

Primer Taller Uruguayo sobre

Producción de Agentes Microbianos de Control Biológico



INIA - La Estanzuela

Colonia, Uruguay

21 y 22 de Marzo 2006

Primer Taller Uruguayo sobre

Producción de Agentes Microbianos de Control Biológico

Realizado en las instalaciones de

INIA - La Estanzuela

Colonia, Uruguay

21 y 22 de Marzo de 2006

Notas del Taller y Resúmenes de las Presentaciones

El siguiente Libro de resúmenes recopila los trabajos expuestos en este Taller y la información contenida en él no deberá ser citada ni reproducida sin el expreso permiso de los autores.

Organizado y Editado por Rosario Alzugaray, INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay (ralzugaray@inia.org.uy) & Gabriel Visnovsky, AgResearch, PO Box 60, Lincoln, New Zealand (gabriel.visnovsky@agresearch.co.nz)

COMITÉ ORGANIZADOR

Gabriel Visnovsky (AgResearch, New Zealand)

Silvia Pereyra (INIA La Estanzuela)

Carolina Leoni (INIA Las Brujas)

Enrique Castiglioni (Fac. Agronomía, EEMAC)

Adela Ribeiro (Fac. Agronomía, EEMAC)

César Basso (Fac. Agronomía)

Lina Bettucci (Fac. de Ciencias)

Sandra Lupo (Fac. de Ciencias)

Carlos Negro (INIA)

John Grierson (INIA)

Rosario Alzugaray (INIA La Estanzuela)

Contenido

Comite organizador	2
Prefacio	4
Carta: 17 de marzo de 2006	5
Trabajos presentados	8
Nombre y dirección de todos los participantes	50
Resumen y Conclusiones	57
Fotocopia de los trabajos de los grupos	59
Nuestra carta	73
Foto	74

PREFACIO

Existe una creciente y sostenida demanda a nivel mundial para reemplazar los insecticidas químicos por biológicos. Esta demanda está basada en dos pilares fundamentales: la necesidad real de dar respuesta a los problemas de salud y contaminación ambiental ocasionados por el uso de los plaguicidas químicos derivada de su uso indiscriminado y la necesidad de satisfacer la demanda de los agricultores de contar con agentes de control de plagas que sean totalmente inocuos para la salud humana y el medio ambiente para responder, de este modo, a la también sostenida y creciente demanda de los consumidores a nivel mundial por alimentos producidos orgánicamente.

En el camino para el desarrollo de un microorganismo en un agente de control biológico están involucrados múltiples factores. Dentro de estos, la producción eficiente y económica en condiciones controladas juega un papel crucial para su manufactura real en gran escala. El potencial real que existe para avanzar en la Bioproducción de Microorganismos ha sido el estímulo para la realización de este Primer Taller Uruguayo sobre Producción de Agentes Microbianos de Control Biológico.

Los objetivos de este Taller fueron la identificación de los principales agentes de control biológicos a ser desarrollados acorde a las necesidades uruguayas, el análisis de la situación actual de la producción de agentes de control biológico en Uruguay, la identificación de las necesidades en materia de conocimiento y tecnología para desarrollar esta industria, los problemas y desafíos a resolver por ellas en el corto, mediano y largo plazo, y el análisis económico de todos estos factores dentro del marco de una agricultura sustentable y del desarrollo de procesos de bioproducción rentables y efectivos. Un objetivo ambicioso de este Taller fue el de iniciar la coordinación de grupos de investigación uruguayos que han identificado la misma problemática y que se encuentran hoy trabajando dispersos en el tema.

Como organizadores, no podemos más que expresarles nuestra gran satisfacción por el nivel de respuesta obtenido por la comunidad social, científica y empresarial que participó y debatió profundamente estos temas durante dos días.

Este Taller demostró que esta es un área estratégica en la cual Uruguay puede y debe desarrollarse: el establecimiento de las bases científicas y tecnológicas que permitan su desarrollo serán coherentes en la práctica con la definición de país Natural que el Uruguay posee.

Ing. Agr. Rosario Alzugaray

Dr. Gabriel Visnovsky

Responsables por el Comité Organizador
La Estanzuela, Colonia, Uruguay, 4 de abril, 2006.



INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACION AGROPECUARIA

17 de marzo de 2006

Estimados colegas:

Por la presente tenemos el gran agrado de invitarlos a participar en el "Primer Taller Uruguayo sobre Producción de Agentes Microbianos de Control Biológico" a realizarse en INIA La Estanzuela, Colonia, el próximo 21 y 22 de Marzo de 2006.

El desarrollo de sistemas "limpios" o no contaminantes dentro del marco de una agricultura sustentable a largo plazo requiere del desarrollo y la implementación de nuevas tecnologías biológicas para proteger y mejorar nuestros sistemas de producción de cultivos. Microorganismos benéficos para la agricultura pueden ser usados como inoculantes, bioinsecticidas o para bioremediación. El desafío para el futuro es desarrollar sistemas de producción y aplicación económicos y eficientes que permitan la utilización masiva de estos microorganismos benéficos para satisfacer la creciente demanda, principalmente en agricultura y horticultura.

La temática central del taller se centralizará en la identificación de los principales agentes de control biológicos a ser desarrollados acorde a las necesidades uruguayas, el análisis de la situación de la producción de agentes de control biológico en Uruguay, la identificación de las necesidades en materia de conocimiento y tecnología para desarrollar esta industria, los problemas y desafíos a resolver por ellas en el corto, mediano y largo plazo, y el análisis económico de todos estos factores dentro del marco de una agricultura sustentable y del desarrollo de procesos de bioproducción rentables y efectivos. Asimismo, tópicos como mercado internacional de agentes de control biológico y estado actual de la industria que los produce, procesos de producción y optimización de agentes de control biológico en bioreactores y otros sistemas, formulación, desarrollo de sistemas de control de calidad y análisis de productos actuales y en vías de desarrollo.

Han sido invitados a presentar sus experiencias técnicos uruguayos que trabajan en esta área, así como colegas de Brasil, Argentina y Nueva Zelandia que han liderado, en sus respectivos países, proyectos reconocidos en control biológico de plagas y enfermedades agrícolas. Además de la puesta en común de experiencias concretas, con diferente grado de desarrollo, se plantea trabajar en grupos reducidos para facilitar la discusión profunda de las posibilidades de avance en esta área de control de plagas y enfermedades en nuestro país.

Esperamos contar con su presencia, quedamos a la espera de su respuesta con un muy cordial saludo,

Comité Organizador



INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACION AGROPECUARIA

PRIMER TALLER URUGUAYO SOBRE
PRODUCCIÓN DE AGENTES MICROBIANOS DE CONTROL BIOLÓGICO

INIA LA ESTANZUELA
21 y 22 de marzo de 2006

PROGRAMA

Martes 21

08:30-09:00	Acreditaciones
09:00-09:30	Apertura por autoridades
09:30-09:45	Explicación de la mecánica de la reunión
09:45-10:30	BRASIL- Dr. Flavio Moscardi (EMBRAPA CNPSO)
10:30-11:00	Café
11:00-11:40	ARGENTINA – Dr. Roberto Lecuona (INTA Castelar)
11:40-12:20	NUEVA ZELANDIA – Dr. Trevor Jackson (AgResearch, Lincoln)
12:20-13:00	URUGUAY – Dra. Nora Altier/Ing. Agr. R. Alzugaray (INIA)
13:00-14:00	Almuerzo
14:00-17:00	Trabajo en grupos
17:00-18:00	Plenaria
21:00	Cena de camaradería en Colonia

Miércoles 22

08.30-08.45	Lupo Sandra, Fac. Ciencias. Control biológico de insectos de importancia forestal: Ensayos preliminares para el control de hormigas cortadoras y <i>Gonipterus</i> spp.
08.45-09.00	Sánchez Alicia, Fac. Ciencias. Control biológico de insectos de importancia forestal: Caracterización ecofisiológica de cepas de <i>Beauveria bassiana</i> para el control de <i>Phoracantha</i> spp.
09.00-09.15	Pereyra Silvia, INIA. Control biológico de Fusariosis de la espiga en trigo y cebada
09.15-09.30	Cabrera Mónica, Fac. Química. Estrategias de control biológico para el manejo integrado de la fusariosis en trigo.
09.30-09.50	Lecuona Roberto, IMYZA (Argentina). Desarrollo de micoinsecticidas en Argentina.
09.50-10.05	Romero Graciela, Facultad de Agronomía. Avances en Control biológico por <i>Trichoderma harzianum</i> Fr. en especies forestales.
10.05-10.20	Bernal Roberto, INIA. Efecto de diferentes tratamientos con <i>Trichoderma harzianum</i> sobre el control de <i>Botrytis cinerea</i> en el cultivo de tomate bajo cubierta.
10.20-10.35	Café.
10.35-10.45	Garmendia Gabriela, Fac. Química. Control biológico de patógenos postcosecha de manzana y citrus.
10.45-11.10	Sosa-Gomez Daniel, EMBRAPA. Producción de hongos entomopatógenicos en Brasil.

11.10-11.35	Monnerat Rose, EMBRAPA. Desarrollo de bioinsecticidas a base de <i>Bacillus thuringiensis</i> para el control de insectos.
11.35-12.00	Berry Colin, Univ. Cardiff (UK). Mejorando cepas para el control biológico: logros y problemas.
12.00-12.15	Rodriguez, Alda. Aislamiento y uso de hongos entomopatógenos para el control de plagas de importancia económica en Uruguay.
12.15-12.30	Baraibar Amalia, Lage y Cía. Experiencia Nacional en Producción y Comercialización de Agentes Microbianos
12.30-13.30	Almuerzo
13.30-13.45	Yanes Lis, IIBCE. Caracterización de <i>Pseudomonas fluorescens</i> nativas como promotoras del crecimiento de la alfalfa
13.45-14.00	Quagliotto Leticia, IIBCE. <i>Pseudomonas fluorescens</i> UP148: agente de control biológico adecuado para la formulación de un inoculante de aplicación en leguminosas forrajeras.
14.00-14.15	van Lenteren Joop, IOBC. How does IOBC promote the implementation of Biological Control?
14.15-14.30	Chiaravalle Willy, Act. Privada. Producción y utilización a campo de un bioinsecticida basado en el virus de Polihedrosis nuclear de <i>Rachiplusia nu</i> (Lepidoptera:Noctuidae), lagarta del girasol en Uruguay.
14.30-14.50	Moscardi Flávio, EMBRAPA. Producción de baculovirus en Brasil
14.50-15.10	Café
15.10-15.30	Claus Juan, Univ. del Litoral (Argentina). Hacia el desarrollo de un proceso factible para la producción de bioinsecticidas virales en cultivos de células de insectos
15.30-15.50	Visnovsky Gabriel, AgResearch (Nueva Zelandia). Optimización de procesos para la producción en gran escala de agentes de control biológico
15.50-16.10	Jackson Trevor, AgResearch (Nueva Zelandia). Formulation of microbes for stable bio-products
16.10-16.30	Ares Inés, MGAP DGSA. Norma Internacional sobre importación, exportación y liberación de ACB.
16.30-16.50	Plenaria
16.50-17.50	Cierre y conclusiones

CONTROL BIOLÓGICO DE INSECTOS PLAGA DE INTERÉS FORESTAL: HORMIGAS CORTADORAS Y GORGOJO DEL *Eucalyptus*

Sandra Lupo¹, Paolo Giamberini¹, Alicia Sánchez¹, Guillermo Pérez¹, Lina Bettucci¹

La definición de control biológico tiene variaciones pero siempre hace referencia al uso de uno o más organismos capaces de controlar agentes causales de plagas o enfermedades. El Laboratorio de Micología de la U. de la R. ha iniciado hace un tiempo un programa de investigación a largo plazo sobre biocontrol de patógenos y plagas forestales con el propósito de atender los problemas fitosanitarios de acuerdo con las exigencias de las normativas internacionales sobre protección del medio ambiente.

Control biológico de hormigas cortadoras

Con el propósito de reducir el uso de hormiguicidas se inició una selección de hongos capaces de infectar individuos pertenecientes a *Acromyrmex* spp. Se evaluaron para ello 6 cepas de *Beauveria bassiana* y una de *Metarhizium anisopliae* en condiciones de laboratorio. La infección bajo condiciones de laboratorio mostró que el tiempo letal medio para la cepa más virulenta de *B. bassiana* fue menor a 5 días con una concentración de 10^7 propágulos/ml. Este tiempo fue de 6 días para *Metarhizium* a la misma concentración (Figura 1 A y B).

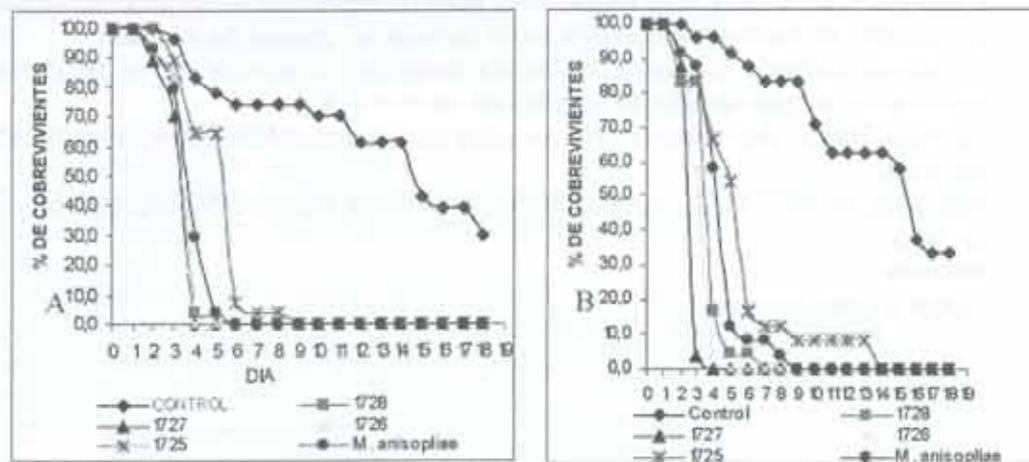


Figura 1. Supervivencia de *A. heyeri* (A) y *A. hispidus* (B) tratadas con *M. anisopliae* y *B. bassiana*.

Se realizaron ensayos bajo condiciones de campo con una cepa de *Metarhizium* y una cepa de *Beauveria*. Para ello se aplicó a hormigueros de *A. lundii* una formulación en polvo que contenía 10^8 esporas por gr. La efectividad de los tratamientos se evaluó mediante la reducción del flujo de hormigas en las semanas siguientes a la inoculación. La mayoría de los hormigueros tratados con *Metarhizium* redujeron su actividad después del primer tratamiento. Después del tercer tratamiento se observó una reducción total de la actividad en todos los hormigueros y la desaparición de los caminos. Los hormigueros tratados con *B. bassiana* mantuvieron su actividad normal. Tanto *Metarhizium* como *Beauveria* fueron virulentos en condiciones de laboratorio pero en condiciones de campo solo la formulación con *Metarhizium* fue efectiva.

Control biológico del gorgojo del *Eucalyptus*

Gonipterus spp. es un defoliador específico del género *Eucalyptus*. El daño es producido por los adultos que se alimentan del borde de las hojas jóvenes dejando un aspecto festoneado de la hoja y por las larvas que se alimentan del mesófilo de la hoja. Dado que el uso de insecticidas en las plantaciones no es una alternativa efectiva, se utiliza para su control *Anaphes nitens* que es un controlador natural parasitoide de huevos. No obstante esta práctica, no siempre es suficiente para reducir las poblaciones de *Gonipterus* sp. Debido a ello se propone otra alternativa de biocontrol utilizando hongos entomopatógenos

que ocurren naturalmente como epizootias. Los ensayos preliminares realizados con dos especies de hongos entomopatógenos, *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*, en laboratorio mostraron una alta virulencia frente a estos insectos. Se evaluó la mortalidad de adultos infectados con una suspensión de 10^7 esporas por ml. El tiempo letal medio fue de 8 días (Fig. 2). Todos los individuos tratados presentaron infección por *Metarhizium*. Para evaluar el efecto de *Metarhizium* y *Beauveria* sobre larvas en condiciones de campo, se trataron 30 árboles con presencia de una alta densidad de larvas en diferentes estadios de *Gonipterus* con una suspensión de conidios de *Beauveria* y *Metarhizium* a una concentración de 10^9 conidios/ml de cada uno de los hongos. A los 8 días (luego) de la aplicación se recogieron todos los individuos muertos caídos sobre el nylon colocado debajo de la copa. Se obtuvo un 40 % de larvas muertas infectadas por los hongos entomopatógenos. Este porcentaje corresponde a la mortalidad neta. Un bajo porcentaje mostró la presencia de los dos hongos en una misma larva y la mayoría de las larvas murieron debido a la infección producida por *B. bassiana* (Figura 3). La infección se hizo evidente por la coloración rosácea que adquieren las larvas muertas y la posterior fructificación del hongo. Tanto *Beauveria* como *Metarhizium* son capaces de infectar individuos adultos (en condiciones de laboratorio) y larvas en distintos estadios. La aplicación puede realizarse cuando los niveles poblacionales de *A. nitens* son bajos, con lo cual no se ejerce un efecto negativo sobre la población del parasitoide. La cepa de *Beauveria* fue más virulenta ya que se recuperó en mayor número de larvas. La estrategia de aplicación a campo fue efectiva para el control de larvas.

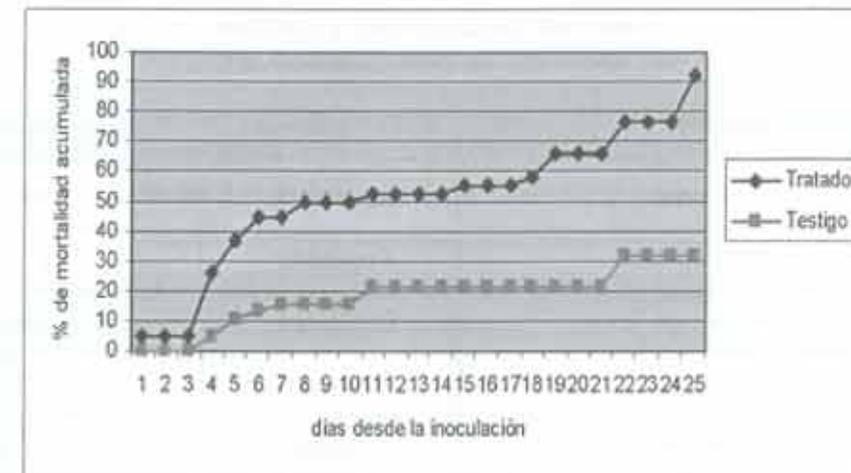


Figura 2. Mortalidad acumulada (%) de adultos de *Gonipterus* sp. luego de la aplicación de propágulos de *Metarhizium anisopliae*

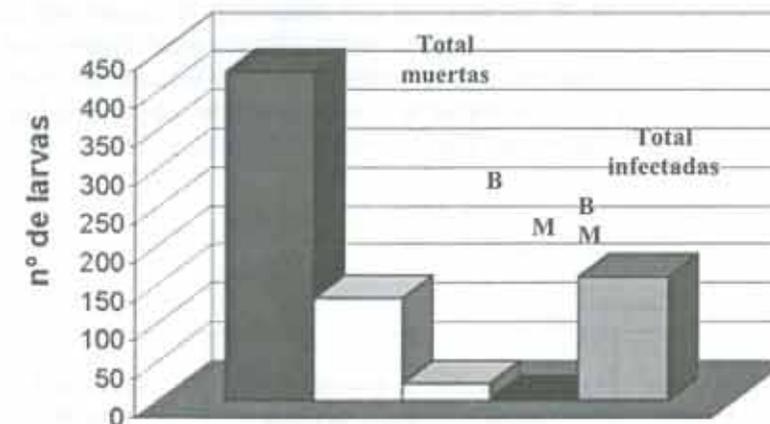


Figura 3. Mortalidad total de larvas en condiciones de campo de *Gonipterus* sp. tratadas con *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*.

¹ Laboratorio de Micología. Facultad de Ciencias/Fac. Ingeniería.

CONTROL BIOLÓGICO DE *Phoracantha recurva* POR *Beauveria bassiana*

Alicia Sánchez¹, Sandra Lupo², & Lina Bettucci²

Las plantaciones de *Eucalyptus* son afectadas por diversas plagas, entre ellas *Phoracantha recurva* y *Phoracantha semipunctata*. Estas especies fueron introducidas en Uruguay y potencialmente pueden constituir una plaga como ocurre en otras regiones donde las plantaciones se ven afectadas periódicamente por condiciones de estrés. El control químico de estos insectos no ha resultado viable ya que la mayor parte de su desarrollo permanece oculto en el hospedero y es muy costoso. *Beauveria bassiana* es un hongo entomopatógeno que ocurre en condiciones naturales, enzoóticamente o provocando epizootias en varias plagas. Este hongo ha sido utilizado para controlar insectos perjudiciales en diversas plantaciones forestales. Con la finalidad de evaluar la posibilidad de efectuar el control biológico de *P. recurva* (se aislaron), cepas de *Beauveria* a partir de cadáveres de *P. recurva* muertos naturalmente en el campo en diferentes localidades del país (Tabla 1).

Tabla 1. Cepas aisladas de adultos de *P. recurva* y *P. semipunctata* naturalmente infectados en diferentes localidades de Uruguay.

Características del micelio y conidios.

Cepas	Hospedero	Departamento	Tamaño de los conidios (l)ª
MVHC 11723	<i>P. recurva</i>	Tacuarembó	1.9 ± 0.72 x 1 ± 0.5
MVHC 11724	<i>P. semipunctata</i>	Paysandú	2.0 ± 0.2 x 2.0 ± 0.2
MVHC 11725	<i>P. recurva</i>	Canelones	2.0 ± 0.6 x 2.1 ± 0.5
MVHC 11726	<i>P. recurva</i>	Río Negro	1.6 ± 0.3 x 2.0 ± 0.1
MVHC 11727	<i>P. recurva</i>	Lavalleja	2.0 ± 0.4 x 2.0 ± 0.5
MVHC 11728	<i>P. recurva</i>	Paysandú	2.5 ± 0.3 x 2.6 ± 0.3

Con el objetivo de seleccionar una de las 6 cepas para los estudios de patogenicidad se determinaron algunas características ecofisiológicas de las mismas. Se determinó la capacidad de producir enzimas proteolíticas (medio utilizado agar-gelatina) y lipolíticas (medio utilizado agar-Tween) así como la capacidad de germinación de las esporas de las distintas cepas a diferentes actividades hídricas, temperatura y pH. La cepa seleccionada para evaluar la patogenicidad en condiciones de laboratorio fue la MVHC 11727, la cual presentó alta capacidad de germinar en las condiciones ensayadas y produjo los más altos niveles de proteasas y lipasas (Tabla 2).

Tabla 2. Características ecofisiológicas de la cepa MVHC 11727

% germinación aw=0.99	% germinación 25°C y aw=1	% germinación pH 6	% germinación pH 5.5	Actividad Proteolíticaª	Actividad Lipolíticaª
98.9 ± 1.9	63.9 ± 2.5	94.0 ± 5.3	96.7 ± 1.2	1.40	1.34

¹ Tesista de Maestría PEDECIBA, Biología. Tutor: Dra. Lina Bettucci

² Laboratorio de Micología, Fac. de Ciencias-Fac. de Ingeniería

a: índice que representa las actividades enzimáticas expresadas como cociente entre los diámetros de las zonas degradadas y los de crecimiento. Valores 1 d^a, indican zonas degradadas solamente debajo de la colonia, valores e^a1, indican la secreción de enzimas en el medio resultando en una zona degradada alrededor de la colonia.

Los insectos, mantenidos en cámaras de cría se inocularon por inmersión en suspensiones de propágulos a distinta concentración. Se determinó el tiempo letal medio (LT₅₀) a distintas concentraciones de conidios y la dosis letal media, aplicando un modelo obtenido mediante un ajuste de mínimos cuadrados no lineal a las curvas de mortalidad acumulada de dichas concentraciones. Luego de la inoculación los insectos disminuyeron la motilidad, a las dosis más altas la oviposición se interrumpió parcial o totalmente y finalmente se produjo la muerte. El tiempo letal medio para la cepa más virulenta fue de 6 días a la concentración más alta (10⁷ conidios). Este tiempo fue mayor a concentraciones más bajas (Tabla 3).

Los resultados obtenidos en este trabajo constituyen el primer aporte de control biológico de *Phoracantha* utilizando hongos entomopatógenos.

Por sus características fisiológicas y efecto patogénico en adultos de *P. recurva*, la cepa MVHC 11727 puede ser utilizada en un eventual programa de control biológico de *Phoracantha* spp. En el presente trabajo se abordó el control biológico de individuos adultos. Sin embargo, sería de interés estudiar el efecto de *Beauveria bassiana* sobre larvas, responsables de los daños.

Es necesario evaluar estrategias para su aplicación en plantaciones, similares a las evaluadas positivamente con otros cerambícidos, con el objetivo de desarrollar una nueva alternativa de control.

Tabla 3. Periodo medio entre la inoculación y muerte de adultos de *P. recurva* infectados con las dosis de conidios/ml de la cepa MVHC 11727, momento de aparición del micelio, porcentaje de mortalidad total y Dosis Letal media (LC₅₀) de dicha cepa.

Dosis (conidios/ml)	N	Periodo inoculación-muerte (X ± l, días)	% mortalidad total	Aparición del micelio (X ± l, días)	LC ₅₀ (conidios/ml)
10 ⁷	46	6.4 ± 0.97 ^{a*}	98	2.4 ± 0.58 ^{a*}	
10 ⁶	42	9.1 ± 3.5 ^b	92	2.5 ± 1.06 ^a	2.80 x 10 ⁶
10 ⁵	38	10.8 ± 4.8 ^b	79	3.4 ± 1.30 ^b	
10 ⁴	36	13.2 ± 1.0 ^c	75	3.5 ± 1.08 ^b	
Control	48	42.0 ± 9.0 ^d	0	0	

*Medias en una misma columna, seguidas de diferente letra son estadísticamente diferentes (F=17.61, p=0.000, g.l=81, test LSD, á=0.05). **Medias en una misma columna, seguidas de diferente letra son estadísticamente diferentes (F=5.42, p=0.002, g.l=81, test LSD, á=0.05).

CONTROL BIOLÓGICO DE LA FUSARIOSIS DE LA ESPIGA DE TRIGO Y CEBADA

Pereyra, S.¹; Garmendía, G.²; Cabrera, M.²; Vero, S.²; Pianzola, M.²; Dill-Macky, R.³

Resumen

La fusariosis de la espiga de trigo y cebada es una enfermedad devastadora a nivel mundial y ha sido epidémica en el Cono Sur de América del Sur en la última década. Actualmente ninguna práctica de manejo de la enfermedad es por sí efectiva y el control biológico podría ser una herramienta más en el manejo integrado de la fusariosis de la espiga. En Uruguay desde 2003, se vienen llevando a cabo trabajos con el fin de determinar la efectividad del uso de agentes de biocontrol aplicados en espigas o en rastrojos de trigo en reducir la infección o la producción de inóculo primario de *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*), respectivamente. Los resultados preliminares indican la potencialidad de la aplicación de *Trichoderma harzianum* en reducir la producción de peritecios de *G. zeae* en el rastrojo.

Es necesario contar con mayor información para poder integrar al control biológico en el manejo de la fusariosis de la espiga

ESTRATEGIAS DE MANEJO INTEGRADO DE LA FUSARIOSIS DE TRIGO

Mónica Cabrera¹, Gabriela Garmendía¹, Silvia Pereyra², Silvana Vero¹

La fusariosis del trigo es una enfermedad que causa grandes pérdidas de rendimiento y calidad en granos de trigo, en las regiones húmedas de todo el mundo. En las zafra (2001/2002 y 2002/2003) esta enfermedad tuvo una alta incidencia en nuestro país, comprometiendo los rendimientos de grano y la comercialización (Pereyra, 2003)

Esta enfermedad puede ser producida por hongos de varias especies pertenecientes al género *Fusarium* entre ellas *Gibberella zeae* (anamorfo *Fusarium graminearum*). Por otro lado, cepas de algunas de estas especies son capaces de producir micotoxinas durante la colonización del grano y en algunos casos durante el almacenamiento. La zearalenona y los tricotecenos, entre ellos el deoxinivalenol (DON), son las micotoxinas predominantes en granos de trigo en nuestro país. El DON puede inhibir la incorporación de aminoácidos y la producción de proteína en los tejidos de la planta. Además los granos contaminados no son adecuados para el consumo humano. A bajas dosis esta micotoxina puede causar rechazo al alimento, mientras que dosis mayores induce vómitos, diarrea, susceptibilidad a infecciones y hemorragias. La presencia de DON en harina de trigo, y alimentos elaborados en base a trigo, está reglamentada en nuestro país a partir del decreto 533/001 del Poder Ejecutivo, que fija 1 ppm como límite máximo. Existen estudios que vinculan la producción de DON con la capacidad del hongo para producir enfermedad en la planta sosteniendo que el DON sería un factor de virulencia del hongo.

El *Fusarium* permanece en los rastrojos en el suelo, donde es capaz de germinar dando lugar a la formación de micelio con conidias o peritecios (en el caso de *Gibberella zeae*). Las conidias o ascosporas producidas son llevadas por el viento y la lluvia hasta los órganos susceptibles los cuales son colonizados. La floración es el momento de mayor susceptibilidad siendo las anteras la principal vía de entrada en este caso. Si ocurren infecciones tempranas, se produce la muerte de las flores. Infecciones más tardías darán lugar a granos no totalmente desarrollados. Si la infección ocurre después del desarrollo del grano, se obtendrán granos de aspecto normal, pero contaminados con hongos y micotoxinas. Estos granos pueden ser la fuente de inóculo para otros granos dentro de la espiga. Según este ciclo, el control de esta enfermedad se podría realizar disminuyendo el inóculo primario (ascosporas o conidias producidas en los rastrojos) o impidiendo la infección de las partes susceptibles de la planta.

El control biológico, podría ser una opción viable para reducir la incidencia y severidad de la enfermedad. Si bien no existe hasta el momento ningún producto comercial, el desarrollo de la investigación a nivel mundial es amplio y ha demostrado la posibilidad del uso de agentes de biocontrol para esta enfermedad (Perondi *et al.*, 1996; Bujlod *et al.*, 2001; Khan *et al.*, 2001). En experimentos a nivel de campo se ha logrado una protección del orden del 50 al 60% (Khan *et al.*, 2004).

La eficiencia de los agentes biocontroladores depende de la cepa de patógeno utilizada para los ensayos. Esto fue demostrado por Khan *et al.* (2001) quienes trabajaron con tres cepas de *Gibberella zeae* de diferente agresividad. En su trabajo se muestra que la acción de los biocontroladores ensayados era máxima cuando se utilizaba la cepa de patógeno menos agresiva. En ese caso, la protección dada por el mejor antagonista llegaba a niveles del 97%, mientras que si se usaba la cepa de patógeno más agresiva la protección era solamente del 27%. Es importante, entonces, en la selección de antagonistas, realizar los ensayos de biocontrol utilizando una cepa de patógeno seleccionada por su agresividad.

El trabajo de nuestro equipo consiste en desarrollar estrategias de control biológico para el control de la fusariosis de espiga, de forma de sustituir o complementar las medidas de manejo actuales. Se plantea utilizar medidas de control biológico para disminuir el inóculo primario presente en los rastrojos y para impedir la colonización posterior de las anteras en floración. El primer paso consistió en seleccionar

¹ Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), La Estanzuela. Ruta 50, km11. C.C. 39173, 70000, Colonia, URUGUAY

² Facultad de Química, Universidad de la República, Gral. Flores 2124, Montevideo, URUGUAY

³ Departamento de Fitopatología, Universidad de Minnesota, 1991 Upper Buford Circle, Saint Paul, MN 55108, U.S.A.

¹ Cátedra de Microbiología. Departamento de Biociencias. Facultad de Química

² INIA La Estanzuela

cepas de patógeno que resultaran agresivas en los dos sitios de acción. Es decir, cepas capaces de colonizar rastrojos y producir el mayor número de unidades infectivas, y cepas muy agresivas en la infección de anteras. En primer lugar se realizaron asilamientos de cepas pertenecientes al género *Fusarium* que estuvieran infectando granos de trigo provenientes de diferentes puntos de producción del país. Las cepas seleccionadas se identificaron fenotípicamente a nivel de especie y a nivel molecular con el uso de *primers* específicos diseñados para cada una de las especies patógenas. En una primera instancia la mayoría de las cepas fueron identificadas como *Fusarium graminearum*, sin embargo no todas fueron capaces de producir peritecios en las condiciones de ensayo. Con el fin de determinar diferencias intraespecíficas se diseñó un método molecular basado en primers RAPD, que ya había sido utilizado por nuestro grupo para identificación de otras especies fúngicas (Pianzzola *et al.*, 2004). La mayoría de las cepas mostraron un mismo perfil de bandas de amplificación con los primers ensayados, sin embargo se obtuvieron perfiles diferentes para dos de las cepas identificadas previamente como *F. graminearum*. Todas las cepas fueron enviadas al laboratorio del Dr. K. O'Donnell perteneciente al USDA (USA) quien previamente había definido 9 especies diferentes dentro de lo que previamente se conocía como *Fusarium graminearum*. La identificación molecular llevada a cabo en su laboratorio definió a la mayoría de nuestras cepas como pertenecientes a la nueva (y más restringida) especie *Fusarium graminearum* mientras que las cepas que mostraron diferentes perfiles de RAPD fueron identificadas como *Fusarium austroamericanum* y *Fusarium cortateriae*.

Los aislamientos de *Fusarium* fueron caracterizados por producción de DON, sensibilidad a fungicidas y por capacidad de colonizar y producir peritecios en rastrojos de trigo. Basados en estos ensayos se seleccionó una cepa de patógeno perteneciente a la especie *Fusarium graminearum* (cepa 224a) como patógeno para continuar el trabajo. De igual modo se seleccionaron 9 cepas con elevada capacidad de producción de DON y baja sensibilidad a fungicidas para realizar ensayos de patogenicidad en flor de forma de encontrar la cepa de nuestra colección que resultara más peligrosa y difícil de controlar una vez inoculada en flor.

Para disminuir el inóculo primario en rastrojo se buscaron hongos del género *Trichoderma* en rastrojos de trigo. Los hongos de este género tienen un conocido potencial como micoparásitos, por lo cual se pensó que podrían degradar las estructuras de patógenos presentes en los rastrojos. Se aislaron 16 cepas del género *Trichoderma*. El proceso de selección planteado implica la búsqueda de una cepa con elevada capacidad de colonización de rastrojos y de inhibición del desarrollo del hongo patógeno en esas condiciones. Se busca además una cepa que sea capaz de degradar los rastrojos de trigo, y que sea resistente al herbicida utilizado en el cultivo de forma de poder ser aplicado junto con el mismo, evitando así dos aplicaciones consecutivas. En primer lugar se estudió la capacidad de todas las cepas de inhibir el crecimiento del patógeno seleccionado en cultivos duales *in vitro* (Figura 1). La mayoría de las cepas de *Trichoderma* ensayadas fueron capaces de inhibir el desarrollo del patógeno invadiendo el micelio del mismo cuando las hifas entraban en contacto. Sólo una de las cepas de *Trichoderma* no pudo avanzar sobre el patógeno en cultivo dual (cepa 3). Como resultado de este ensayo dos cepas fueron seleccionadas por su alta capacidad invasiva (cepas 7 y 13). El siguiente paso consistió en determinar la capacidad de cada cepa de *Trichoderma* de crecer en presencia de paredes del hongo patógeno como única fuente de carbono y de producir enzimas capaces de degradar dichas paredes. Está demostrado que estas enzimas (quitinasas, α 1,3 glucanasas y proteasas), juegan un rol muy importante en el micoparasitismo. Los resultados muestran que existen diferentes capacidades de producción según las cepas (Figura 2). La cepa con menor producción de glucanasas fue la cepa 3 la cual no pudo avanzar sobre el micelio del patógeno en cultivo dual. Este resultado parcial podría dar un indicio de la importancia de las glucanasas en el micoparasitismo.

Por otro lado, se estudió el potencial de cada cepa con respecto a la degradación de rastrojos. Para ello se cuantificó la cantidad de xilanasas (Fig3) y celulasas producidas por cada cepa. A su vez se ha comenzado a evaluar la disminución de hemicelulosa y celulosa en rastrojos inoculados con cada una de las cepas de *Trichoderma*. En 30 días de incubación, se han encontrado diferencias entre la cantidad de hemicelulosa presente en rastrojos inoculados y la existente en un control sin inocular, indicando que en este lapso de tiempo se verificaría una degradación parcial de los rastrojos. En este momento se están realizando ensayos con 60 días de incubación.

Seis de las cepas de *Trichoderma* pudieron ser identificadas fenotípicamente. Según estos resultados se cuenta con una cepa de *T. atroviride*, dos cepas de *T. citriniviride*, dos cepas de *T. harzianum* y una cepa de *T. koningii*. La identidad de estas cepas será confirmada por secuenciación de la región ITS1-ITS2 del rDNA y posterior comparación con la base de datos del Gen Bank. La identificación de las cepas restantes también se realizará por métodos moleculares. La secuenciación de esta región permitirá además, distinguir si las cepas identificadas como *T. harzianum*, pertenecen a los subgrupos denominados Th2 o Th4 los cuales se caracterizan por su alta agresividad contra hongos comestibles. Esta característica debería ser tenida en cuenta a la hora de seleccionar un agente de control biológico, en especial cuando se piensa en una aplicación masiva en un cultivo extensivo.

Por último, las cepas seleccionadas en los ensayos anteriores serán evaluadas en su capacidad de impedir el desarrollo micelial y la formación de peritecios del patógeno en rastrojos.

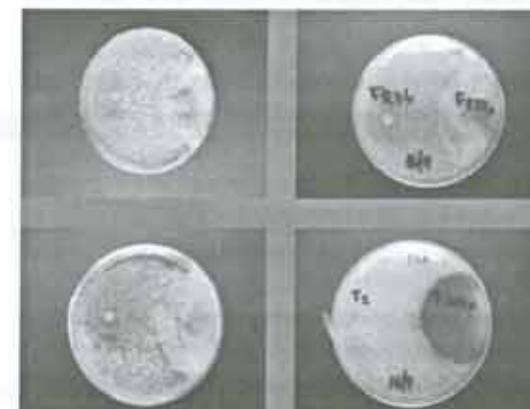


Figura 1. Cultivos duales entre *Fusarium graminearum* 224a y cepas nativas de *Trichoderma*.

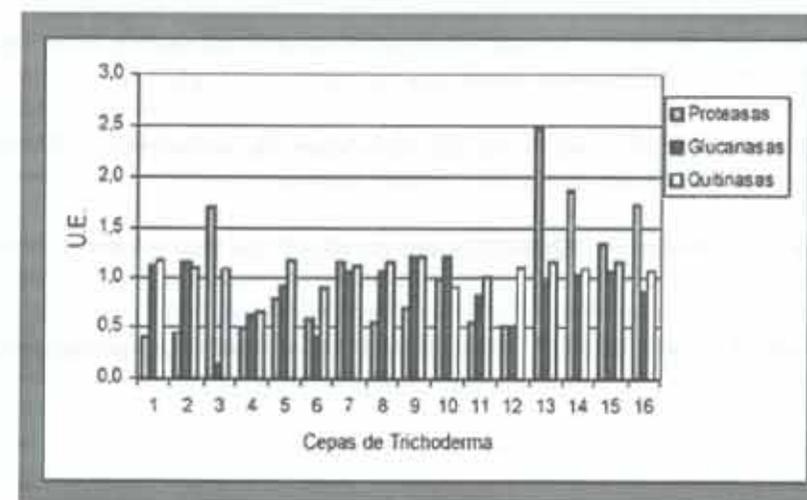


Figura 2. Actividades enzimáticas expresadas como unidades de enzima (U.E.) de las cepas de *Trichoderma* creciendo con paredes de *F. graminearum* como única fuente de carbono.

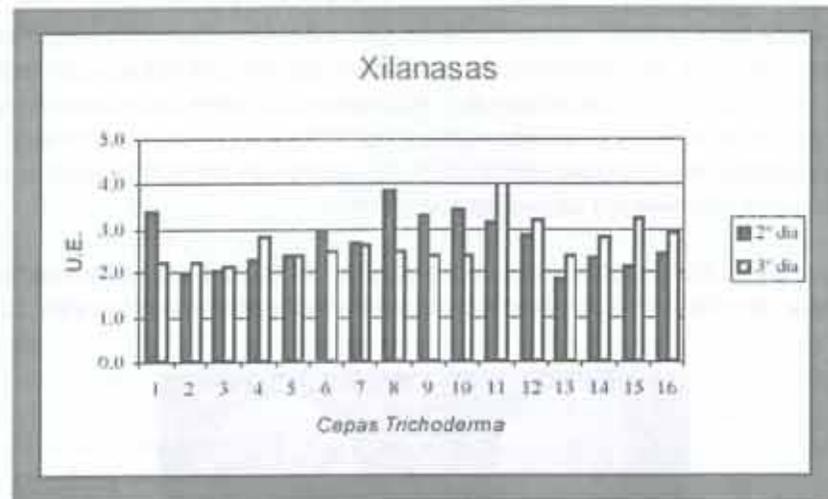


Figura 3. Actividad xilanasa expresada como unidades de enzima (U.E.) de las cepas de *Trichoderma* creciendo con xilano como única fuente de carbono.

Bibliografía

- Bujold, I. And Paulitz, T. 2001. Effect of *Microsphaeropsis* sp. on the production of perithecia and ascospores of *Giberella zeae*. *Plant Disease* 85: 977-984.
- Khan, N.; Schisler, D.; Boehm, M. and Slininger, P. 2001. Selection and evaluation of microorganisms for biocontrol of *Fusarium* head blight of wheat incited by *Giberella zeae*. *Plant Disease* 85:1253-1258.
- Khan, N.; Schisler, D.; Boehm, M.; Lipps, P. and Slininger, P. 2004. Field testing of antagonists of *Fusarium* head blight incited by *Giberella zeae*. *Biological Control* 29:245-255.
- Pereyra, S. 2003. Prácticas culturales para el manejo de la fusariosis de la espiga. *En: Jornada Técnica de cultivos de invierno. Actividades de difusión N°312 .INIA pp1-9.*
- Perondi, N., da Luz, W.C., Thomas, R. 1996. Controle microbiológico do *Giberella* do trigo. *Fitopatologia brasileira*. 21:243-249.
- Pianzola, M.; Moscatelli, M.; Vero, S. 2004. Characterization of *Penicillium* isolates associated with blue mold of apple in Uruguay. *Plant Disease* 88: 23-28.

En el Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA) se vienen realizando investigaciones para desarrollar micoinsecticidas basados en hongos entomopatógenos.

Las primeras investigaciones se iniciaron con el hongo *Beauveria bassiana* para el control de *Diatraea saccharalis*. Asimismo, se ha trabajado con otras cepas y otras especies fúngicas (*Metarhizium anisopliae* y *Nomuraea rileyi*) para larvas defoliadoras en soja, tucuras, picudo del algodón, chinches e insectos de suelo.

Actualmente, las investigaciones se han ampliado a garrapatas, moscas blancas, cucarachas, vinchucas y mosca doméstica.

Las actividades que más han avanzado para obtener micoinsecticidas se centran en las dos últimas plagas, donde se están iniciando los trámites de registro experimental.

Para el caso de la vinchuca, *Triatoma infestans*, las investigaciones comenzaron con bioensayos para seleccionar cepas efectivas. Si bien no se han encontrado ejemplares parasitados naturalmente, se observó que en laboratorio las vinchucas son muy sensibles a cepas de *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

Esto determinó que se pudieran seleccionar varias cepas altamente virulentas dentro de un grupo menor a 100 cepas. Se decidió continuar las experiencias con cepas de *B. bassiana* y se determinó la DL_{50} para ninfas y adultos, el rango de hospedante con otras especies peridomiciliarias de vinchucas, su efectividad a distintas temperaturas y tenores de humedad relativa, la compatibilidad con insecticidas a distintas dosis, la virulencia según el origen geográfico de las vinchucas, la producción en sustrato sólido y ensayos en ranchos experimentales de 1 m³.

Mediante un Convenio de Investigación, Desarrollo y Transferencia Tecnológica con una empresa privada (2002-2012), las actividades de producción y formulación las está realizando dicha empresa. El objetivo es obtener una formulación comercial de calidad. Para esto, durante el último año, se han probado distintas preparaciones que condujeron a que en estos momentos se ha iniciado el trámite de registro en el Ministerio de Salud. Una vez que se tenga el registro experimental, se solicitará la colaboración para realizar las evaluaciones a campo.

Para el caso de la mosca doméstica, *Musca domestica*, los bioensayos también se iniciaron con cepas de la micoteca por no disponer de aislamientos nativos. Se determinó la DL_{50} de *B. bassiana* sobre hembras y machos, la compatibilidad con parasitoides de pupas que normalmente se emplean en el control de esta plaga, la producción sobre sustrato sólido, formulaciones líquidas tipo pinturas y las granuladas y los cebos alimentarios y sexuales.

Mediante el Convenio citado, la empresa se dedica a la producción y formulación de una preparación granular con cebo sexual que se ensayó con resultados satisfactorios y está iniciando los trámites de registro experimental.

AVANCES EN EL USO DE *Trichoderma harzianum* COMO AGENTE DE BIOCONTROL Y PROMOTOR DE CRECIMIENTO EN VIVEROS FORESTALES

Ing. Agr. Graciela Romero¹⁰

- La inoculación del sustrato previo a la siembra con *Trichoderma harzianum* tuvo efecto promotor en el crecimiento, que se evidencia en todos los parámetros de calidad evaluados.
- Para todos los parámetros evaluados, se observó que con el agregado de la mitad de la dosis de fertilización utilizada por Colonvade S.A. en presencia del agente de biocontrol, se obtuvo mejor calidad de plantín que con el agregado de la dosis empleada actualmente por la empresa sin dicho agente.
- La dosis de fertilizante con la cual se obtiene el máximo valor para los parámetros: Peso fresco total, Peso fresco parte aérea y Peso seco parte aérea, es aproximadamente tres veces la fertilización Colonvade S.A. Por este motivo, se sugiere usar dos veces la dosis de la empresa ya que no se observaron diferencias significativas entre aplicar dos y cuatro veces la dosis Colonvade S.A.
- No se pudo evaluar el efecto de *Trichoderma harzianum* como agente de biocontrol, ya que no se observaron enfermedades en el ensayo.
- La sobrevivencia de *Trichoderma harzianum* en el sustrato se mantuvo en niveles aceptables a lo largo del ensayo. No se pudo comprobar inmovilización de nutrientes por parte del agente de biocontrol con las dosis de fertilización agregadas.
- Los parámetros de calidad: Altura, Peso fresco radical y Peso seco radical no resultaron útiles para ajustar dosis de fertilización, ya que no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con agentes de biocontrol.

EFFECTO DE DIFERENTES TRATAMIENTOS CON *Trichoderma harzianum* SOBRE EL CONTROL DE *Botrytis cinerea* EN EL CULTIVO DE TOMATE BAJO CUBIERTA.

Ing. Agr. Roberto Bernal¹

La botrytis es el principal problema de enfermedades aéreas producido por hongos en condiciones de invernáculo en el cultivo de tomate, siendo necesarias en algunos casos de acuerdo a las condiciones climáticas reinantes realizar desde 12 hasta 15 aplicaciones anuales de fungicidas. Ataca hojas, tallos y frutas. El tomate se trasplanta generalmente desde febrero a marzo y en algunos casos el cultivo se mantiene hasta diciembre o aún más tarde en las zonas de Salto y Bella Unión dependiendo de las condiciones de mercado. En este periodo a mediados de otoño, en los meses de invierno y principios de primavera se dan condiciones propicias para el desarrollo de este hongo sobre todo debido a la alta humedad relativa y cielo nublado por lapsos extensos.

Debido a la alta utilización de fungicidas para el control de la enfermedad, se están buscando alternativas más amigables con el medio ambiente. En ese sentido se comenzaron hace varios años experimentos evaluando el hongo *trichoderma harzianum* para el control de botrytis. Analizando los datos obtenidos se concluye primariamente que cuando las condiciones son muy propicias para el desarrollo de la enfermedad este hongo no muestra una alta efectividad en el control cuando se aplica individualmente. Cuando el ataque no es muy intenso el comportamiento de este hongo se vuelve más eficiente. También cuando se alternan fungicidas con el *Trichoderma* se han obtenido resultados interesantes lográndose reducir las aplicaciones de agroquímicos en un 50%. En el momento se continúa estudiando este hongo utilizando diferentes formas de aplicación (aplicación al suelo previo al trasplante y foliar) y a su vez ensayando otros productos inductores de resistencia (Bion 500 WG, Acibenzolar-S-Methyl) que no han dado buen resultado ya que fueron nocivos para la planta de tomate. Esta línea de investigación es constante y se está en la búsqueda de alternativas con el fin de reducir el número de aplicaciones de agroquímicos.

¹ Protección Forestal, Facultad de Agronomía.

¹ INIA Salto Grande.

CONTROL BIOLÓGICO DE PATÓGENOS POSCOSECHA DE MANZANAS Y CITRUS

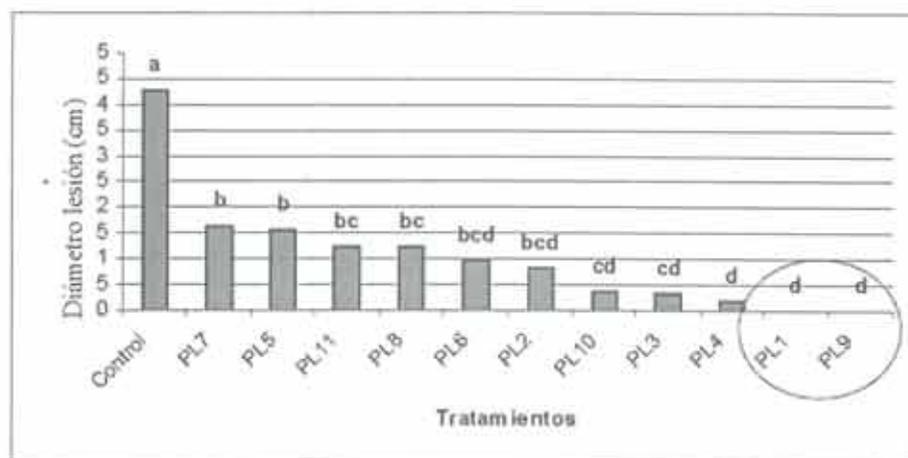
Garmendia, G.¹; Garat, F.¹; Silvera, E.²; de Aurrecochea, I.³; Vero, S.¹

Las frutas y hortalizas son susceptibles a ser atacadas por diferentes patógenos luego de ser cosechadas. En particular, en el caso de manzanas y citrus, las enfermedades poscosecha constituyen una importante causa de pérdidas durante el almacenamiento, siendo *Penicillium expansum*, *Penicillium solitum* y *Botrytis cinerea* los principales patógenos poscosecha. En el caso de citrus los principales patógenos poscosecha son *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*. Para controlar estas enfermedades se recurre a tratamientos poscosecha, los cuales involucran aplicación de fungicidas de síntesis química. El uso de este tipo de productos trae asociados problemas tales como contaminación ambiental, riesgo para los consumidores y la aparición de cepas de patógenos resistentes. Como alternativa al control químico se plantean estrategias de control integrado, las cuales combinan el control físico, el control cultural y el control biológico, con mínimas aplicaciones de fungicidas en los casos en que sea estrictamente necesario.

El objetivo general de este trabajo es desarrollar un esquema de manejo poscosecha basado en el control biológico, que minimice el uso de fungicidas de síntesis química, disminuyendo de esta manera los residuos plaguicidas en la fruta. Se propone el uso de microorganismos antagonistas y la aplicación de sustancias naturales (ácido acético y bicarbonato de sodio).

Como estrategia de trabajo se planteó, en primer lugar, el aislamiento de cepas nativas de patógenos poscosecha de manzana y citrus, su identificación y caracterización. La caracterización se realizó en base a su agresividad en fruto y a resistencia a fungicidas de uso comercial *in vitro* y en condiciones de uso. De esta manera se seleccionaron cepas de patógenos poscosecha tanto de manzana como de citrus agresivos y con alta resistencia a fungicidas con los cuales se continuó trabajando. En segundo lugar, se aislaron posibles microorganismos antagonistas de la superficie de manzanas y limones sanos almacenados en cámara fría durante 6 meses. Estos posibles microorganismos antagonistas fueron seleccionados en base a su capacidad de crecer a 5°C y a ensayos de biocontrol en fruta. En estos ensayos se enfrentaron aquellos microorganismos capaces de crecer a bajas temperaturas a patógenos poscosecha de manzana y citrus en heridas en fruto, los cuales se almacenaron en cámara fría durante tres meses y un mes respectivamente. Posteriormente se determinó la incidencia de la enfermedad.

En la gráfica 1 se observa el resultado del ensayo de biocontrol sobre heridas Washington Navel contra *P. italicum* a 5°C de los aislamientos seleccionados en base a su capacidad de crecimiento a bajas temperaturas.



Gráfica 1

¹ Cátedra de Microbiología. Facultad de Química.

² Cátedra de Fitopatología. Departamento de Protección Vegetal. Facultad de Agronomía.

³ Departamento de Estadística, Biometría y Computación. Facultad de Agronomía.

Se seleccionaron aquellos microorganismos capaces de controlar los síntomas de la enfermedad. Se seleccionaron tres cepas de antagonistas. Dos de ellas (PL1 y PL9) aisladas de limones y capaces de biocontrolar tanto patógenos poscosecha de manzana como de citrus. La tercera cepa (B) fue aislada de manzana y capaz de controlar solamente los patógenos poscosecha de manzana. En la figura 1 se puede observar el resultado del ensayo para la cepa B frente a *P. expansum* en herida de manzana.

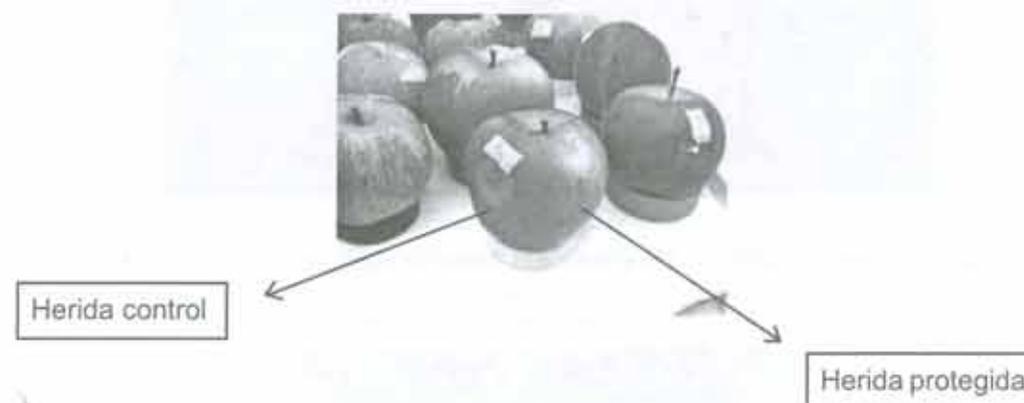


Figura 1. Ensayo de biocontrol, cepa B.

Las cepas de antagonistas fueron identificadas a nivel de especie fenotípica y genotípicamente y posteriormente caracterizadas. Las cepas fueron identificadas como *Aureobasidium pullulans* (cepa B), *Leucosporidium scotti* (PL9) y *Cystofilobasidium infirmomiatum* (cepa PL1). Para la caracterización se determinó su temperatura óptima de crecimiento, el pH óptimo, la concentración inhibitoria mínima de quitosano, la resistencia *in vitro* a fungicidas de uso comercial, y sus mecanismos de acción.

La temperatura óptima de crecimiento de los antagonistas fue de 25°C, mientras que su temperatura máxima fue de 34°C. Por lo tanto, ninguno de los microorganismos fue capaz de crecer a temperaturas mayores de 34°C, observándose muerte microbiana a 37°C. Esto nos estaría indicando que no serían capaces de colonizar el cuerpo humano. En cuanto a la resistencia a fungicidas, los antagonistas mostraron mayores niveles de resistencia *in vitro* que las cepas nativas de patógenos.

Las tres cepas fueron capaces de colonizar heridas de manzana y naranjas a 1°C. Ninguna de las cepas seleccionadas presentó inhibición de los patógenos poscosecha en cultivos duales, por lo tanto, no se constató la producción de metabolitos antifúngicos difusibles en las condiciones del ensayo. Este resultado puede observarse en la figura 2.

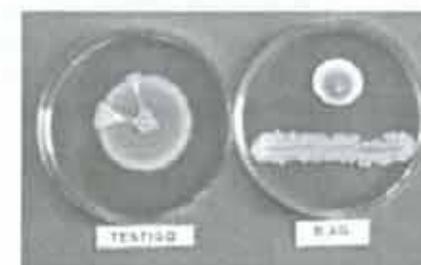


Figura 2.

Sin embargo si se detectó la producción de enzimas líticas (quitinasas y glucanasas) capaces de hidrolizar paredes de hongos. Una de las cepas seleccionadas, la cepa B, fue capaz de inhibir la germinación de conidias de *P. expansum* en aproximadamente un 30% respecto al control. Esta misma cepa es capaz de producir sideróforos tipo hidroxamato.

Se estudió también la capacidad curativa de enfermedades poscosecha de sustancias naturales como ser ácido acético (4%) y bicarbonato de sodio (3%). Manzanas y naranjas con heridas inoculadas con patógenos respectivos fueron sumergidas en baño con las sustancias naturales, almacenadas en

cámara el tiempo correspondiente y posteriormente se determinó la incidencia de pudrición. Esta medida fue efectiva para el control de patógenos de citrus, pero no los de manzana, como puede observarse en las figuras 3 y 4.

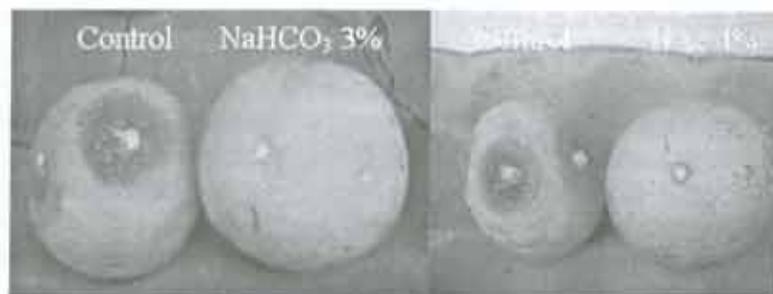


Figura 3. Capacidad curativa de NaHCO₃ 3% y HAc 4% sobre *P. italicum*



Figura 4. Capacidad curativa de NaHCO₃ 3% y HAc 4% sobre *P. expansum*

Como pasos a seguir se plantea la optimización de las condiciones de producción de estos microorganismos antagonistas a mayor escala, así como la producción de los mismos adaptados a condiciones de estrés. Se plantea también el desarrollo de una formulación.

PRODUCCION DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE PLAGAS AGRÍCOLAS EN BRASIL

Dr. Daniel Sosa Gomez¹

El siguiente trabajo corresponde al material desgrabado de la intervención del autor

Lo más importante en el inicio de un proyecto de control microbiano es la construcción de colecciones de cultivos de microorganismos, en este caso de hongos entomopatógenos. A nivel mundial creo que la colección más importante está en el Departamento de Agricultura de EEUU, en la Universidad de Cornell. Este catálogo es bastante antiguo pero está siendo actualizado permanentemente en Internet. Quien mantiene esta colección es el Dr. Humberg, del Departamento de Agricultura. Ellos poseen más de 7.000 aislamientos de hongos entomopatógenos, lo cual constituye una fuente muy importante de germoplasma. Sería muy importante también que en Uruguay se construyan este tipo de colecciones para preservar los genotipos que existen, para poder hacer estudios comparativos de diferentes laboratorios. En EMBRAPA, por ejemplo, tenemos una colección que está relacionada con entomopatógenos que se encuentran en insectos asociados a soja. Es muy importante en nuestros países, que tienen pocos recursos, dirigir todas las investigaciones para evitar el desperdicio de esos recursos. Lo importante entonces, es establecer cuales son las plagas clave que tenemos que controlar y definir el problema, y determinar cual es el potencial real de control que tenemos para esa plaga, con hongos en este caso.

Existen insectos que son susceptibles a hongos y otros que no lo son. Escoger el insecto blanco es muy importante, y hay que tener cautela con proyectos con posibilidades de éxito reducidas. Un ejemplo es el control de *Scaptocoris castanea* con hongos entomopatógenos. Este insecto es una chinche hipogea, y cuando el suelo carece de humedad el insecto puede buscarla hasta a un metro y medio de profundidad. En estos casos, la utilización de hongos entomopatógenos y la posibilidad de éxito son complicadas, y hay que tener mucho cuidado. Existen hongos que pueden producirse masivamente en medios de cultivo de manera simple y otros que no, como también existen aquellos que naturalmente poseen una alta eficiencia como otros que no. *Nomurea rileyi*, que es un hongo que ataca orugas de la soja, es difícil de multiplicar en medios de cultivo artificiales, como así también lo es *Pandora gammae*. Por otro lado, *Zoophthora radicans* es relativamente más fácil de multiplicar, aunque también presenta sus dificultades.

Pandora gammae, que ataca a *Spodoptera*, produce una alta cantidad de conidios que se dispersan fácilmente en el ambiente y es muy eficiente como agente de control natural, pero es muy difícil de producir en medios artificiales. Es un desafío que tenemos los patólogos de insectos en la producción de estos organismos.

Los conidios y núcleos de *Pandora gammae* son muy grandes. *Zoophthora radicans* es un hongo muy eficiente y puede ser cultivado en medios de cultivo en instalaciones especializadas. Este hongo también posee conidios con núcleos grandes los cuales presentan la característica particular de estar cubiertos por una membrana, siendo la punta del conidio de forma cónica. Hay una variabilidad enorme en cuanto a razas de esa especie, la cual aparentemente es un complejo de especies.

Vamos a hablar un poco de la producción en gran escala, habíamos explicado en base a qué criterios se escoge el hongo entomopatógeno a producir. Tiene que ser un hongo fácil de producir, virulento, y apropiado para el ambiente en el que va a ser aplicado. Otro punto muy importante a tener en cuenta es que la especie de insecto sea susceptible. ¿Como sabemos si la especie de insecto es susceptible? Este es un concepto bastante básico pero mucha gente se olvida de él.

Aquí pueden verse agentes entomopatógenos. Clave de control natural en diversos sistemas agrícolas, en soja *Nomurea*, en maíz *Nomurea* –que también ataca la oruga militar-, en café el taladro del café también es susceptible a *Beauveria*, en citrus el ácaro del tostado. Estos son solo algunos ejemplos acerca del uso de hongos como agentes muy importantes de control natural.

¹ EMBRAPA, CNPSo

Quisiera ahora mostrar un paralelismo entre dos especies que son alternativamente de fácil control, como el Tingitidae del árbol de caucho, y de un insecto que es más difícil de controlar a pesar de ser infectado también por hongos, ya que es infectado pero ¿en que condiciones?

Cuando queremos dimensionar si el insecto es susceptible al entomopatógeno lo que normalmente se hace es realizar bioensayos, y los resultados tienen que ser comparables. Lo ideal es que se comparen entre laboratorios diferentes.

Cuando nosotros montamos un experimento para determinar CL_{50} y DL_{50} -eso tiene que estar bien claro para quien trabaja con patógenos de insectos-, la determinación de la CL_{50} normalmente se hace por pulverización o por inmersión del insecto en una suspensión de conidios, y cuando se trabaja con DL_{50} nosotros hacemos una aplicación tópica de microgotas y sabemos exactamente que cantidad de conidios están sobre el insecto ¿Cual es la diferencia entre uno y otro? Usando CL_{50} , nosotros pulverizamos normalmente sobre el insecto y su entorno una concentración elevadísima de conidios, pero con esta técnica no sabemos realmente cuántos conidios están cayendo sobre el insecto. Normalmente se utilizan concentraciones muy altas, 10^7 , 10^8 , 10^9 conidios/ml, siendo lógico que a esas concentraciones se produzca infección, porque estamos aplicando una cantidad inmensa de conidios, pero, en realidad, ese insecto podría haber adquirido la infección no porque sea susceptible a ella sino por la masiva dosis empleada ¿Cómo averiguar entonces si es susceptible? Aplicando microgotas sobre el insecto y estimando con mayor precisión cual es el número de conidios que cae sobre el mismo. De esta forma, nosotros podemos comparar entre diferentes laboratorios cual es realmente el patógeno más virulento o cual es el insecto más susceptible.

Si ustedes buscan en la literatura, en pocos sistemas es conocida la dosis letal 50. Por ejemplo, en tucuras, este insecto puede morir en 5 días luego de recibir una dosis de aproximadamente 9.000 conidios, pero en el caso de *Nezara viridula*, se necesitan de 300.000 a 500.000 conidios para que el insecto muera en 9-10 días posteriores a la aplicación. Eso nos da una idea de la diferencia de susceptibilidad que existe entre diferentes especies.

Otro ejemplo es *Metarhizium acridum* (antiguamente conocido como *flavoviridae*), del que se necesita una cantidad de conidios realmente pequeña para controlar tucuras, en comparación con la que se necesita para la chinche verde, *Nezara viridula*. Otra chinche que es una plaga importante (y también lo es en Uruguay), es *Piezodorus guildinii*, con la cual en Brasil también estamos teniendo problemas. Este insecto, a pesar de ser un poco más susceptible que las otras especies de chinches, también es difícil de controlar, y por esa razón utilizamos una raza de *Metarhizium anisopliae* que aislamos de los suelos de Paraná. (En esta foto), puede verse sobre la superficie del conidio una superficie hidrofóbica que favorece la fijación del conidio sobre el insecto. Montamos experimentos en laboratorio con esta raza y determinamos que no es fácil controlar algunas chinches con hongos. Trabajando con *M. anisopliae*, vimos que los porcentajes de mortalidad eran bajos. Una mezcla del hongo e insecticida en bajas concentraciones tuvo un mejor efecto, pero tampoco fue tan eficiente. Esto nos da idea que con una dosis letal de 300.000 a 400.000 conidios por insecto las dificultades en campo van a ser mayores para controlarlo.

La DL_{50} en una determinada especie nos permite calcular la cantidad de conidios que es necesaria para tratar un área determinada -en la que se encuentra el insecto plaga- de una forma teórica, es más informativa que la CL_{50} . Cuanto más susceptible el insecto menos unidades infectivas son necesarias, los costos de producción son altos pero es viable la utilización de ese patógeno para el control de la plaga.

Algunos ejemplos de la utilización de *Metarhizium* con costos de producción (datos aportados por un colega del Instituto Biológico de San Pablo) son: costos fijos 30%, el retorno que tiene la venta de ese producto 30%, medios de cultivo 6%, 10% en mano de obra, y 24% en impuestos, y el costo de mercado de granulados (arroz) R\$ 8,00 - 14,00, aceite emulsionable R\$ 19,00, líquidos R\$ 20,00 (1 dólar aprox, 2,18 reales). En este caso los costos de producción en medio líquido se refieren a otra especie que vamos a ver un poco más adelante.

En Brasil la mayoría de los hongos se producen en medios sólidos usando botellas autoclavables. Se hace un stock inicial, se inocula en sacos de polipropileno y ese hongo es colocado para esporular después de 4-5 días de incubación a 26-28°C. Luego se transfieren a bandejas, se abren las bolsas y se deja expuesto al aire, y el hongo esporula rápidamente. La cosecha de las esporas se hace en tamices cerrados y con diferentes tamaños de abertura del tamiz, normalmente son 300 micrómetros de abertura y si el producto va a ser destinado a la aplicación aérea el tamiz es más fino, aproximadamente 100 micrones.

Otro hongo importante del que existen datos, sobre 35.000 has de hongo aplicado, es *Sporothrix insectorum*, el cual ha sido -aparente y recientemente- clasificado dentro del género *Aphanocladium*. Su taxonomía no es clara aun. Es un hongo muy virulento y el insecto es bastante susceptible, tornando la eficiencia de control en importante. El Instituto Biológico de San Pablo produce este hongo en medios de cultivo líquidos y en fermentadores en pequeña escala, y vende la formulación líquida, pero en esta forma la viabilidad es baja y entonces hay que utilizarlo rápidamente. Se pueden ver en este cuadro algunos datos de control de esa chinche de encaje, Tingitidae, con ese hongo. Ustedes ven el testigo, área aplicada con insecticida químico y área aplicada con el hongo. Efecto importante después de algunos días, (datos de Roberto Teixeira Alves de la EMBRAPA CPAC en Brasilia) se ve la eficiencia incluso, luego de 5 cinco semanas el hongo invade las áreas tratadas con insecticida.

Otro insecto de fácil control, con DL_{50} baja para *M. anisopliae var. acridum*, es una tucura que es importante en la región central de Brasil (si bien en los últimos años no lo ha sido). Bonifacio Magalhaes quien pertenecía a Cenargen, realizo un estudio importante al respecto. A las dosis aplicadas, las mortalidades fueron muy elevadas, justificando y haciendo plenamente viable en este caso la utilización de *Metarhizium* para el control de *Rhammatocerus schistocercoides*.

Formulaciones

Existen varias formulaciones para hongos que en realidad no son formulaciones sino arroz esporulado que se vende como granulado, polvo mojable y aceite emulsionable. En este caso se cosechan las esporas de *Metarhizium* con querosén y después se hace una dilución con aceite vegetal o mineral, lo que conserva el hongo. En la siguiente tabla pueden verse la cantidad de conidios por gramo o mililitro de aceite emulsionable y por gramo de arroz esporulado, y la cantidad de conidios también de *Beauveria*, tanto producidos en medio sólido como líquido.

Hongo	Concentración	Unidades
<i>Metarhizium</i>	5×10^8	Conidios/g o ml
<i>Beauveria</i>	5×10^9	Conidios/g
<i>Aphanocladium</i>	1×10^8	Propágulos/ml

Este es un trabajo que se realizo en 1996 pero es muy importante desde el punto de vista de formulación. Muchas veces no se presta atención a esto, pero la generación de los conidios de *Metarhizium* es afectada por el porcentaje de humedad que contienen y, si los conidios se secan inicialmente durante el proceso de la cosecha, la viabilidad del mismo aumenta significativamente. (En esta transparencia) se pueden ver dos tratamientos a diferentes temperaturas, 26-30 °C y 10-12 °C. Cuando los conidios no se secaron y fueron colectados con querosén la viabilidad fue 0, al igual que usando querosén tratado con sílica (también para conidios cosechados con alto porcentaje de humedad). Pero cuando los conidios se secan previamente a su formulación la viabilidad aumenta. Puede verse aquí que en el mismo período, - 68 días- la viabilidad es 71%, y cuando los conidios se procesaron sin secar la viabilidad fue de solo 9%. Conidios secos procesados con el querosén y tratado con sílica arrojaron resultados de viabilidad elevada también. Entonces lo que tenemos que considerar es reducir la humedad de los conidios, con humedades en el entorno del 2 a 4% se puede hacer la formulación en aceite, coleccionar los conidios con querosén y mezclar con aceites vegetales o minerales. Esta mezcla puede almacenarse al vacío o en aceite, y normalmente las temperatura menores de 12° son mejores para la preservación (Moore, 1996).

Los siguientes son los puntos críticos que consideramos pueden ser mejorados para la producción y comercialización de hongos entomopatogénicos:

- Medios de cultivos alternativos al arroz (menor costo)
- Producción de conidios sumergidos en medio líquido para sustituir al medio sólido (voluminoso y pesado)
- Utilización de procesos bifásicos (multiplicación de micelio en medios líquidos y esporulación en medios sólidos) para reducción de contaminantes
- Automatización de procesos de inoculación, secado y colecta de esporas
- Control de calidad riguroso (mantenimiento de la virulencia)
- Desarrollo de formulaciones y de envase (aislamiento de humedad y térmico)
- Empresas registradas, implantar certificados de calidad
- Registro de bioinsecticida en el MA, MS e IBAMA.

DESARROLLO DE BIOINSECTICIDAS A BASE DE *BACILLUS THURINGIENSIS* PARA EL CONTROL DE INSECTOS

Rose Gomes Monnerat¹ & Carlos Marcelo Soares²

Los insectos son una de las causas de pérdidas económicas en el sector agrícola y vectores de importantes enfermedades en poblaciones humanas. Para su control son utilizadas grandes cantidades de productos químicos que, además de contaminar el ambiente, favorecen el desenvolvimiento de poblaciones de insectos resistentes. Los avances en la investigación con agentes de control biológico han contribuido para la utilización de bioinsecticidas producidos a partir de microorganismos tales como: bacterias, hongos o virus. Estos agentes pueden ser manipulados para aumentar su patogenicidad, ampliar el espectro de acción, producirlos industrialmente o incorporar sus genes insecticidas en vegetales, llevando a la obtención de plantas transgénicas (Perlak *et al.*, 1990). Entre los agentes microbianos con actividad entomopatógena se destaca *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Berliner), esta bacteria cosmopolita es específica para el control de insectos (Feiltelson, 1994). La actividad insecticida de *B. thuringiensis* se debe a la producción de δ -endotoxinas, en forma de cristales, durante la fase de esporulación (Lereclus *et al.*, 1993). Los productos, a base de esta bacteria, para el control de plagas agrícolas y vectores son comercializados desde hace más de 50 años, siendo su mercado anual estimado en 100 millones de dólares. En América Latina su uso es restringido, ya que la mayor parte de los bioinsecticidas Bt son importados y sus precios elevados, lo que muchas veces torna inviable su adquisición. No obstante esto la demanda es grande pues, solamente en el año 2002, Brasil importó 450 toneladas de bioinsecticida para el control del mosquito transmisor de dengue, *Aedes aegypti* (Vilarinhos, 2002). Para uso agrícola se estima que en Brasil se gastan anualmente 4,9 millones de dólares para adquisición de *B. thuringiensis* subespecies *kurstaki* e *aizawai*. De esta manera, y contando con un mercado en el área agrícola y de salud pública, estimado de US\$ 6,5 millones/año, las iniciativas orientadas a desarrollar productos a base de *B. thuringiensis* que sean estables, eficaces y de bajo costo tienen un campo fértil para crecer. Embrapa Recursos e Biotecnología cuenta con un banco de estirpes de *Bacillus* spp. con varias de ellas identificadas como muy promisorias para el control de insectos plaga de la agricultura y/o vectores. En los últimos años, el trabajo en conjunto entre Embrapa y la empresa privada Bthek Biotecnologia Ltda. resultó en el desarrollo y registro de los productos Sphaerus® SC (*B. sphaericus*) y Bt-horus®SC (*B. thuringiensis*), capaces de controlar mosquitos vectores de malaria y dengue. Actualmente las dos empresas están desarrollando un producto que recibirá el nombre de PontoFinal®, y que tendrá como alba larvas de Lepidoptera.

Durante el desarrollo de estos productos las estirpes seleccionadas fueron caracterizadas por medio de exámenes bioquímicos, moleculares y ultra-estructurales (Monnerat *et al.*, 2004, 2005).

Para la producción del producto agrícola, fue seleccionado un medio de cultura a base de azúcar, extracto de levadura y minerales como: calcio, magnesio, manganeso y hierro. La fermentación fue de tipo discontinua, realizada en fermentador de 100 litros a 30 °C y 20% de saturación de oxígeno. El inóculo fue de 10% del volumen y el pH fue mantenido próximo de la neutralidad durante todo el crecimiento. El tiempo total de fermentación hasta completar la esporulación en el reactor fue de 24 horas.

Luego del cultivo en gran escala el complejo espóra-cristal fue separado por ultrafiltración, de esta manera fueron obtenidos más de 16 g/L de biomasa bacteriana (esporas y cristales). El material fue formulado en la forma de suspensión concentrada, con la adición de emulsificantes, adhesivos, protectores solares, conservantes y agua.

Las evaluaciones realizadas en laboratorio contra larvas de *Spodoptera frugiperda* muestran que este nuevo producto presentó CL₅₀ (concentración necesaria para matar 50% de la población estudiada) de 0,027 (0,008 – 0,061) x 10⁻⁶ dcf (dilución de cultura final), mientras que el Dipel presentó CL₅₀ de 0,326 (0,100 - 0,704) x 10⁻⁶ dcf.

¹ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Caixa Postal 02372, CEP 70849-970 Brasília, DF.

² Bthek Biotecnologia, SAAN Q. 03 N°240, CEP 72220-000 Brasília, DF.

Referencias Bibliográficas

- Feitelson, J.S., 1994: Novel pesticidal delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. In: Proceedings of XXVII Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, p.184. Montpellier, France.
- Lereclus, D.; Delécluse, A.; Lecadet, M.M., 1993: Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice Ed. by P.F. ENTWISTLE, J.S. Cory, M.J. Bailey and S. Higgs. John Wiley and Sons, Ltd., Chichester, England, 37-69.
- Monnerat, R.; Dias, D.; Silva, S.; Martins, E.; Berry, C.; Falcão, R.; Gomes, A.; Praça, L.B.; Soares, M. Screening of *Bacillus thuringiensis* strains effective against mosquitoes. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 40 (2), 103-106, 2005.
- Monnerat, R.; Silva, S.; Dias, D.; Martins, E.; Praça, L.B.; Jones, G.; Soares, C.; Dias, J.; Berry, C. Screening of high toxic Brazilian *Bacillus sphaericus* strains against *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*. Journal of Applied Entomology, 128 (7), 469-473, 2004.
- Perlak, F. J.; Deaton, R. W.; Armstrong, T. A.; Fuchs, R. L. Sims, S. R.; Greenplate, J. T. And Fischhoff, D. A. Insect resistant cotton plants. BioTechnology 8, 939-963, 1990.
- Schnepf, E.; Crickmore, N.; Van Rie, J.; Lereclus, D.; Baum, J.; Feitelson, J.; Zeigler, D. R.; Dean, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol. and Molec. Biol. Rev. 62, 775-806, 1998.
- Vilarinhos, P. T. R. Dengue transmission and *Aedes aegypti* control in Brazil. "In: VIII International Colloquium on Invertebrate Pathology and microbial Control (ICIPMC)", August, 18 to 23, Iguassu Falls, Brazil, XXXV Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, Londrina, PR, 07/2002, p. 55-57. 2002.

MEJORANDO CEPAS PARA EL CONTROL BIOLÓGICO: LOGROS Y PROBLEMAS

Colin Berry¹, Katherine Gammon, Gareth Jones, Maria Helena Silva Filha and Brian Dancer

Para un efectivo uso del control biológico en el campo, es necesario seleccionar las cepas correctas contra cada insecto. En ocasiones es necesario controlar mas de un tipo de insecto o es necesario evitar el desarrollo de resistencia, siendo así deben utilizarse productos con múltiples cepas de *Bacillus thuringiensis*. En estas ocasiones seria deseable poder combinar las ventajas de cada una de estas cepas.

Bacillus sphaericus (Bs) y *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) son utilizados para control de mosquitos. Bs produce una toxina potente contra mosquitos de los géneros *Culex* y *Anopheles*, funciona bien en agua contaminada y muestra un alto nivel de resistencia contra la luz UV. Sin embargo, existe la posibilidad de desarrollo de poblaciones de mosquitos resistentes a Bs, tanto en condiciones de laboratorio como de campo, situación que puede limitar el uso de esta bacteria. Por su parte, Bti produce cuatro toxinas con alto nivel de expresión, la resistencia de mosquitos contra Bti nunca ha sido comprobada en campo (principalmente en agua contaminada), no obstante su resistencia a UV es mas baja que la de Bs. En Bti, un plásmido grande (pBtoxis, 128kb) lleva los genes para todas las toxinas. Siendo así, existe la posibilidad de combinar las toxinas de Bti con las de Bs a través de la transferencia del plásmido de Bti para Bs.

Para demostrar esta posibilidad, una cepa de Bti obtenida del Instituto Pasteur fue la fuente del plásmido, este fue marcado con un gen de resistencia contra eritromicina (pBtoxis::erm) para seguir el movimiento del plasmido. Cepas de Bs sin enzimas de restricción fueron recipientes en una conjugación. Para esto fue utilizada otra cepa de Bti que lleva el plásmido pXO16 que realiza la conjugación de otros plásmidos. A través de esta conjugación triparental, se produjeron nuevas cepas de Bs con el plásmido pBtoxis::erm. La producción de proteínas toxicas de Bti en esas cepas transconjugantes fue demostrada por SDS-PAGE. Así fue posible observar la producción de la toxina Cry11Aa, sin embargo otras toxinas importantes como Cry4Aa y Cry4Ba no fueron producidas.

Las nuevas cepas de Bs no mostraron mayor toxicidad contra *Culex* respecto de las cepas sin pBtoxis, sin embargo, al estudiar la toxicidad frente *Aedes aegypti* las cepas transconjugantes mostraron mayor toxicidad que cepas Bs y lo mismo fue observado en cepas de *Culex* resistentes a Bs. Esto último puede deberse a que las cepas transconjugantes tienen una gama más extensa de toxicidad y, tal vez, pueden evitar problemas de resistencia en *Culex*.

Para usar las cepas nuevas en producción, el plásmido debe ser estable. Pruebas de estabilidad muestran que las cepas mantienen el plásmido durante el crecimiento vegetativo con pocas perdidas. Por otro lado, durante la esporulación, el plásmido se pierde rápidamente, en ausencia de selección con antibióticos. Esto puede ser un problema, principalmente al producir las cepas sin marcación, las que, por otra parte, son más fáciles de registrar para aplicaciones en campo ya que no están modificadas genéticamente.

Los resultados obtenidos hasta el momento demuestran que es posible combinar características deseables de diferentes cepas de *Bacillus*, aún las de especies diferentes, para mejorar la actividad tóxica contra insectos. Esto también es posible entre variedades de Bt. Así, por ejemplo, existen cepas comerciales de Bt que son el resultado de combinaciones de variedades, como la *Foil* que surgió de la combinación de cepas de Bt para producir un Bt var. *kurstaki* con mejor actividad contra *Leptinotarsa decemlineata* ("colorado potato beetle") y *Ostrinia nubilalis* ("european corn borer"). Se espera que en el futuro más cepas de este tipo sean producidas para el desarrollo de productos comerciales.

¹ Cardiff School of Biosciences, University of Cardiff, Museum Avenue, Cardiff, UK

AISLAMIENTO Y USO DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS PARA EL CONTROL DE PLAGAS DE IMPORTANCIA ECONÓMICA EN URUGUAY.

Ing. Agr. (PhD) Alda Rodríguez dos Santos¹

Estudios enmarcados en el desarrollo de una tesis doctoral de la Universidad de la Habana-Cuba y llevada adelante en instalaciones de INIA Uruguay, se aislaron y estudiaron hongos patógenos de *T. vaporariorum*, sus características bio ecológicas, eficiencias, compatibilidades con otras alternativas de control y producción masiva.

Esto pone en manifiesto las posibilidades de Uruguay en el reconocimiento y uso de hongos patógenos de plagas de importancia económica en Uruguay y una metodología de desarrollo de estas tecnologías.

Actualmente, nuevas investigaciones llevadas a cabo en el Batovi Instituto Orgánico, permiten promisoriamente conocer la existencia de plagas de la agricultura y la ganadería que son afectadas por hongos entomopatógenos que se encuentran naturalmente generando epizootias, con diferentes grados de eficiencia. Esto es indicador de que tenemos en el país, una presencia natural de estos organismos, muy variada y que podrían ser fuente de una amplia gama alternativa de control para plagas de importancia, lo que traería múltiples ventajas, económicas, sociales y ambientales, para lo cual se requiere de desarrollo científico, legal y organizativo del país.

EXPERIENCIA NACIONAL EN PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN DE AGENTES MICROBIANOS

Ing. Agr. MSc. Amalia Baraibar Lucas¹

Lage y Cía. S.A. es una empresa uruguaya de capital cerrado que produce y comercializa desde 1960 en el país y en la región inoculantes microbianos a base de rizobios, bradirizobios y más recientemente azospirilos. A partir de 1995, la empresa definió estrategias para iniciar su desarrollo en la producción y comercialización de Agentes Microbianos para el control biológico de hongos de suelo y planta, eligiendo para ello al género *Trichoderma*. Desde el año 2004, y como parte de un convenio con INIA, **Lage y Cía. S.A.** está incursionando en la producción de hongos entomopatógenos.

La vasta experiencia en producción de inoculantes para Leguminosas y Gramíneas, así como la infraestructura disponible para la manipulación de microorganismos facilitan el avance de este tipo de Proyectos, ya que si bien hay diferencias propias debidas al sistema específico donde se aplique, hay **aspectos y enfoques industriales** comunes a todo microorganismo del sistema suelo- planta.

¿Cuáles son los pasos para la obtención de un producto comercial a base de agentes microbianos para control biológico?

La producción de agentes microbianos de cualquier naturaleza cumple necesariamente con las siguientes etapas:

1) La selección de cepas, que requiere la definición de todos aquellos parámetros de eficiencia, competitividad y persistencia en el sistema que permitan comparar el mayor número posible de individuos aislados y también cepas seleccionadas liberadas o de colecciones extranjeras, que mantengan estabilidad genética frente a la manipulación y sucesivos cultivos sin sufrir alteraciones de su genoma.

2) Aptitud para cultivo en medios comerciales, para verificar la habilidad y capacidad de producir biomasa en contenedores industriales con ingredientes económicos y disponibles en el país o de fácil acceso.

3) Selección del soporte para la vehiculización del agente microbiano, teniendo en cuenta a) la necesidad de esterilización del mismo por el método más conveniente y económico b) la disponibilidad y facilidades para su manipuleo c) la capacidad de sostener altas poblaciones microbianas en almacenamiento por períodos no menores a 6 meses.

4) Formulación del producto comercial, etapa que comprende todo lo referente al comportamiento del principio activo (el o los agentes microbianos seleccionados) en el vehículo y la compatibilidad con los adyuvantes.

5) Envase y envasado requieren definición de las características en función del mercado, infraestructura para el envasado y condiciones de almacenamiento en planta y en el mercado.

Un producto comercial a base de un agente microbiano deberá mantener eficacia similar al potencial de la cepa incluida, estabilidad física y biológica en almacenamiento, bajo costo para el productor (usuario final), practicidad de aplicación, buena cobertura de follaje, tolerancia a condiciones ambientales adversas, compatibilidad con aquellos agroquímicos más empleados, entre otros parámetros cualitativos.

Deberá tener una concentración que iguale o supere los estándares preestablecidos para los cultivos líquidos, el producto salido de planta industrial y el producto almacenado.

En conclusión: La **calidad** final del producto se define a través de la concentración mínima exigida para el producto salido de fábrica, la concentración mínima requerida a la fecha de vencimiento, pureza, viabilidad, estabilidad e identidad genética del organismo, entre otros parámetros que deben ser establecidos para cada agente microbiano.

¹ BIO Uruguay

¹ Lage y Cia S.A.

¿Quiénes son los involucrados en la cadena de Producción de un Agente Microbiano y cómo interactúan?

La experiencia uruguaya en producción de inoculantes ha sido exitosa y es reconocida en la región y en el mundo. Uruguay cuenta con los estándares de calidad de inoculantes para leguminosas más exigentes, al igual que Australia, Nueva Zelanda y Canadá. La adopción de la tecnología de inoculación por parte de los productores uruguayos es del 100 %, siendo una tecnología respetada, considerada y convincente por los resultados que genera en el campo. Hoy Uruguay ahorra por concepto de fertilizantes nitrogenados el equivalente a 175 millones de dólares (dato MGAP del 3/3/2006).

En Uruguay, la producción de inoculantes para leguminosas comenzó a partir de una Decisión de **Gobierno** en el marco de un Gran Proyecto Ganadero, que incluía la incorporación fuerte del componente leguminosa en nuestras pasturas naturales, la fertilización con fósforo y la inoculación de las leguminosas con el objetivo de producir más carne, leche y lana a partir de nuestros campos. Así nació la pradera uruguaya.

Fue necesaria la especialización técnica y el apoyo financiero propio y del extranjero para lograrlo. La investigación básica y aplicada en selección de cepas estuvo a cargo de laboratorios especialmente creados para fines específicos de **Investigación y Desarrollo** pertenecientes al **Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP), Ministerio de Educación y Cultura y a la Universidad de la República**, quienes irían dando respuesta a las diferentes situaciones generadas a partir de la puesta en marcha del Proyecto. Mediante el involucramiento de la **Industria Nacional** como parte integrante de esta cadena de valor y trabajando bajo acuerdos de complementación, se llegó a la producción de los primeros inoculantes a mediados del siglo pasado, controlados en el país por el Dr. R. A. Date de School of Agriculture, University of Sydney, N.S.W., Australia.

La razón principal del éxito de estos emprendimientos se sustenta en el **marco legal vigente**, desde el primer Decreto fechado 23/2/1961, que ha evolucionado hasta nuestros días a través de nuevos Decretos 546/981 del 28/10/1981 y 547/99 del 8/1/1999. La normativa es concreta en cuanto a las directivas para la producción, comercialización, registro y distribución de los inoculantes y cuenta con definiciones claras para la importación de materiales y cepas desde el extranjero, especificando las condiciones a que deben someterse para ser liberados al comercio.

En conclusión: En Uruguay a partir de la creación de estos Decretos y hasta la fecha, todas las partidas de inoculantes deben ser obligatoriamente registradas por un organismo creado para tal fin dentro del MGAP, quien establece el cumplimiento de los estándares de calidad y otorga la fecha de vencimiento de cada lote antes de salir a la venta y también fiscaliza en los locales de venta, durante la vida útil de los mismos.

¿Cuál es la situación de los productos en base a Agentes Microbianos para el Control Biológico? Visión desde la Industria.

1) Falta el Gran Proyecto Nacional y la Normativa que lo estructure.

2) **Los actores:** las Instituciones Estatales, la Investigación, la Industria Nacional y los Productores se han venido involucrando en el tema porque no hay forma de evadirlo y en algunos casos es el único camino para adelante. Se trabaja aisladamente, hay superposición de esfuerzos, equipamiento y temáticas. Lentamente se van generando los Convenios de Vinculación Tecnológica y ha existido una clara disociación entre los Organismos de Investigación y la Industria.

3) **Investigación:** han comenzado a insinuarse las prioridades para la Investigación en el área de Control Biológico pero sin definiciones concretas todavía. El país cuenta con muy buenos especialistas en diferentes áreas de esta temática. Hay esfuerzos individuales y escasos Convenios de Vinculación Tecnológica entre la Investigación y las Empresas para volcar a los productores agropecuarios los resultados obtenidos.

4) **La Industria Nacional** no está incentivada porque no hay amparo legal, al no haber normativa que defina los pasos a seguir para obtener un registro. Hay un único producto nacional de libre venta, con solicitud de registro desde hace 3 años. La ausencia de regulación hace que el mercado esté siendo invadido por productos extranjeros importados bajo una posición arancelaria inadecuada sin requisitos para su ingreso al país o directamente de contrabando, que circulan sin registro ni control de calidad. Como Empresa es muy difícil sostener en el tiempo cualquier Proyecto que carezca de visión comercial, para lo cual es indispensable un marco regulatorio.

5) **Los Productores:** no están correctamente asesorados de estas potenciales tecnologías, pero dada su gran preocupación por la falta de respuesta a la aplicación de productos químicos prueban todo lo que se les ofrece y no siempre con éxito, lo que genera una gran desconfianza y hasta reticencia a volver a utilizar productos biológicos.

6) **Reglamentación: Registro y Control de Calidad:** en Uruguay, no hay Reglamentación ni para Registro de Productos en base a Agentes Microbianos para Control Biológico ni estándares de Calidad perfectamente definidos para este tipo de productos. Al no haber reglamentación, las autoridades no pueden expedirse. *Lage y Cía.* espera una respuesta afirmativa a la solicitud de registro del primer producto comercial en base a un Agente Microbiano de Control Biológico (*Trichosoil*).

7) **La Región:** dispone de productos comerciales a base de agentes microbianos, aunque sin control de calidad ni fiscalización oficial en origen. Como país, estamos siendo invadidos por productos libremente ofrecidos, sin control de calidad, sin conocimiento de los microorganismos, ni la o las cepas del mismo, conteniendo otros microorganismos contaminantes de aquel seleccionado, sin análisis de Protección Ambiental, sin Análisis de Riesgo.

Que este Taller sirva para finalmente comenzar a caminar ágilmente en un sendero que **no nos es desconocido** y para lo cual están **todas las capacidades** a disposición para poder hacerlo.

Como Empresa Nacional, decana en la Producción Industrial de Agentes Microbianos en el MERCOSUR, reclamamos una Normativa que proteja nuestro patrimonio Intelectual, Biológico, Ambiental y Económico, de la misma forma que desde hace 45 años, se reglamenta el comercio de los inoculantes para leguminosas.

CARACTERIZACIÓN DE UNA COLECCIÓN DE *Pseudomonas* FLUORESCENTES NATIVAS COMO PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO DE LA ALFALFA

Yanes, M. L.¹, A. Fernández², A. Arias¹ y N. Altier²

Introducción

La alfalfa (*Medicago sativa* L.) ofrece numerosos beneficios para los productores lecheros e invernaderos intensivos. Es un cultivo de crecimiento estival, muy persistente y tolerante a la sequía, lo que le permite alcanzar excelentes rendimientos productivos. Sin embargo, cuando las condiciones ambientales son desfavorables para una rápida emergencia y establecimiento de las plantas, se observa una alta incidencia de *damping-off* causado por patógenos del suelo. El control biológico de dichos patógenos mediante *Pseudomonas* fluorescentes puede ser una estrategia promisoriosa dentro de un programa de manejo integrado de plagas. Algunas especies de *Pseudomonas* fluorescentes son catalogadas como PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*; Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal). Dichas bacterias se encuentran frecuentemente en la rizósfera y presentan una gran capacidad para colonizar raíces, lo cual las convierte en buenas candidatas para la producción de inoculantes. Las *Pseudomonas* fluorescentes pueden favorecer el crecimiento de las plantas directa e indirectamente. La promoción directa se lleva a cabo mediante síntesis de fitohormonas y facilitando la adquisición de minerales a través de la raíz. Indirectamente, mediante el control biológico de patógenos, se obtiene una reducción del estrés de la planta, generado por los daños producidos por el patógeno. Los principales mecanismos de control biológico incluyen: resistencia inducida en la planta, competencia por nutrientes o exclusión del patógeno del sitio de infección, y producción de metabolitos secundarios con actividad antifúngica (antibióticos, biosurfactantes, enzimas hidrolíticas, entre otros).

La búsqueda de posibles agentes de control biológico nativos requiere un exhaustivo análisis de grandes colecciones de aislamientos microbianos.

Una colección de *Pseudomonas* fluorescentes nativas fue aislada de rizósfera de alfalfa provenientes de tres regiones agroecológicas del país (INIA-La Estanzuela-Colonia y EEMAC-Paysandú con historia de alfalfa y UEG-INIA Tacuarembó con historia previa de campo natural).

El objetivo del presente trabajo fue la caracterización fenotípica y genotípica de dicha colección, determinando posibles mecanismos de promoción del crecimiento y protección contra enfermedades de implantación causadas por hongos fitopatógenos.

Resultados y discusión

Los aislamientos provenientes de suelos con historia previa de alfalfa presentaron mayor porcentaje de aislamientos antagonistas cuando se ensayaron *in vitro* frente a *Pythium debaryanum*. Sin embargo, aislamientos de las tres regiones mostraron capacidad protectora contra el *damping-off* causado por *P. debaryanum* en plantas de alfalfa, en ensayos *in vivo* bajo condiciones controladas, (figura 1). Estos mismos aislamientos también mostraron una capacidad promotora del crecimiento de la alfalfa importante, en ensayos en almácigos, en ausencia del patógeno.



Figura 1. Efecto de los aislamientos de *Pseudomonas* fluorescentes en la emergencia de alfalfa, en presencia de *P. debaryanum*. Número de plantas de alfalfa emergidas a los 15 días post-siembra, expresado en porcentaje. Barra blanca: control de germinación, sin inocular; barras grises: aislamientos de *Pseudomonas* fluorescentes nativas; barras punteadas: cepas de *Pseudomonas fluorescens* aisladas de plantas de *Lotus corniculatus*; barra negra: control de enfermedad. Los aislamientos que mostraron incremento significativo en el número de plantas emergidas se indican con un asterisco (LSD, $P < 0.05$).

La evaluación de toda la colección en cuanto a la capacidad de solubilizar fosfato inorgánico mostró altos porcentajes en los aislamientos provenientes de Glencoe (46.5%) respecto a los provenientes de EEMAC (30.8%) y Estanzuela (32.6%). Estos últimos probablemente hayan sido sometidos a fertilizaciones fosforadas durante algún tiempo, mientras que en Glencoe pudo haber existido cierta presión selectiva por aquellos aislamientos capaces de desarrollarse en suelos pobres de fosfato. En cuanto a la capacidad de producir biosurfactantes se observó un mayor porcentaje en los aislamientos de EEMAC y Estanzuela (56.6% y 51% respectivamente) en comparación con los de Glencoe (30.7%).

En toda la colección, solamente se pudo detectar, por PCR, un 5% de aislamientos conteniendo genes para la síntesis de antibióticos conocidos (derivados de fenazina, fluoroglucinol, pirrolnitrina y pioluteorina). La inhibición de *P. debaryanum* observada *in vitro* posiblemente se deba a otros compuestos antifúngicos que aún no han sido caracterizados.

Cinco aislamientos de interés fueron fenotípicamente identificados como *Pseudomonas fluorescens* mediante el kit de ensayos bioquímicos API 20NE.

Genotípicamente, luego de analizar el patrón de bandas obtenido por *rep-PCR*, se observaron similitudes entre aislamientos provenientes de suelos con historia de campo natural, los cuales se diferenciaron de los provenientes de suelos con historia de alfalfa. A nivel genotípico también se observó que los aislamientos que poseían genes para la síntesis de antibióticos estaban muy relacionados y se agrupaban con las cepas de referencia que producen los antibióticos conocidos. Los aislamientos con

¹ Lab. Ecología Microbiana. IIBCE. Av. Italia 3318. Montevideo, Uruguay.

² Protección Vegetal INIA-Las Brujas. Uruguay.

capacidad de solubilizar fosfato inorgánico y/o capacidad de producir biosurfactantes se agruparon en *clusters* definidos.

Debido a las similitudes genotípicas de los aislamientos, las cuales se relacionan directamente con características fenotípicas, sería posible llegar a desarrollar un método rápido con el cual predecir, con cierta probabilidad, que un aislamiento de *Pseudomonas fluorescens* posee ciertas cualidades en base a su análisis genotípico. Dado que los aislamientos promisorios se ubican en dos agrupamientos genotípicos determinados, aislamientos con un perfil genotípico similar tendrían altas probabilidades de ser promotores del crecimiento de la alfalfa.

Los aislamientos: α P388, α P271, α T388 y α T688 son excelentes candidatos como biofertilizantes y bioplágidas de alfalfa y se continuará su estudio para determinar los mecanismos de promoción del crecimiento y de control biológico presentes en los mismos.

Financiado por Fondo Prof. Clemente Estable y PEDECIBA.

***Pseudomonas fluorescens* UP148: AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO ADECUADO PARA LA FORMULACIÓN DE UN INOCULANTE DE APLICACIÓN EN LEGUMINOSAS FORRAJERAS.**

L. Quagliotto¹ y A. Arias¹

Pseudomonas fluorescens UP148 produce un compuesto antifúngico derivado de la fenazina que está implicado en su actividad antagonista frente a fitopatógenos causantes de enfermedades de implantación en leguminosas forrajeras. Esta cepa demostró capacidad biocontroladora de *Pythium* spp. en el laboratorio, bajo condiciones controladas, y en experimentos en campo. Su presencia en la rizósfera no afecta la eficiencia de la fijación biológica de nitrógeno, la tasa de nodulación o la colonización por cepas comerciales de rizobio. Por lo tanto, UP148 podría ser utilizada como principio activo, bajo una adecuada formulación, en la producción de un inoculante de control biológico de aplicación comercial en leguminosas forrajeras.

Los objetivos del presente trabajo fueron:

- 1) Seleccionar un medio de cultivo adecuado para la producción de biomasa de *P. fluorescens* UP148 a gran escala.
- 2) Determinar la producción de metabolitos antimicrobianos en dicho medio.
- 3) Evaluar la sobrevivencia de la cepa UP148 en turba estéril.

Se evaluó el crecimiento de *P. fluorescens* UP148 en varios medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono y nitrógeno. La máxima producción de biomasa ocurrió en los medios de referencia KB o PPM. En el medio M2S la producción final de biomasa fue similar a la encontrada en los medios de referencia, presentando un tiempo de generación menor o igual al observado en los mismos. M2S fue el medio seleccionado como más adecuado para la producción de biomasa a mayor escala, luego de su modificación a M2G. Este último contiene glicerol y extracto de malta y de levadura como fuentes de carbono y nitrógeno.

P. fluorescens UP148 tiene la capacidad de producir ácido cianhídrico en placas conteniendo medios de cultivo suplementados con glicina y FeCl₃, siendo probablemente este compuesto responsable de parte de su actividad biocontroladora. Sin embargo, no se detectó la producción del mismo en M2S o M2G en ausencia de glicina y FeCl₃. Se observó antagonismo *in vitro* de la bacteria frente a *Pythium debaryanum* en placas de cultivos duales conteniendo diferentes medios, excepto en los medios M2S o M2G. Hubo inhibición total del crecimiento micelial cuando se utilizó el producto de una extracción con acetato de etilo, obtenido a partir de 10 ml de sobrenadante de cultivo en cualquiera de dichos medios. La síntesis del compuesto antimicrobiano característico de la cepa se detectó por análisis cromatográfico y espectrofotométrico de la fase orgánica de los cultivos, en todos los medios evaluados a pequeña y a mayor escala. Se estudió la protección de enfermedad *in vivo* por la cepa UP148 en presencia de *P. debaryanum*, utilizando semillas de *Lotus corniculatus* inoculadas con células producidas en los diferentes medios de cultivo. El efecto protector de enfermedad fue independiente del medio de cultivo utilizado para crecer el inóculo bacteriano, estando relacionado con la cantidad de inóculo presente en las semillas al momento de la siembra.

En este trabajo se observó que las poblaciones de *P. fluorescens* UP148 inoculadas en bolsas cerradas de turba almacenadas a 4 °C, se mantuvieron estables en el orden de 10¹⁰ UFC/g durante 12 meses cuando las bolsas habían sido inoculadas con UP148 individualmente. Cuando la turba fue coinoculada con UP148 y cepas comerciales de rizobio, ambas especies se encontraron estabilizadas en 10⁹ UFC/g durante el mismo período.

Sin embargo, los valores de *P. fluorescens* UP148 encontrados por semilla luego de la inoculación con dichas turbas utilizando metilcelulosa como adherente, estuvieron por debajo del valor esperado. El porcentaje de germinación de las semillas no se vio afectado por la inoculación.

¹ Laboratorio de Ecología Microbiana. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE). Av. Italia 3318. CP 11600. Montevideo, URUGUAY.

Los resultados anteriores muestran que la cepa *P. fluorescens* UP148 es factible de ser usada en la formulación de un inoculante de control biológico, utilizando el medio M2G para la producción de biomasa a gran escala y turba estéril como soporte.

La estrategia seleccionada representa una aproximación original para la producción de un biofungicida adaptado a las condiciones de nuestro país, de aplicación en la etapa de implantación de las pasturas dentro de un programa de manejo integrado de plagas y que tiene en cuenta las prácticas agrícolas ya adoptadas por los productores.

PRODUCCIÓN Y UTILIZACIÓN A CAMPO DE UN BIOINSECTICIDA BASADO EN EL VIRUS DE POLIHEDROSIS NUCLEAR DE *Rachiplusia nu* (LEPIDOPTERA:NOCTUIDAE), LAGARTA DEL GIRASOL EN URUGUAY.

Ing. Agr. MSc Willy Chiaravalle¹ e Ing. Agr. Alicia Ferreiro²

Los trabajos se desarrollaron desde 1988 hasta 1997, en el Departamento de Control Biológico de los Servicios de Protección Agrícola, del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca de Uruguay. La etapa final de producción, formulación y validación comercial fue realizada en convenio con la Cooperativa de tercer grado Central de Granos.

A pesar de que las tecnologías fueron originalmente desarrolladas para el VPN de *Anticarsia gemmatalis* lagarta de la soja en EMBRAPA/ CNPSo, por el Dr. Flavio Moscardi, debido a que la especie tiene particularidades muy diferentes fueron necesarios 6 años de investigación, en coordinación con científicos de Brasil y Argentina pertenecientes a EMBRAPA e INTA, para lograr establecer una cría masiva del insecto y una multiplicación de virus, eficiente. Capítulo aparte fue la formulación y comercialización.

La producción del hospedero se realizó sobre dieta artificial alcanzándose a producir más de 100.000 larvas en laboratorio. La multiplicación del virus incluía incorporación de éste en la dieta, conservando los cadáveres en freezer, para su posterior maceración, filtrado cuantificación y formulación con caolín como polvo mojable. El producto se envasaba en cantidades para pulverizar unidades de 20 hectáreas (vuelo de un avión) y se conservaba en freezer hasta su comercialización.

Como resultado final en la zafra 1996/97 se pulverizaron con avión 600 hectáreas de girasol a un costo del bioinsecticida de U\$S 4 por hectárea, con un éxito de tal magnitud que aún hoy en día los productores y técnicos, nos preguntan por la existencia del producto.

Lamentablemente el proyecto fue discontinuado por los Servicios de Protección Agrícola, y quizás una de sus mayores contribuciones fue formar personal técnico y no técnico en la producción masiva de insectos y virus entomopatogénicos, así como demostrar la viabilidad, práctica y económica de la producción, comercialización y uso de bioplaguicidas en Uruguay, con las grandes ventajas, económicas y ecológicas que esto representa.

¹ ENTOAGRO.

² Agroiinternacional

PRODUCCION DE BACULOVIRUS EN BRASIL

Dr. Flavio Moscardi¹

El siguiente trabajo corresponde al material desgrabado de la intervención del autor

En mi presentación voy a intentar mostrar como nosotros solucionamos un problema muy serio, como es la multiplicación masiva e *in vivo* de virus en laboratorio cuando la producción a campo de los mismos no era ni suficiente ni de alta calidad. Me referiré entonces a la producción del baculovirus de la poliedrosis nuclear de *Anticarsia gemmatalis* conocida también como "lagarta de la soja", un virus que es utilizado en gran escala en Brasil, ya que los otros dos virus que se producen no están registrados y además solo se utilizan en muy pequeña escala.

Inicialmente, hace dos décadas o más, nosotros teníamos un sistema de producción en laboratorio que era apropiado para realizar investigación pero no producciones comerciales. De todas formas, hubo algunos intentos para producir en laboratorio utilizando este sistema, y dos empresas produjeron el virus de esta forma en la década del noventa. Geratec llegó a producir 150 mil hectáreas equivalentes del virus por año pero esta producción fue interrumpida debido, principalmente, al alto costo de los componentes de la dieta, la mano de obra y recipientes para la producción. Con estos altos costos, la producción de virus en Brasil pasó a ser hecha en campo, por empresas en convenio con EMBRAPA, comprando el virus cosechado a campo por diferentes empresas y utilizando esta materia prima para procesar y formular el virus. Estas empresas (como COODETEC) poseían un grado de especialización muy grande que las hacía muy eficientes a la hora de producir grandes cantidades de orugas muertas en campo. La producción se hacía aplicando el baculovirus sobre parcelas de campo sembradas con soja en las que había una alta población del insecto (alrededor de 20 o más orugas por metro), y seis días después de la aplicación se hacía una inspección de las áreas para seleccionar aquellas con mayor potencial para la producción de virus. Las aplicaciones se hacían por lo menos en tres áreas de campo por día para seleccionar una de las tres a los seis días, y desde allí cosechar entre los ocho a diez días de realizada la aplicación las orugas muertas. Luego, estas orugas eran almacenadas a -10° C y, a modo de ejemplo, en la campaña 2002-2003 se produjeron aproximadamente 45 toneladas de orugas muertas que es equivalente al tratamiento para 2 millones de hectáreas sembradas con soja. Esto muestra la capacidad, la importancia de la producción en campo y la cantidad de material o de producto que se puede producir a un costo muy bajo. Las orugas almacenadas en cámara fría eran después procesadas a través de un equipo similar a un equipo tipo de extracción de jugo de frutas. Esta mezcla se filtraba y el filtrado conteniendo los virus era mezclado con productos inertes como caolí y otros, expandiéndose luego en bandejas para secarlo en salas con temperatura controlada y ventilación forzada. Una vez seco, el material era embolsado para luego almacenarse en bolsas de 60 kilogramos con posterior control de calidad por la EMBRAPA Soja.

Sin embargo, el proceso de producción en campo tiene varias limitaciones. La primera es que varios factores bióticos y abióticos afectan el número de orugas de cada campaña. Esto hacía muy difícil para las empresas el poder planear una producción con anticipación y, por lo tanto, realizar una oferta de producto relacionada a la demanda de los clientes. Tanto es así, que en las últimas campañas (en los últimos cinco-seis años) el virus producido no fue suficiente para atender la demanda de los agricultores. Para que tengan una idea, se producía virus para 1.5 millones de hectáreas y había una demanda para casi 2 millones. Por otro lado, la presión sobre las empresas por aumentar su productividad influyó negativamente sobre la calidad del producto ofrecido. Por esa razón, la productividad del virus por kilo de orugas y la calidad del material decreció en los últimos años.

Esta situación generó la necesidad de desarrollar un proceso de producción más predecible y en mayor escala que atendiera la creciente demanda por el producto y solucionase el problema de la baja calidad. Se desarrolló entonces un proceso comercial para las empresas que tienen contrato con EMBRAPA. Esta fue una prioridad.

Entre otros aspectos, como la formulación este pasó a ser la prioridad y constituye hoy el mayor avance con respecto a producción del virus. Como el tiempo es corto nosotros no vamos a informar de detalles técnicos de cómo fue obtenido cada parámetro, pero sin lugar a dudas, la principal modificación que se hizo fue la sustitución del agar por otro agente gelificante, y la reducción de caseína en casi un 50%, disminuyendo los costos de producción del proceso. Hubo otros elementos que también fueron cambiados, como recipientes más baratos, optimización de la densidad, el estadio larval para la inoculación, dosis y temperatura. Otro aspecto importante fue el establecimiento de un laboratorio piloto para ajustar los nuevos procedimientos, para testear si todo el proceso funcionaba para ofrecerlo a las empresas como un paquete tecnológico. Nosotros pretendíamos la transferencia de la tecnología para las empresas que producen el insecticida biológico.

Luego de la optimización de todos los componentes involucrados en el proceso, el costo final de la dieta fue reducido de 13 a menos de 2 reales, lo que hizo viable el proceso de producción desde el punto de vista comercial. Con todos los parámetros optimizados, se llegó a un costo de producción en laboratorio (de la materia prima) de menos de 1 real por hectárea. El costo a campo es menor pero de todas formas en este nivel la producción en laboratorio es viable.

Luego se propuso a las empresas pasar de escala laboratorio a planta piloto, construyendo una planta con esas características, con una parte para la producción del insecto y otra del virus.

El proceso de producción de virus consistía de un proceso que incluía el tipo de recipiente, el estadio de inoculación, el número de insectos por recipiente, el número de poliedros del virus para la inoculación, la incubación a esa temperatura, y el mantenimiento de la producción del insecto. Un 3 a 5% de toda la producción de insectos se destinaba para mantener la colonia.

El proyecto piloto fue tan exitoso que COODETEC resolvió construir la mayor biofábrica en el mundo para la producción del virus *in vivo*. Con dos laboratorios climatizados principales de 750 mts² cada uno -uno para producción del insecto y otro para producción del virus- la empresa posee todas las condiciones para la producción en gran escala.

Como ya dijimos, estos son laboratorios muy amplios, con muchas salas para la producción de todas las fases del insecto, como las varias salas para cría de mariposas y obtención de huevos.

(En esta transparencia) se puede ver las salas de incubación de las orugas, contenidas en estos recipientes de medio metro. Luego, en 4^o instar, estos insectos pueden ponerse a una densidad de alrededor de 300 orugas por recipiente. De cada recipiente luego se abrirá una nueva caja con orugas para mantenimiento de la colonia. (En esta otra foto) pueden verse las salas de preparación de dieta, con equipos para secarlas y dosificarlas.

Cuando las larvas llegan al 4^o instar son colocadas en vermiculita, donde van a pupar. Estas son las pupas que luego son separadas para mantener la colonia. Solo del 3 a 5% de la producción se destina al mantenimiento de la colonia, siendo el resto destinado a la producción. Esta operación se hace, como ya lo dijimos, en otro laboratorio específico para la producción del virus, para la producción del patógeno, desde donde parte el producto para su formulación y posterior almacenamiento.

El laboratorio establecido en COODETEC, fue planeado para inocular 800 mil orugas por día trabajando a su máxima capacidad, empleando 45 operarios para la producción de 27 a 29 toneladas de orugas por año, lo que a su vez resultaría en 1,8 a 2,2 millones de hectáreas equivalentes por año.

Solo recientemente en Londrina EMBRAPA Soja se construyó un laboratorio piloto. Ustedes podrían preguntarme entonces ¿por qué un laboratorio piloto de EMBRAPA si el proceso ya está instalado en gran escala? La respuesta es porque este sistema va a permitir mejorar el proceso en algunas etapas y también servirá como lugar de entrenamiento de las otras empresas que no están produciendo en estos momentos virus por esta metodología. Este laboratorio piloto permitirá inocular de 25 a 30 mil orugas por día para producir 120 mil hectáreas equivalentes del virus por año. De esta manera, el laboratorio piloto de EMBRAPA

¹ EMBRAPA CNPSo

serviría para el mejoramiento continuo del proceso y para el repaso de las innovaciones y el entrenamiento de las empresas que tienen contrato con EMBRAPA.

La tendencia en los próximos años la visualizamos como la sustitución gradual de la producción de virus en campo por la producción en laboratorio, lo que seguramente resultará en productos conteniendo virus de mayor calidad y ayudará a las empresas a planificar con antelación las producciones que atiendan a la necesidad de los productores.

HACIA EL DESARROLLO DE PROCESOS FACTIBLES DE PRODUCCIÓN DE BIOINSECTICIDAS VIRALES EN CULTIVOS DE CÉLULAS DE INSECTOS.

Juan Daniel Claus¹

El desarrollo de procesos de producción de baculovirus en cultivos celulares ha sido propuesto repetidamente durante los últimos cuarenta años, como una alternativa a la multiplicación viral en insectos. Sin embargo, ventajas como una calidad superior del producto, un mejor control del proceso y escalabilidad predecible, entre otras, no han alcanzado a neutralizar claras desventajas, como lo son los menores rendimientos, los mayores costos y la menor actividad biológica, que impactan negativamente en la economía del proceso. Con el objetivo de avanzar en el desarrollo de procesos factibles de producción de baculovirus insecticidas en cultivos de células de insectos, y tomando como modelo la producción de poliedros del virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV), se plantearon las siguientes metas:

- a) seleccionar una línea celular susceptible y altamente permisiva a la replicación de AgMNPV, capaz de adaptarse al cultivo en suspensión y a medios de cultivo libres de suero;
- b) caracterizar los requerimientos nutricionales y metabólicos de la línea celular seleccionada;
- c) sobre la base del conocimiento de los requerimientos nutricionales y la caracterización metabólica, diseñar un nuevo medio de cultivo libre de suero y de bajo costo para el cultivo de la línea celular seleccionada, capaz de sostener elevados rendimientos de poliedros de AgMNPV;
- d) optimizar los rendimientos de poliedros de AgMNPV mediante manipulación de los parámetros de cultivo e infección en un medio de cultivo de bajo costo, a baja escala y en reactores escalables.

En una primera etapa, la línea celular UFL-AG-286, establecida a partir de tejidos embrionarios del huésped viral natural (*Anticarsia gemmatalis*) (Sieburth P, Maruniak J, 1988*), fue adaptada al cultivo en suspensión en un medio de cultivo estándar (TC-100), suplementado con 10% de suero fetal bovino. Los cultivos adaptados crecieron exponencialmente, con un tiempo de duplicación de 29 horas, alcanzando una densidad celular máxima superior a $3,5 \times 10^6$ células/ml. Experimentos de infección de los cultivos en suspensión con AgMNPV revelaron una alta susceptibilidad y elevada producción de ambos fenotipos virales, virus brotados y poliedros. Además, estos cultivos pudieron adaptarse al crecimiento en un medio de cultivo libre de suero comercial, con un tiempo de duplicación de 35 horas y una densidad celular máxima superior a 5×10^6 células/ml.

La caracterización de los requerimientos de aminoácidos e hidratos de carbono de las células de la línea UFL-AG-286 adaptadas al cultivo en suspensión mostró que, excepto la glucosa y la glutamina, el resto de los nutrientes presentes en el medio TC-100 se encuentran en franco exceso respecto a los respectivos consumos celulares. La infección viral se asocia a una clara depresión de los requerimientos de glucosa y glutamina. El patrón de excreción de productos metabólicos, caracterizado por la falta de acumulación de lactato, la producción de amonio y la falta de producción de alanina, permiten inferir la existencia de un ordenamiento característico de las vías por las cuales se metabolizan las principales fuentes energéticas. Adicionalmente, los requerimientos de otros nutrientes, como lípidos y vitaminas, fueron analizados mediante experimentos de suplementación nutricional de diseño factorial parcial, que permitieron identificar compuestos limitantes de la proliferación celular y/o la producción de poliedros.

La caracterización nutricional y metabólica de los cultivos en suspensión permitió diseñar una serie de medios de cultivo básicos de composición más simple, a los cuales los cultivos de las células UFL-AG-286 se adaptaron rápidamente, con adecuados parámetros de crecimiento, y produciendo niveles de poliedros virales significativamente superiores a los alcanzados en el medio TC-100, en cultivos infectados con AgMNPV.

¹ Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. CC 242, (S3000ZAA) Santa Fe, República Argentina.

Una vez seleccionado el nuevo medio de cultivo básico UNL-5, con el objetivo de reemplazar el suero fetal bovino se realizaron experimentos factoriales de suplementación con hidrolizados proteicos de bajo costo y extractos, los cuales permitieron definir una mezcla de tres componentes con una significativa actividad estimulante de la proliferación celular y de la replicación viral. La combinación de esta mezcla con una fuente de lípidos y esteroides permitió diseñar un suplemento de composición no definida capaz de reemplazar el suero fetal bovino. El medio completo UNL-8, constituido por el medio básico UNL-5 y el suplemento no definido libre de suero fetal bovino, cuyo costo de formulación es inferior a U\$S 3 / litro, puede sostener el mantenimiento continuo de la línea celular UFL-AG-286 (en la actualidad más de 150 pasajes), con tiempos de duplicación inferiores a 28 horas en cultivos en suspensión agitada, y que, luego de optimizados los parámetros de infección, permite alcanzar rendimientos volumétricos superiores a 1×10^8 poliedros / ml en cultivos infectados con AgMNPV, en frascos agitados y en reactores de tipo tanque agitado y airlift. Los poliedros producidos en estas condiciones poseen una actividad biológica levemente inferior a los producidos en insectos infectados, a pesar de que ambos contienen similares cantidades de viriones, estimadas de acuerdo al contenido de DNA.

Los resultados de este trabajo pueden constituir la base para nuevos avances que hagan factible la producción de baculovirus bioinsecticidas en cultivos de células de insecto.

* Sieburth PJ, Maruniak JE. Growth characteristics of a continuous cell line from the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). In Vitro Cell. Dev. Biol. 1988; 24: 195-198.

Agradecimientos: este trabajo fue financiado por ANPCyT y UNL (República Argentina).

PROCESS OPTIMISATION FOR LARGE-SCALE PRODUCTION OF *Serratia entomophila*

Gabriel Visnovsky¹

The way of developing a micro-organism into a biological control agent (BCA) involves many steps, such as its discovery, selection and culture, efficacy against the pest to be controlled, production, formulation, application and evaluation of safety in the environment. Within these factors, its production in controlled conditions is a key-step for its economical large-scale manufacture.

Fermentation technologies can be used for profitable BCA mass production. A primary objective of fermentation in research and industry is the cost-effective production of the desired product. The aim is to maximise volumetric productivity to obtain the highest amount of product in a given volume in a certain time (i.e. $g\ l^{-1}h^{-1}$). High cell density cultures (HCDC) of micro-organisms are, in general, a prerequisite for high productivity. There is increasing industrial demand for robust fermentation process and control of HCDC. The following is a partial example about how process optimisation can influence on the yield of the product wanted which is, for our case, a microbe with bioinsecticides properties.

High density production of *Serratia entomophila*

Species of non-spore forming bacteria belonging to the Enterobacteriaceae have shown activity against a range of insect pests and plant diseases and have potential to be utilized as biological control agents. The bacterium *Serratia entomophila* has been developed as a biological control agent for grass grub, *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabaeidae) in New Zealand. (Jackson *et al.* 1992).

Serratia entomophila is usually produced in large-scale reactors at concentration of $4-6 \times 10^{10}$ cfu/ml. Although this concentration is commercially profitable, an increase in cell density is desirable to improve volumetric productivity. Therefore, the influence of different carbon sources and dissolved oxygen concentration on cell growth was investigated to optimise industrial production. A series of 500 ml shake-flasks containing 100 ml of culture medium were used to check the different carbon sources, while a 10 litre (working volume) Braun Biostat® E fermentor was used to conduct the studies on dissolved oxygen.

Molasses, fructose, glucose, and a combination of glucose and fructose were tested against raw sugar, the standard carbon source used in *S. entomophila* production. The cell density achieved with these different carbon sources did not improve that reached using raw sugar (Figure 1). Molasses gave similar production to raw sugar and could be used as an alternative if necessary. In contrast, the level of dissolved oxygen concentration (DOc) in the culture medium had an important influence on cell density (Figure 2). DOc levels were allowed to drop from ~ 90% at the beginning of the fermentation to 5% (Standard), 20% or 50% DOc, and maintained at these set-points until the end of fermentation. Clear differences in cell number as well as cell growth kinetics can be seen between Standard ($2-3 \times 10^{10}$ cfu/ml) and 20 and 50% DOc ($6-8 \times 10^{10}$ cfu/ml), revealing the important role that dissolved oxygen level plays in this fermentation system after 12 fermentation hours. The cell density level reached with *S. entomophila* at present ($\sim 8 \times 10^{10}$ cfu/ml) using a batch fermentation strategy ranks it as an HCDC. Therefore, the challenge to further improve *S. entomophila* cell density will need to take into account the selection of an appropriate reactor design and configuration (with the possibility of external or internal cell retention systems such as dialysis-membrane, ceramic or spin filters or other filtration or perfusion systems) and the use of advanced, robust, reliable and fast methods and systems of fermentation control and/or the use of a fed-batch fermentation strategy.

¹ AgResearch, PO Box 60, Lincoln, New Zealand

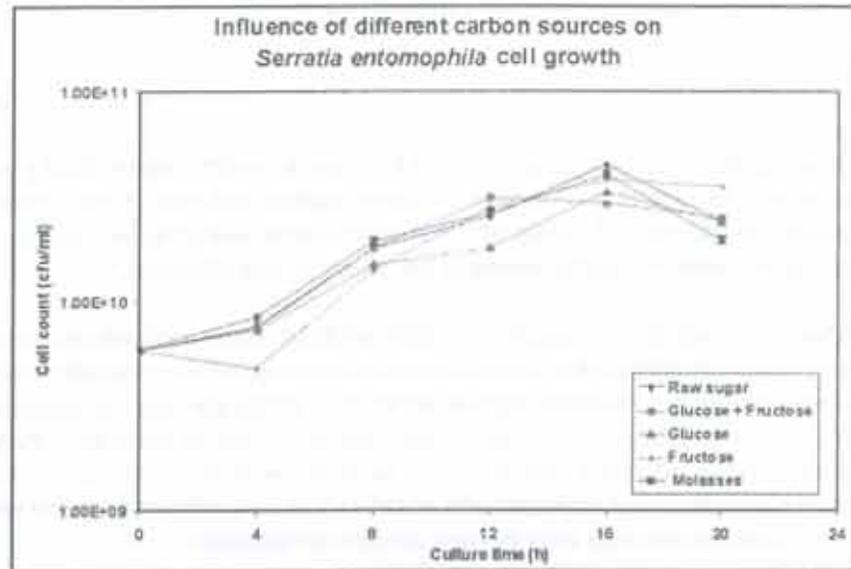


Figure 1. *S. entomophila* viable cells count as function of fermentation time for different carbon sources.

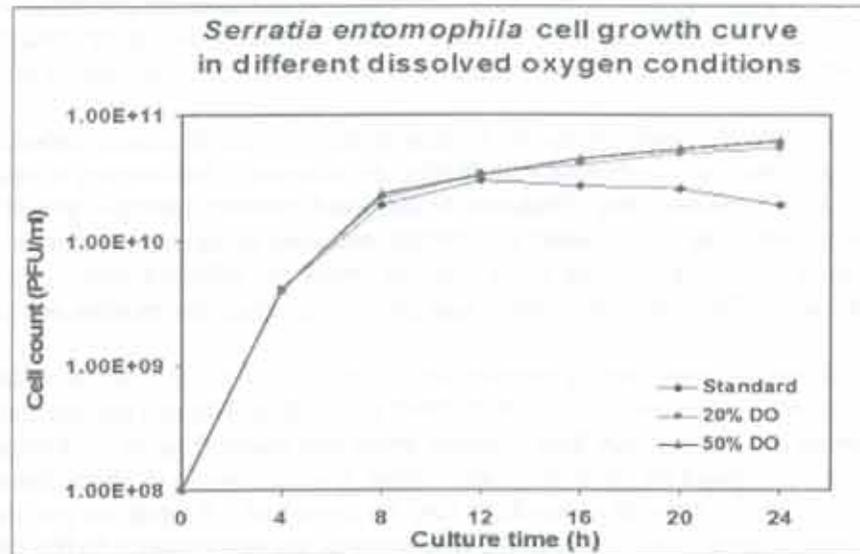


Figure 2. *S. entomophila* viable cells count for different conc. of dissolved oxygen as function of fermentation time

Acknowledges: I would like to thank Charlie Dillimore, Matt Hamblett, and Darren Smalley for their help in cell counting and cell viability determination.

Reference

Jackson T.A.; Pearson J.F.; O'Callaghan M; Mahanty H.K.; Willcocks M (1992). Pathogen to Product – Development of *Serratia entomophila* (Enterobacteriaceae) as a Commercial Biological Control Agent for the New Zealand Grass Grub (*Costelytra zealandica*). In: Glare TR; Jackson TA ed. Use of Pathogens in Scarab Pest Management. Athenaeum Press, Newcastle, Great Britain. Pp. 191-198.

Formulation is a term used to cover activities that are aimed at cell preservation, method of delivery and enhancing efficacy of microbes for use in biocontrol. In any formulation process it is important that live, robust cells are used. These characteristics will be defined by the cell production process. Once harvested the cells must be stabilised and incorporated into materials that will define their preservation and use. These materials can include stabilizers, preservatives, fillers, binders and desiccants (For details see H.D. Burges (1998) Formulation of microbial pesticides. Kluwer Publishers).

Formulation can greatly enhance the stability and opportunities for use of a microbial control agent. For example, Bioshield™ is a biocontrol for the New Zealand grass grub based on the non-sporeforming bacterium *Serratia entomophila*. Fermenter broth cultures of the bacteria will lose viability within a few days if held at ambient temperatures. Through formulation into a granule the bacteria can be maintained at ambient storage conditions for six months with little loss in viability. In addition the granule can be applied through a standard seed drill to ensure successful establishment of the bacteria in the soil.

Once cells are stabilised they can be further formulated for a variety of final applications. These can include seed coatings, modification for fast and slow release and mixing with protectants for aerial applications. Thus formulation is an important process for reducing cell wastage from production to application and enhancing final efficacy of the biocontrol product.

[†] Biocontrol Technologies, AgResearch, PO Box 60, Lincoln, New Zealand.

NORMA INTERNACIONAL SOBRE IMPORTACIÓN, EXPORTACIÓN Y LIBERACIÓN DE ACB

EL SIGUIENTE TRABAJO CORRESPONDE A LA PRESENTACIÓN EN POWER POINT DE LA AUTORA:

María Inés Ares¹

DIRECTRICES PARA LA EXPORTACIÓN, EL ENVÍO, LA IMPORTACIÓN Y LIBERACIÓN DE AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO Y ORGANISMOS BENÉFICOS
CIPF/FAO, PUBLICACIÓN N° 3, ABRIL 2005
<http://www.ippc.int>

AMBITO

Directrices para el manejo del riesgo vinculado con la exportación, el envío, la importación y liberación de agentes de control biológico (ACB) y otros organismos benéficos. Se enumeran las responsabilidades pertinentes de las partes contratantes de la CIPF, las Organizaciones Nacionales de Protección Fitosanitaria (ONPF), los importadores y exportadores.

La norma refiere los ACB capaces de reproducirse, así como los insectos estériles y organismos benéficos, e incluye aquellos embalados o formulados como productos comerciales. También incluye disposiciones para la importación de ACB no nativos y otros organismos benéficos, con fines de investigación en instalaciones de cuarentena.

OBJETIVOS

Facilitar la exportación, el envío, la importación y liberación segura de ACB y otros organismos benéficos, ofreciendo las directrices a todos los organismos públicos y privados participantes, principalmente mediante la elaboración de la legislación nacional, cuando ésta no exista.

- Establecer la cooperación entre los países importadores y Exportadores, de manera que:
 - los beneficios que hayan de derivarse del uso de ACB o de otros organismos benéficos se consigan con efectos adversos mínimos.
 - Se promuevan prácticas que garanticen una utilización eficaz y segura, disminuyendo al mínimo los riesgos al ambiente debido a la manipulación o utilización inapropiadas.
- Lograr que:
 - Se fomenten prácticas comerciales responsables
 - Se ayuden a los países a formular reglamentos que aborden la manipulación, evaluación y utilización segura de ACB y otros organismos benéficos
 - Se brinden recomendaciones sobre el manejo del riesgo para la exportación, el envío, la importación y liberación segura de ACB y otros organismos benéficos
 - Se promuevan la utilización segura de ACB y otros organismos benéficos

Autoridad responsable y Responsabilidades generales.

• **Autoridad responsable:** La ONPF de Uruguay es la DGSA/MGAP.

• **Responsabilidades generales :**

La ONPF deberá establecer los procedimientos para la implementación de esta norma, incluyendo la evaluación de la documentación pertinente.

¹ MGAP Dirección General de Servicios Agrícolas

• La ONPF deberá:

- Realizar análisis de riesgo de plagas antes de importar o liberar los ACB y otros organismos benéficos.
- Asegurar, que cuando se certifiquen las exportaciones, se cumplan los reglamentos de los países importadores.
- Brindar y evaluar la documentación, según corresponda, que sea pertinente a la exportación, el envío, la importación o la liberación de ACB y otros organismos benéficos.
- Asegurar que los ACB y otros organismos benéficos se lleven ya sea directamente a las instalaciones cuarentenarias designadas o, si resulta apropiado, pasen a las instalaciones de producción masiva o directamente a liberarse en el medio ambiente.
- Asegurar que los importadores y, cuando corresponda, los exportadores cumplan sus responsabilidades
- Considerar los posibles impactos en el ambiente, tal como en los invertebrados no objetivo.

Análisis de riesgo de plagas.

- Esta norma recomienda utilizar las normas vigentes de Análisis de riesgo de plagas **para plagas cuarentenarias** incluido el análisis de riesgos ambientales y organismo vivos modificados, según corresponda, tomando en cuenta las incertidumbres y posibles consecuencias ambientales. Además de realizar la evaluación del riesgo de plagas, las partes contratantes también deberán considerar los posibles impactos en el ambiente, tales como **impactos en invertebrados no objetivo**.

DEFINE RESPONSABILIDADES PARA:

- La ONPF del país importador en todas las etapas.
- La ONPF del país exportador
- El importador y El exportador

LISTA DE PARTICIPANTES

DISERTANTES:

Ing. Agr. M. Sc. Willy Chiaravalle
AgroInternacional SPL - ENTOAGRO
Ejido 1415/902
CP. 11100, Montevideo, Uruguay
Tel.: 099138522
E-mail: willych@adinet.com.uy

Dr. Trevor Jackson
AgResearch, Lincoln
Dir.: PO Box 60, Lincoln
Nueva Zelandia
Tel.: 0064 3 325 9984
Fax: 0064 3 325 9946
E-mail: trevor.jackson@agresearch.co.nz

Dr. Gabriel Visnovsky
AgResearch
Dir.: PO Box 60, Lincoln
Nueva Zelandia
Tel.: 0064 3 325 9980
Fax: 0064 3 325 9946
E-mail: gabriel.visnovsky@agresearch.co.nz

Ing. Agr. Alda Rodríguez
BIO Uruguay
Dir.: Herrera 240, Tacuarembó, Uruguay
Tel.: 099 833174/06302314/06329946
E-mail: arodriguez@biouruguay.org,
aldardos@yahoo.com

Dr. Colin Berry
Cardiff University
Cardiff School of Biosciences
Cardiff, UK
CF15 8FA
Tel.: 0044 29 20874508
Fax: 0044 29 20874116
E-mail: berry@cf.ac.uk

Dr. Rose Monnerat
EMBRAPA Recursos Genéticos e
Biotecnologia
Brasilia/DF
Brazil
CP. 70 990 900
CC. 10.2372
Tel.: 0055 61 3448 4677
Fax: 0055 61 3448 4673
E-mail: rose@cenargen.embrapa.br

Dr. Flavio Moscardi
EMBRAPA CNPSo
Dir.: C. P. 231, Londrina, PR
CEP. 86001-970, Brasil
Tel.: 0055 43 33716209
Fax: 0055 43 33716100
E-mail: moscardi@cnpso.embrapa.br

Dr. Daniel Ricardo Sosa Gómez
EMBRAPA Soja
Londrina, Paraná
CP. 86001-970
CC. 231, Brasil
Tel.: 0055 43 33716210
Fax: 0055 43 33716100
E-mail: drsg@cnpso.embrapa.br

Ing. Agr. Graciela Romero
Dpto. Forestal, Facultad de Agronomía
Montevideo, Uruguay
Tel.: 099 626845/6229771/3549563
Fax: 02 6229771
E-mail: labgrom@adinet.com.uy

Dra. Lina Bettucci
Fac. Ciencias / Fac. Ingeniería
Dir.: Julio Herrera y Reissig 565, Montevideo,
Uruguay
Tel.: 02 7120626/094951904
E-mail: bettucci@fing.edu.uy

Dra. Sandra Lupo
Fac. Ciencias / Fac. Ingeniería
Dir.: Julio Herrera y Reissig 565, Montevideo,
Uruguay
Tel.: 02 7120626
E-mail: slupo@fing.edu.uy

Ing. Mónica Cabrera
Microbiología, Fac. Química
Dir.: Gral. Flores 2124, Montevideo, Uruguay
Tel.: 02 9244209
E-mail: monibote@hotmail.com

Ing. Gabriela Garmendia
Microbiología, Fac. Química
Dir.: Gral. Flores 2124, Montevideo, Uruguay
Tel.: 02 9244209
E-mail: garmendia@fq.edu.uy

Quím. Alicia Arias
IIBCE
Av. Italia 3318
CP. 11600, Montevideo, Uruguay
Tel.: 02 4871616
Fax: 02 4875548
E-mail: aarias@iibce.edu.uy

Dra. Silvia Pereyra
INIA La Estanzuela
Ruta 50, Km. 11
Colonia, Uruguay
CP: 39173
CP: 70006
Tel.: 0574 8000
Fax: 0574 8012
E-mail: spereyra@le.inia.org.uy

Ing. Agr. Roberto Bernal
INIA Salto Grande
Dir.: CC. 68033
CP. 50000, Salto, Uruguay
Tel.: 073 28064/32300
Fax: 073 29624
E-mail: rbp@inia.org.uy

Dr. Roberto Lecuona
IMYZA - INTA Castelar
Dir.: CC. 25 (1712) Castelar
Buenos Aires, Argentina
Tel.: 0054 11 4621 1701
E-mail: imyza@cni.inta.gov.ar

Dr. Joop van Lenteren
Presidente
IOBC
Prof. Dr.
Laboratory of Entomology
PO Box 8031
Wageningen, The Netherlands
6700 EH
Tel.: 0031 317 482327
Fax: 0031 317 484821
E-mail: Joop_vanLenteren@wur.nl

Ing. Agr. M. Sc. Amalia Baraibar Lucas
Lage y Cia. S.A.
Camino Carrasco 6948
CP. 11500, Montevideo, Uruguay
Tel.: 02 6002714
Fax: 02 6013654
E-mail: abaraibar@lageycia.com

Dr. Juan Claus
Universidad Nacional del Litoral,
Santa Fé
Dir.: CC. 242 (53000ZAA) Santa Fé
Argentina
Tel./Fax: 0054 342 4575216, Int. 118
E-mail: jclaus@fcb.unl.edu.ar

URUGUAY - Participantes

Claudio Recabal
Dir.: Herrera 240, Tacuarembó
Tel.: 0630 2314
E-mail: recabal@gmail.com

Ing. Agr. Alicia Ferreiro
AgroInternacional SPL
Ejido 1415/902
CP. 11100, Montevideo
Tel.: 02 9007188
Fax: 02 9013574
E-mail: aferreiro@st.com.uy

Lic. María Victoria Calvo
Licenciada en Ciencias Biológicas
BILSA
Colón 1498 of. 403
CP. 11000, Montevideo
Tel.: 02 9160540/9160527
Fax: 02 9161008
E-mail: mariavictoriacalvo@adinet.com.uy

Ing. Agr. Fany da Rosa
Dir. Gral. Servicios Agrícolas - MGAP
Av. Millán 4703
CP. 12900, Montevideo
Tel./Fax: 02 3092219/3092074
E-mail: fdarosa@mgap.gub.uy,
ataidgsa@mgap.gub.uy

Q. F. María Elena Masoller
Dir. Gral. Servicios Agrícolas - MGAP
Av. Millán 4703
CP. 12900, Montevideo
Tel.: 02 3098720, Int. 223
Fax: 02 3093181
E-mail: emasoller@mgap.gub.uy

Ing. Agr. Laura Rossi
Estancia Presidencial Anchorena
Barra de San Juan
CP. 70000, Colonia
Tel.: 099 521893
E-mail: lrossi@adinet.com.uy

Ing. Agr. César Basso
Facultad de Agronomía
Dir.: Garzón 780
CP. 12900, Montevideo
Tel.: 02 3561215
E-mail: cbasso@adinet.com.uy

Ing. Agr. Adela Ribeiro
Facultad de Agronomía – EEMAC
Dir.: Ruta 3, Km. 363, Paysandú
Tel./Fax: 072 27950
E-mail: adelar@fagro.edu.uy

Dr. Enrique Castiglioni
Facultad de Agronomía
Ruta 3, Km. 363
CP. 60000, Paysandú
Tel./Fax: 072 27950
E-mail: bbcast@fagro.edu.uy

Alicia Sánchez
Facultad de Ingeniería
Dir.: Julio Herrera y Reissig 565, Montevideo
Tel.: 02 7120626/094193418
E-mail: alisanchez33@yahoo.com

Lic. Biología Leticia Quagliotto
IIBCE
Av. Italia 3318
CP. 11600, Montevideo
Tel.: 02 4871616
Fax: 02 4875548
E-mail: letty@iibce.edu.uy

Lic. Bioquímica María Lis Yanes
IIBCE
Av. Italia 3318
CP. 11600, Montevideo
Tel.: 02 4871616
Fax: 02 4875548
E-mail: marialis@iibce.edu.uy

Ing. Agr. Patricia Duarte
Instituto Nacional de Colonización
Regional Tarariras
Dir.: Lavalleja 2101, Tarariras, Colonia
Tel./Fax: 0574 2187
E-mail: pdg.tbo@adinet.com.uy

Dr. Pablo Chilibroste
Presidente
INIA
Andes 1365, P. 12
Montevideo
Tel.: 02 9020550
Fax: 02 9023633
E-mail: pchilibroste@inia.org.uy

Ing. Agr. John Grierson
INIA
Andes 1365, P. 12
Montevideo
Tel.: 02 9020550
Fax: 02 9023633
E-mail: jgrierson@dn.inia.org.uy

Dra. Nora Altier
INIA Las Brujas
Dir.: Ruta 48, Km. 10, Rincón del Colorado
CP. 90200, Canelones
Tel.: 02 3677641
Fax: 02 3677609
E-mail: naltier@inia.org.uy

Ing. Agr. Rosario Alzugaray
INIA La Estanzuela
Ruta 50, Km. 11
Colonia, Uruguay
CP: 39173
CP: 70006
Tel.: 0574 8000
Fax: 0574 8012
E-mail: ralzugaray@le.inia.org.uy

Ing. Agr. Marina Castro
INIA La Estanzuela
Ruta 50, Km. 11
Colonia, Uruguay
CP: 39173
CP: 70006
Tel.: 0574 8000
Fax: 0574 8012
E-mail: mcastro@le.inia.org.uy

Ing. Agr. Martha Díaz
INIA La Estanzuela
Ruta 50, Km. 11
Colonia, Uruguay
CP: 39173
CP: 70006
Tel.: 0574 8000
Fax: 0574 8012
E-mail: mdiaz@le.inia.org.uy

Ing. Agr. Enrique Fernández
INIA La Estanzuela
Ruta 50, Km. 11
Colonia, Uruguay
CP: 39173
CP: 70006
Tel.: 0574 8000
Fax: 0574 8012
E-mail: efernandez@inia.org.uy

Ing. Agr. Alejandro García
INIA La Estanzuela
Ruta 50, Km. 11
Colonia, Uruguay
CP: 39173
CP: 70006
Tel.: 0574 8000
Fax: 0574 8012
E-mail: magarcia@le.inia.org.uy

Ing. Agr. Ernesto Restaino
INIA La Estanzuela
Ruta 50, Km. 11
Colonia, Uruguay
CP: 39173
CP: 70006
Tel.: 0574 8000
Fax: 0574 8012
E-mail: erestaino@le.inia.org.uy

Lic. Silvina Stewart
INIA La Estanzuela
Ruta 50, Km. 11
Colonia, Uruguay
CP: 39173
CP: 70006
Tel.: 0574 8000
Fax: 0574 8012
E-mail: sstewart@le.inia.org.uy

Ing. Agr. M. Sc. Stella Zerbino
Protección Vegetal
INIA La Estanzuela
Ruta 50, Km. 11
Colonia
Tel.: 0574 8000, Int. 1465
Fax: 0574 8012
E-mail: szerbino@le.inia.org.uy

Quím. Agr. Facundo Ibañez
INIA Las Brujas
Martín C. Martínez 1902
CP. 11800, Montevideo
Tel.: 02 4095813
E-mail: fibanez@lb.inia.org.uy

Ing. Agr. Carolina Leoni
INIA Las Brujas
Dir.: Ruta 48, Km. 10, Rincón del Colorado
CP. 90200, Canelones
Tel.: 02 3677641
Fax: 02 3677609
E-mail: cleoni@lb.inia.org.uy

Ing. Agr. Silvia Tomassoni
INIA Las Brujas
Dir.: Manuel Fortet 2650
Tel.: 02 3200272/3207051
E-mail: marves@montevideo.com.uy

Ing. Agr. José Buenahora
INIA Salto Grande
Dir.: Rodó 699, Salto
Tel.: 073 35156/28064
E-mail: jbuenahora@sg.inia.org.uy

Ing. Agr. Leticia Rubio
INIA Salto Grande
Dir.: Arregui 1757
Tel.: 073 31149
E-mail: letirubio@adinet.com.uy

Ing. Agr. María Bemhaja
INIA Tacuarembó
R. 5, Km. 386
CP. 45000, Tacuarembó
Tel.: 063 24560
Fax: 063 23969
E-mail: mbemhaja@tb.inia.org.uy

Ing. Agr. Diego Risso
INIA Tacuarembó
R. 5, Km. 386
CP. 45000, Tacuarembó
Tel.: 063 24560
Fax: 063 23969
E-mail: drisso@tb.inia.org.uy

Ing. Agr. Stella Avila
INIA Treinta y Tres
Dir.: Ruta 8, Km. 281, Treinta y Tres
Tel.: 045 22023
Fax: 045 25701
E-mail: savila@tyt.inia.org.uy

Ing. Agr. Gustavo Plaván
Intendencia Municipal de Colonia
Dir.: José Pedro Varela 331, Ap. 1, Colonia
Tel.: 052 31170
E-mail: desarrollo@colonia.gub.uy

Ing. Agr. Pablo Nuñez
Lage y Cia. S.A.
Dir.: Néilson 3430/3, Montevideo
Tel.: 099 553122/2080146
E-mail: yulele77@hotmail.com

Ing. Agr. María Inés Ares
DGSA/MGAP
Millán 4703
CP. 12900, Montevideo
Tel./Fax: 02 3083094
E-mail: mares@mgap.gub.uy

Ing. Agr. Madelaine Chifflet
DGSA/MGAP
Millán 4703
CP. 12900, Montevideo
Tel.: 02 3078262
Fax: 02 3090771
E-mail: ingchifflet@yahoo.es

Ing. Agr. Fernando De Torres
DGSA/MGAP
Millán 4703
CP. 12900, Montevideo
Tel./Fax: 02 3092219/3092074
E-mail: fdetorres@mgap.gub.uy

Ing. Agr. Sandra Almirón
Departamento de Salud Ambiental y
Ocupacional
MSP
Dir.: 18 de julio 1892, Oficina 418,
Montevideo
Tel.: 02 4088272/4088297
Fax: 02 4085580
E-mail: salmiron@misp.gub.uy

Mabel Pessio
Entomología
INIA La Estanzuela
Ruta 50, Km. 11
CP: 39173, Colonia
CP: 70006
Tel.: 0574 8000
Fax: 0574 8012

Karina Cabrera
Secretaría Dirección Regional
INIA La Estanzuela
Ruta 50, Km. 11
CP: 39173, Colonia
CP: 70006
Tel.: 0574 8000, Int. 1417
Fax: 0574 8012
E-mail: kcabrera@le.inia.org.uy

Stella Benedetto
Secretaría
INIA La Estanzuela
Ruta 50, Km. 11
CP: 39173, Colonia
CP: 70006
Tel.: 0574 8000
Fax: 0574 8012
E-mail: sbenedetto@le.inia.org.uy

Romina Rivoir
INIA La Estanzuela
Ruta 50, Km. 11
CP: 39173, Colonia
CP: 70006
Tel.: 0574 8000
Fax: 0574 8012

Amado Vergara
Difusión
INIA La Estanzuela
Ruta 50, Km. 11
CP: 39173, Colonia
CP: 70006
Tel.: 0574 8000
Fax: 0574 8012
E-mail: avergara@le.inia.org.uy

Pablo Calistro
Entomología
INIA La Estanzuela
Ruta 50, Km. 11
CP: 39173, Colonia
CP: 70006
Tel.: 0574 8000
Fax: 0574 8012

GRUPOS DE DISCUSION Y APUNTES

GRUPO 1 - Anfiteatro

José Buenahora
Stella Avila
Alicia Arias
Gabriela Garmendia
Willy Chiaravalle
Alda Rodriguez
Elena Masoller
Laura Rossi
Diego Risso
Roberto Lecuona
Trevor Jackson

GRUPO 2 – Sala del Reloj

Silvia Pereyra
María Bemhaja
Roberto Bernal
Facundo Ibáñez
Sandra Lupo
Amalia Baraibar
Inés Ares
Adela Ribeiro
Leticia Quagliotto
Flavio Moscardi
Juan Claus

GRUPO 3 – Sala chica de Dirección

Nora Altier
Leticia Rubio
Monica Cabrera
Alicia Ferreiro
Claudio Recabal
Madelaine Chifflet
Fany da Rosa
Lina Bettucci
Carolina Leoni
Rosario Alzugaray
Daniel Sosa-Gomez

GRUPO 4 - Reloj

Enrique Castiglioni
Alicia Sánchez
Pablo Núñez
Victoria Calvo
Fernando de Torres
Lis Yanes
Silvia Tomassoni
Stella Zerbino
Silvina Stewart
Julio Méndez
Rose Monnerat
Colin Berry
Gabriel Visnovsky

TEMARIO - GRUPOS DE DISCUSIÓN

- 1) ¿Cuál es el nicho para el uso de los agentes microbianos de control biológico?
¿Cómo vemos al Control biológico en el marco de los sistemas de producción sustentables?
Analizar sistemas de producción intensivos y extensivos, horti-fruticultura, agricultura extensiva, cultivos a cubierto, producción orgánica
- 2) ¿en qué etapa está Uruguay en la adopción y utilización de esta herramienta de CB?
¿cuáles son los problemas que existen para su utilización?
¿qué puntos débiles o limitantes deberían ser priorizados?
¿tiene Uruguay la tecnología y los RRHH para desarrollar estos productos a escala comercial?
- 3) ¿cuales son los desafíos a resolver a corto, mediano y largo plazo para avanzar en el uso de estos productos?
- 4) ¿cual debería ser el rol de las distintas Instituciones?
especificar para
MGAP
UDELAR, diferentes Facultades
Centros de Investigación INIA, IIBCE
LATU
Empresas privadas
Otros

- 5) ¿Cómo debería manejarse el tema en la opinión pública?
¿Cual es la forma de involucrar/incentivar a los productores?
pensar en productores de diferentes regiones del país y distinto sistema de producción
- 6) ¿Existe una necesidad de coordinación regional para avanzar en este tema?

PRIMER TALLER URUGUAYO SOBRE PRODUCCIÓN DE AGENTES MICROBIANOS DE CONTROL BIOLÓGICO

21 y 22 de marzo de 2006

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Los días 21 y 22 de marzo se llevó a cabo en INIA La Estanzuela, Colonia, el Primer Taller Uruguayo sobre Producción de Agentes Microbianos de Control Biológico. La actividad reunió a más de 60 participantes de diferentes organismos e instituciones públicas y privadas nacionales interesadas en el control biológico de plagas y enfermedades de las plantas, representando a diversos sectores (investigación, educación, empresarial y productivo), así como también invitados internacionales referentes en el tema.

En el control biológico de plagas y enfermedades de plantas se combinan diversas prácticas que tienden a favorecer la expresión de los mecanismos naturales de control. Además, el control biológico es usado en muchos países para el manejo de malezas, plagas de la producción animal como garrapatas, y vectores de enfermedades del hombre como mosquitos y vinchucas. En el Taller se profundizó en el uso de agentes microbianos de control biológico (AMCB), sin desconocer las otras herramientas existentes.

La producción de AMCB es la etapa final de un proceso que comienza con la identificación de microorganismos (como bacterias, hongos, virus) que existen en la naturaleza controlando insectos plaga y enfermedades de las plantas. Luego de su identificación, se los caracteriza y se evalúa su eficiencia de control. Finalmente, se estudia la forma de multiplicarlos y emplearlos en los sistemas productivos, ya sea en sistemas de producción orgánica u otros.

En el Taller se expusieron las experiencias de distintos grupos, tanto nacionales como extranjeros, que se encuentran trabajando en el tema y se discutieron los avances, las limitantes y las posibilidades de desarrollo de esta herramienta de control de plagas y enfermedades en el país.

Como marco y orientación en la discusión se contó con la participación de reconocidos técnicos de la región y de países más distantes con antecedentes muy ricos en la aplicación de esta tecnología. Los Dres. Flavio Moscardi, Daniel Sosa Gomez y Rose Monnerat de la Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria (EMBRAPA), los Dres. Roberto Lecuona del Instituto de Micología y Zoología Agrícola (IMYZA - INTA) y Juan Claus de la Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe), en Argentina, los Dres. Trevor Jackson y Gabriel Visnovsky de AgResearch, Nueva Zelandia y el Dr. Colin Berry de la Universidad de Cardiff en el Reino Unido presentaron las experiencias de muchos años de trabajo en las diferentes especialidades en el tema, respondieron preguntas y ofrecieron colaboración en etapas futuras.

En el análisis y discusión final del taller se arribó a las siguientes conclusiones:

Se destaca la existencia de grupos nacionales de investigación interinstitucional y de una base de conocimiento científico importante como punto de partida fundamental para la implementación de esta herramienta de control biológico de plagas y enfermedades.

Se remarca la falta de un marco normativo que permita la utilización en el país de estos agentes de control biológico y el desarrollo de productos basados en microorganismos nativos. La elaboración de este marco normativo debería colocarse como una prioridad estratégica ya que sería un punto de apoyo trascendente para lograr un país productivo, sustentable y natural, y debería ser consensuado por todas las instituciones involucradas en el tema, incluyendo a la industria y a los productores agropecuarios.

La estrategia nacional en materia de control biológico también debería priorizar la educación a todos los actores de la sociedad (comunidad científica, productores y técnicos, industria, consumidores). La enseñanza y capacitación en control biológico de plagas y enfermedades, sus ventajas y beneficios y las diferentes formas de utilización debería ser de amplio alcance, desde la enseñanza preescolar hasta

la formación de recursos humanos en los cargos de jerarquía de la administración pública en todos los aspectos, agropecuaria, ambiental y salud.

Se reafirmó la necesidad de invertir en investigación y desarrollo en esta área y en estímulos a la innovación.

En función de las conclusiones anteriores, se realizan las siguientes recomendaciones:

1) Se recomienda que el Poder Ejecutivo constituya un comité nacional interinstitucional que integre organismos estatales relacionados (MGAP, MVOTMA, MSP), LATU, centros de investigación (UdelaR, INIA, IIBCE), institutos de educación de diferentes niveles, la industria y los usuarios de herramientas de control biológico de plagas y enfermedades y que esa comisión tenga como cometidos:

a. diseñar una estrategia nacional para coordinar y consensuar acciones en materia de control biológico de plagas, enfermedades y malezas

b. asesorar al PE en la elaboración de un marco normativo para el uso de productos biológicos

c. asesorar en la definición de una política de estado para el uso de herramientas de control biológico en el correcto manejo de problemas causados por organismos nocivos (insectos, enfermedades y malezas) que afectan a plantas y animales así como de vectores de enfermedades que afectan a la población humana.

d. diseñar una estrategia para sensibilizar a la opinión pública y capacitar a todos los niveles educativos, desde la Enseñanza Primaria y Secundaria a través de los programas de las distintas asignaturas relacionadas y los Clubes de Ciencias hasta el nivel terciario con especializaciones en Control Biológico en el grado y postgrado. Se recomienda también el diseño de programas de investigación participativa donde se involucren agentes de extensión, productores, consumidores, médicos, etc.

e. estudiar y proponer mecanismos que incentiven a productores y empresas a incorporar tecnología en base a control biológico.

Estimados colegas y amigos,

Cuando hace mas de seis meses empezamos a diseñar este Primer Taller Uruguayo sobre Producción de Agentes Microbianos de Control Biológico, sabíamos del interés y sobre todo la necesidad que existía en la gente trabajando en este tema en el Uruguay, por reunirse y discutir acerca de muchos de los aspectos claves relacionados a éste. Hoy, con los más de 60 participantes que hubo en el mismo (algunos de ellos no incluidos en esta lista electrónica) sabemos que no nos equivocamos al convocarlo.

Queremos agradecerles profundamente a todos aquellos que desde la Universidad, Institutos de Investigación, Institutos y Ministerios, y Empresas Privadas, se hicieron presentes en el mismo para aportar con sus trabajos y puntos de vista a un debate de muy alto nivel científico, político y social acerca de este tema, resultado del cual salieron líneas de acción concretas para trabajar de aquí en mas.

Queremos agradecerles también a los invitados extranjeros que respondieron afirmativamente a nuestro llamado, científicos de renombre internacional, maestros en esta área que no hicieron mas que jerarquizar este Taller no solo con sus presentaciones sino también participando activamente durante todas las actividades que desarrollamos durante estos dos últimos días.

Queremos agradecer muy especialmente al Ing. Carlos Negro e Ing. John Grierson por el apoyo recibido desde el primer momento para concretar este Taller, y que resultó fundamental para que éste se llevara a cabo.

Valoramos muchísimo que INIA como Institución organizadora y La Estanzuela como sede física y logística brindaran todo su apoyo a la actividad y a la temática del control biológico con microorganismos, así como esperamos que lo continúen haciendo en el futuro.

Como organizadores, no podemos más que expresarles nuestra satisfacción por el nivel de respuesta obtenido. Estamos totalmente convencidos que esta es una área estratégica en la cual Uruguay puede y debe desarrollarse: el establecimiento de las bases científicas y tecnológicas que permitan su desarrollo dentro del marco del proyecto de agricultura sustentable serán coherentes en la practica con la definición –no siempre cumplida- de país Natural que el Uruguay posee.

Un abrazo para todos.

Ing. Agr. Rosario Alzugaray

Dr. Gabriel Visnovsky

Responsables por el Comité Organizador



**Primer Taller Uruguayo sobre
Producción de Agentes Microbianos de Control Biológico**

**INIA La Estanzuela
21 y 22 de marzo de 2006**

RUSCONI

OLEGARIO ANDRADE 4710/12
TEL/FAX: 359 0706 - 357 5550
MONTEVIDEO - URUGUAY
EDICIÓN AMPARADA EN EL DECRETO 218/96
DEPOSITO LEGAL No. 339852/2006