo entomopatógeno comúnmente usado desde hace varias décadas en el control biológico de insectos plaga. Conidios de este bioinsecticida son en general formulados en polvo para aspersiones foliares, o como gránulos para ser aplicados directamente al suelo. En condiciones óptimas, los conidios son efectivos en generar micosis en insectos, sin embargo, la exposición a temperaturas altas, radiación UV y humedad desfavorable limitan su supervivencia. En años recientes, se determinó que *Metarhizium* en cultivo líquido es capaz de producir estructuras de resistencia conocidas como microesclerocios, que con humedad y temperatura apropiada son capaces de producir conidias frescas directamente en el sitio de aplicación. Por su parte, *Metarhizium* spp. no sólo tiene la capacidad de infectar insectos, sino que también es capaz de asociarse a rizosfera de las plantas aportando a la nutrición vegetal.

Objetivos

El objetivo principal fue desarrollar una nueva forma de aplicación de *Metarhizium* spp, por medio de la incorporación de microesclerocios a coberturas de semillas.

Materiales y métodos

Microesclerocios de *Metarhizium* spp. fueron obtenidos por fermentación sobre sustrato líquido, cosechados y aplicados en una cobertura de semillas de maíz. Las semillas tratadas fueron sembradas en macetas con sustrato que contenían, también *Fusarium graminearum* y dos larvas de *Costelytra giveni*. Al cabo de dos semanas de crecimiento en condiciones controladas se determinó el peso seco de las plantas, el porcentaje de mortalidad de larvas y la presencia de síntomas de infección con *F. graminearum*. Además, se observó la capacidad de *Metarhizium* de colonizar la rizosfera por técnicas de microscopía confocal de barrido laser.

Resultados

Se determinó que *Metarhizium* spp. es capaz de establecerse en la rizosfera y que el grado de colonización varía entre las diferentes especies estudiadas. Las plantas de maíz tratadas, dependiendo también de las especies de *Metarhizium* usadas, presentaron entre 20 a 40% menos de síntomas de infección con *F. graminearum* y entre 30 a 65% de larvas micosadas.

Conclusiones

Metarhizium spp. puede ser aplicado a la superficie de las semillas en forma de microesclerocios y de esta forma, usar el potencial de establecimiento en la rizosfera para el control biológico de hongos fitopatógenos y de insectos de suelo.