



Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria  
URUGUAY

# Jornada Técnica

## X Jornada de Agrobiotecnología.

### "II Encuentro Nacional REDBIO"



Unidad de Biotecnología  
Serie Actividades de Difusión N° 780  
31 de octubre de 2017

LAS BRUJAS 

# **X JORNADA DE AGROBIOTECNOLOGÍA**

## **31 de octubre de 2017**



## TABLA DE CONTENIDOS

P. 3 – Monitoreo de terneros holando portadores de blad mediante curvas de disociación de alta resolución y secuenciación.

Branda Sica, Andrea; Federici, María Teresa; Giannitti, Federico; Caffarena, Darío; Schild, Carlos; Casaux, Laura; Briano, Carolina; Dalla Rizza Marco; Llambí, Silvia; Fraga Martín; Riet, Franklin; Dutra, Fernando.

P. 6 – Aproximaciones genómicas, fisiológicas y de mejoramiento para incrementar la tolerancia a sequía en soja.

Berger, A., Bonnacarrere, V., Borsani, O., Casaretto, E., Castillo, A., Castro, A., Ceretta, S., Fleitas, L., Gallino, J.P., Garaycochea, S., Iriarte, W., Kavanová, M., Quero, G., Rey, E., Ruibal, C., Simondi, S., Vidal, S.

P. 9 – Herramientas bioestadísticas para mejoramiento de la resistencia genética a enfermedades del tallo en arroz.

J. E. Rosas, S. Martínez, V. Bonnacarrère, P. Blanco, F. Pérez de Vida, S. Germán, J.-L. Jannink, L. Gutiérrez.

P. 13 – Identificación y dinámica de péptidos antimicrobianos en alcachofa (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*) mediante transcriptómica

Maidana Matías; Feijoo Matías; Garaycochea Silvia; Dalla Rizza Marco

P. 15 – Resistencia a marchitez bacteriana en papa mediada por expresión de EFR e introgression de genes de resistencia a *Solanum Commersonii*

Boschi F., Schwartzman C., Murchio S., Ferreira V., Siri M.I., Galván G.A., Smoker M., Stransfeld L., Zipfel C., Vilaró F., and Dalla-Rizza M.

P. 19 – Identificación molecular de un clon de frutilla mediante marcadores microsatélites.

Giambiasi Mario, Vicente Esteban, Arruabarrena Ana.

P. 22 – Prospección y caracterización de *Bacillus. Spp* movilizadores de fósforo del suelo para el desarrollo de inoculantes microbianos.

Martin N., Beyhaut E., Altier N., Abreo E.

P. 23 – Composición y abundancia de las comunidades microbianas de campo natural asociadas al contenido y mecanismo de retención del fósforo.

Silvia Garaycochea, Elena Beyhaut, Nora Altier.



## MONITOREO DE TERNEROS HOLANDO PORTADORES DE BLAD MEDIANTE CURVAS DE DISOCIACIÓN DE ALTA RESOLUCIÓN Y SECUENCIACIÓN

Branda Sica, Andrea<sup>1</sup>; Federici, María Teresa<sup>1</sup>; Giannitti, Federico<sup>2</sup>; Caffarena, Darío<sup>2</sup>; Schild, Carlos<sup>2</sup>; Casaux, Laura<sup>2</sup>; Briano, Carolina<sup>3</sup>; Dalla Rizza Marco<sup>1</sup>; Llambí, Silvia<sup>4</sup>; Fraga Martín<sup>2</sup>; Riet, Franklin<sup>2</sup>; Dutra, Fernando<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas, Canelones, Uruguay.

\*E-mail: [abranda@inia.org.uy](mailto:abranda@inia.org.uy)

<sup>2</sup>Plataforma Salud Animal, INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay.

<sup>3</sup>DILAVE "Miguel C. Rubino", Laboratorio Regional Este, Treinta y Tres, Uruguay.

<sup>4</sup>Cátedra de Genética, Facultad de Veterinaria, UdelaR, Uruguay.

Palabras clave: *Deficiencia en la adhesión leucocitaria bovina, diagnóstico molecular, bovinos de leche, Holando.*

La deficiencia en la adhesión leucocitaria bovina (BLAD, OMIA 000595-9913) es una enfermedad de herencia autosómica recesiva que ha sido descrita a nivel mundial en la raza Holando. Esta enfermedad es causada por una mutación puntual A por G, nucleótido 383, en el exón 4 de la subunidad beta-2 integrina del gen CD18 (Shuster *et al*, 1992) donde se produce una sustitución del ácido aspártico por glicina en la posición 128 de la proteína del receptor (D128G) (Nagahata *et al*, 1997). Esta mutación afecta el funcionamiento de un receptor proteico de membrana en los leucocitos, impidiendo la migración de los neutrófilos desde los vasos sanguíneos al intersticio y, por consecuencia, la respuesta inmune contra las infecciones.

El objetivo de este trabajo fue realizar un monitoreo piloto de terneros Holando de Uruguay, para detectar portadores de CD18 D128G, mediante análisis HRM (*High Resolution Melting*) utilizando PCR tiempo en real y confirmación por secuenciación.

El ADN de los 52 terneros fue provisto por el DILAVE Treinta y Tres, a partir de muestras de sangre recolectadas en la Plataforma de Salud Animal de INIA, mediante una estrategia de muestreo no probabilística de conveniencia. Estas muestras provenían de terneros de 1-30 días, con o sin diarrea.

Para identificar la mutación CD18 D128G, se utilizaron 2 controles ADN heterocigotas portadores que fueron obtenidos del trabajo de Branda Sica *et al* (2016) y de la Dra. Silvia Llambí. Las muestras fueron analizadas mediante PCR en tiempo real con la aplicación HRM en *Rotor-Gene Q* (Corbett Research, Australia) con el intercalante fluorescente *EvaGreen* usando el kit *Type-it® HRM PCR* (QIAGEN) y un par de *primers* específicos (Mirck *et al*, 1995). El programa de ciclado consistió en una desnaturalización inicial de 5 min a 95°C, 40 ciclos de 10 s a 95°C, 30 s a 55°C y 10 s a 72°C. Para la adquisición de datos de fluorescencia con la aplicación HRM se estableció un rango de temperatura de 65-95°C en incrementos de 0,1°C con 2 s en cada paso. Luego de la amplificación HRM del fragmento de 159 pb se normalizaron las lecturas de fluorescencia utilizando el *software Rotor Gene* versión 1.7.28 que permitió identificar las curvas de *melting* en la zona estable de fluorescencia (Figura 1). Luego, se normalizó con respecto a los controles, homocigota normal y heterocigota portador, y el *software* estableció el genotipo de cada muestra analizada con un porcentaje de confianza mayor a 90%.

Se enviaron 25 amplicones a secuenciar a MACROGEN (Korea) para confirmar los resultados obtenidos por PCR-HRM (Figura 2). Finalmente, se analizó la información obtenida de las 25 secuencias *reverse* con las secuencias consenso y de referencia del gen CD18 (ITGB2) utilizando las herramientas BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), BioEdit (*BioEdit-Sequence Alignment Editor*) MEGA 7.0.26 (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis*) (Figura 3) y *Geneious Pro Trial 4.7.5* disponibles en internet.

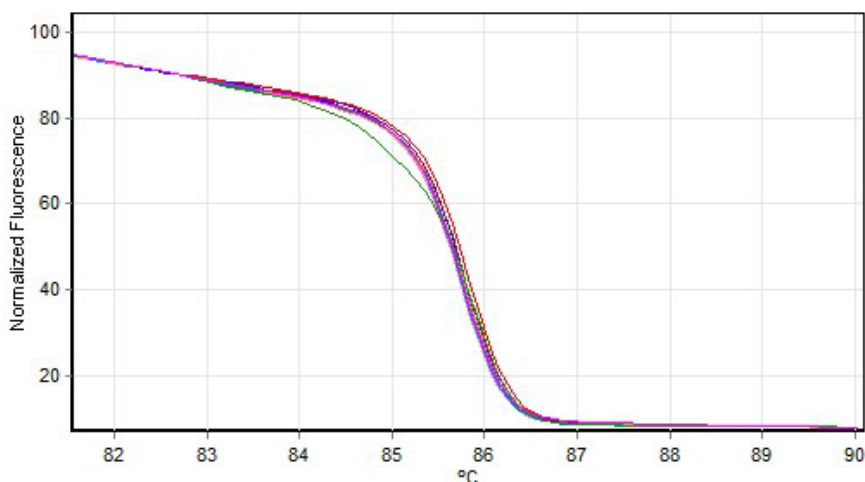


Figura 1: Normalización de las curvas de *melting* HRM de productos de PCR de 159 pb en función de la fluorescencia con respecto a la temperatura. Se observan 2 patrones de genotipos homocigotas sanos y heterocigota portador de CD18 D128G (línea verde).

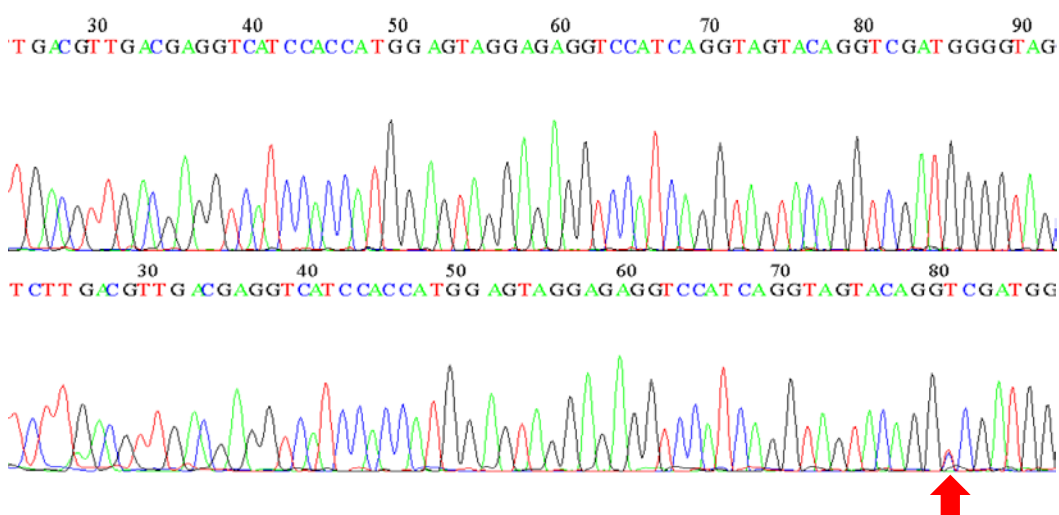


Figura 2: Electrofenogramas de las secuencias *reverse* de un ternero homocigota sano (arriba) y una vaca control portadora de CD18 D128G (abajo). Se observa en la posición 81 la superposición de los nucleótidos T y C (picos rojo y azul, respectivamente).

En total 52 terneros fueron analizados mediante PCR-HRM y 25 confirmados por secuenciación, no encontrándose animales homocigotas recesivos ni heterocigotas portadores de CD18 D128G.

El análisis por PCR-HRM es un método no invasivo para la detección de la mutación con alta sensibilidad y rapidez (<1,5 horas) que puede implementarse como estrategia de monitoreo, lo





## APROXIMACIONES GENÓMICAS, FISIOLÓGICAS Y DE MEJORAMIENTO PARA INCREMENTAR LA TOLERANCIA A SEQUÍA EN SOJA

Berger, A.<sup>1</sup>, Bonnacarrere, V.<sup>2,6\*</sup>, Borsani, O.<sup>3</sup>, Casaretto, E.<sup>3</sup>, Castillo, A.<sup>2</sup>, Castro, A.<sup>4</sup>, Ceretta, S.<sup>1</sup>, Fleitas, L.<sup>4</sup>, Gallino, J.P.<sup>4</sup>, Garaycochea, S.<sup>2</sup>, Iriarte, W.<sup>2</sup>, Kavanová, M.<sup>1</sup>, Quero, G.<sup>3</sup>, Rey, E.<sup>1</sup>, Ruibal, C.<sup>4</sup>, Simondi, S.<sup>5</sup>, Vidal, S.<sup>4</sup>.

Los investigadores vinculados al proyecto están nombrados en orden alfabético.

<sup>1</sup>Programa de Cultivo de Secano, INIA. <sup>2</sup>Unidad de Biotecnología, INIA. <sup>3</sup>Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, UdelaR. <sup>4</sup>Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, Facultad de Ciencias, UdelaR. <sup>5</sup>Departamento de Matemática, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad Nacional de Cuyo.

\*<sup>6</sup> Autor para correspondencia: Ruta 48, Km 10, Rincón del Colorado. vbonnacarrere@inia.org.uy

Palabras clave: sequía, genotipado, fenotipado, edición genómica, soja.

En el año 2016 se comenzó a ejecutar el proyecto que dio origen a la Red Nacional de Biotecnología Agrícola (RNBA) ([www.rnba.com.uy](http://www.rnba.com.uy)). Este proyecto permitió consolidar el grupo interinstitucional e interdisciplinario que estaba investigando la tolerancia a sequía en soja mediante la ejecución de otros proyectos de investigación (Proyecto Innovagro FSA\_1\_2013\_1\_12924). El proyecto RNBA es financiado por la ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación), el INIA, las empresas Erro S.A., FADISOL S.A., LEBU S.R.L. y las cooperativas CALMER y COPAGRAN. Este emprendimiento público-privado, tiene como propósito contribuir al incremento de la productividad y adaptabilidad de los cultivos. Inicialmente se trabajará con soja como cultivo objetivo, para lo cual se están implementando modernas herramientas de mejoramiento genético enfocadas a la mejora de la tolerancia a estrés abiótico y biótico. En este sentido, uno de los objetivos es el establecimiento de estrategias fisiológicas, genéticas y de mejoramiento que permitan mejorar la adaptabilidad de la soja a los fenómenos de déficit hídrico.

El estrés por sequía es uno de los factores ambientales más importantes que reducen el rendimiento de los cultivos. Esta reducción ocurre a pesar del incremento logrado a través de la incorporación de mejores prácticas agrícolas y del mejoramiento genético. La soja (*Glycine max* [L.] Merr) es especialmente susceptible al estrés hídrico por ser un cultivo de ciclo estival (Zipper et al. 2016). La sequía afecta la soja en etapas vegetativas y reproductivas, reduciendo el área foliar, incrementando el aborto de flores y chauchas y disminuyendo el tamaño de chauchas y semillas (Boyer, 1983). Estos efectos pueden llevar a reducir el rendimiento de la soja hasta en un 40 - 55 % (Specht et al. 1999, Specht et al. 2001).

Los programas de mejoramiento de soja están enfocados principalmente al incremento del rendimiento y al mantenimiento de la estabilidad de los mismos. Este último se refiere a la disminución de las variaciones interanuales que se dan principalmente por efecto de la sequía. La manera más directa de incorporar caracteres de resistencia a sequía es introducir variantes genéticas de soja ancestral adaptadas a crecimiento en condiciones limitantes o extremas (Valliyodan et al. 2016). Sin embargo, en programas de mejoramiento como el de INIA, esta estrategia no es posible en la medida que se produce una regresión en la adaptabilidad lo que

conllevaría a un mayor número de ciclos de selección necesarios. Es por esta razón que este grupo de investigación busca analizar desde el punto de vista fenotípico y genético las variaciones existentes en los genotipos ya adaptados a nuestras condiciones de crecimiento con el objetivo de encontrar o generar variantes mejor adaptadas a la sequía.

Con este fin se están utilizando tres estrategias: 1) el desarrollo de métodos de fenotipado de la respuesta a sequía, adaptado a nuestras condiciones y nuestras capacidades; 2) la búsqueda de regiones genómicas asociadas a la tolerancia a sequía como estrategia para el hallazgo de genes candidatos vinculados a la respuesta a sequía 3) introducción de variantes alélicas en genes candidatos mediante edición genómica.

### **Desarrollo de métodos de fenotipado para tolerancia a sequía en soja**

Incluir la tolerancia a sequía como criterio de selección requiere del desarrollo de estrategias de fenotipado de alta capacidad, precisas y de bajo costo (Tuberosa, 2012). En la actualidad existen plataformas que cumplen con las primeras dos características pero los costos de su adquisición superan las capacidades nacionales. En el marco de este proyecto desarrollamos modelos matemáticos que nos permiten evaluar las diferencias genotípicas en cuanto al consumo de agua en condiciones controladas. Por otro lado, se generó un equipo de fenotipado a campo que mediante diferentes sistemas de medición (sensores, dataloggers, espectrómetros, GPS) permitirá determinar temperatura de la canopia, reflectancia, altura de la planta y condiciones meteorológicas locales. Con estas mediciones se podrá determinar: tasa de evapotranspiración instantánea, área foliar (biomasa), ángulo de las hojas, contenido de clorofila por unidad de área, conductividad estomática, índices espectrales (pasivos) vinculados al contenido relativo de agua y nivel de estrés hídrico. Además se adquirió un equipo de discriminación isotópica de oxígeno que nos posibilita conjuntamente con la cuantificación de la discriminación isotópica de carbono, determinar con precisión la eficiencia del uso del agua de los diferentes genotipos.

Los efectos del estrés por sequía se encuentran asociados al estrés causado por las altas temperaturas o estrés térmico. Por esta razón, en el marco de la RNBA también se está investigando la respuesta diferencial de genotipos al estrés generado por altas temperaturas.

Hasta el momento, se ha podido determinar que en los genotipos de mejoramiento nacionales existen dos tipos de respuesta a la sequía agrupando a los genotipos respecto a la cinética de diferentes parámetros fisiológicos, en particular la cinética del consumo de agua. Estos grupos están vinculados con los grupos contrastantes en cuanto a la velocidad de marchitamiento.

### **Identificación de regiones genómicas asociadas a tolerancia a sequía**

En el marco de la RNBA se han desarrollado poblaciones para estudios de mapeo asociativo y poblaciones biparentales generadas por cruzamiento de parentales con fenotipos contrastantes en cuanto a su respuesta a la sequía. Estas poblaciones han sido genotipadas mediante técnicas que permiten la exploración del genoma completo (GBS y chips de SNP) y fenotipadas utilizando las metodologías ya mencionadas. Mediante complejos análisis de asociación se han podido determinar regiones genómicas y marcadores asociados a la sequía las que están siendo estudiadas para la identificación de genes candidatos. El uso de marcadores como herramienta de mejoramiento para introgresar regiones genómicas asociadas a caracteres complejos, no es viable en la medida de que cada uno por separado explica solamente una baja proporción de la varianza genética. Contrariamente, la identificación de genes candidatos en dichas regiones

utilizando anotación genómica *in silico*, es una valiosa herramienta fundamental para los estudios de modificación genética (transgénesis y edición genómica) también implementados en este proyecto.

### **Introducción de variantes alélicas mediante edición genómica.**

La edición genómica permite la creación directa de alelos favorables de genes candidatos de forma guiada, a partir del conocimiento de la secuencia del gen a editar. Existen diversas herramientas de edición genómicas disponibles, pero en este proyecto se está utilizando el sistema CRISPR/CAS-9. Además, se está investigando la posibilidad de realizar edición genómica sin utilizar transgénesis. En este momento se está trabajando en la edición de genes asociados a la respuesta a sequía (previamente identificados por este grupo) y genes asociados a caracteres de calidad del grano (tamaño del grano y disminución de compuestos anti-nutricionales).

### **Referencias bibliográficas**

Zipper, S.C., J. Qiu, and C.J. Kucharik. 2016. Drought effects on US maize and soybean production: spatiotemporal patterns and historical changes. *Environ. Res. Lett.* 11:094021.

Boyer JS. 1983. Environmental stress and crop yields. In: *Crop reactions to water and temperature stresses in humid, temperate climates*, Raper, CD Jr., Kramer PJ (eds.). Westview Press, Boulder, CO, 3-7.

Specht JE, Hume D, Kumudini S. 1999. Soybean yield potential—a genetic and physiological perspective. *Crop Science* 39(6): 1560-1570.

Specht JE, Chase K, Macrander M, Graef GL, Chung J, Markwell JP, Germann M, Orf JH, Lark KG. 2001. Soybean response to water: A QTL analysis of drought tolerance. *Crop Sci.* 41(2): 493-509.

Valliyodan B, Heng Y, Song L, Murphy M, Shannon JG, Nguyen HT. 2016. Genetic diversity and genomic strategies for improving drought and waterlogging tolerance in soybeans *Journal of Exp. Bot.* 68(8):1835–1849.

Tuberosa R. 2012. Phenotyping for drought tolerance of crops in the genomics era. *Front Physiol.* 3: 347.

Humlík JF, Lazár, D, Husičková, A, Spíchal, L. 2015. Automated phenotyping of plant shoots using imaging methods for analysis of plant stress responses – a review. *Plant Methods*, 11:29.

## HERRAMIENTAS BIOESTADÍSTICAS PARA MEJORAMIENTO DE LA RESISTENCIA GENÉTICA A ENFERMEDADES DEL TALLO EN ARROZ

J. E. Rosas<sup>1</sup>, S. Martínez<sup>2</sup>, Victoria Bonnacarrère<sup>3</sup>, P. Blanco<sup>4</sup>, F. Pérez de Vida<sup>5</sup>, S. Germán<sup>6</sup>, J.-L. Jannink<sup>7</sup>, L. Gutiérrez<sup>8</sup>.

Palabras clave: Podredumbre del tallo, mancha agregada de las vainas, GWAS, covariables, modelos mixtos.

### Introducción

La resistencia a enfermedades es uno de los principales objetivos de todo programa de mejoramiento de cultivos. Como para cualquier otra característica, para maximizar la ganancia genética en menos ciclos de mejoramiento, es necesario seleccionar las líneas resistentes con la mayor precisión posible. En arroz, la selección por resistencia a enfermedades del tallo y la vaina por medio de evaluaciones en ensayos de parcelas en campo experimental presenta algunos desafíos. La cantidad de inóculo del hongo puede ser muy heterogénea en condiciones de infección natural, generando variabilidad y disminuyendo la precisión de la estimación fenotípica de la resistencia (Rosas et al. 2016). Además, las condiciones ambientales que favorecen la expresión de estas enfermedades pueden variar anualmente, generando fuerte interacción genotipo por ambiente. Por último, algunos factores morfológicos y fenológicos como la altura de planta (PH) y tiempo de floración (FT) explican parte de la varianza genética de la resistencia a las enfermedades, haciendo difícil mejorar la resistencia en forma independiente de estos rasgos. El objetivo de mejoramiento es incrementar la resistencia sin afectar el ciclo ni la altura de la planta, ya que esto podría traer desventajas agronómicas (Rosas et al. 2017). Una de las estrategias para hacer frente a estos desafíos es complementar la selección fenotípica con selección asistida por marcadores moleculares o *marker assisted selection* (MAS). Para evaluar la conveniencia de la selección asistida para una determinada característica, es necesario conocer su arquitectura genética determinando los loci asociados a rasgos cuantitativos o *quantitative trait loci* (QTL), y la proporción de la varianza fenotípica explicada (PVE) por estos QTL (Massman et al. 2012). Las principales enfermedades que afectan el tallo y la vaina del arroz en Uruguay son la podredumbre del tallo, causada por el hongo *Nakataea oryzae* (NO), y la mancha agregada de las vainas, causada por el hongo *Rhizoctonia oryzae-sativae* (ROS). No existen reportes previos a este estudio sobre la arquitectura genética de la resistencia a estas enfermedades en el arroz cultivado (*Oryza sativa* L.). El mapeo asociativo o *genome-wide association study* (GWAS) permite estudiar la arquitectura genética en una población en la que las frecuencias alélicas

<sup>1</sup> Lic., Mag., Dr., Investigador Asistente, Programa Nacional de Arroz. jrosas@tyt.inia.org.uy

<sup>2</sup> Ing. Agr., Dr., Investigador Principal, Programa Nacional de Arroz. smartinez@tyt.inia.org.uy

<sup>3</sup> Ing. Agr., Dr., Investigador Principal, Unidad de Biotecnología. vbonne@lb.inia.org.uy

<sup>4</sup> Ing. Agr., M. Sc., Investigador Principal Referente, Programa Nacional de Arroz. pblanco@tyt.inia.org.uy

<sup>5</sup> Ing. Agr., Ph. D., Investigador Principal Referente, Programa Nacional de Arroz. fperez@tyt.inia.org.uy

<sup>6</sup> Ing. Agr., Ph. D. Investigador Principal Referente, Programa Nacional de Cultivos de Secano. sgerman@le.inia.org.uy

<sup>7</sup> Ph. D., Profesor Adjunto, College of Agriculture and Life Sciences, Cornell University. jj332@cornell.edu

<sup>8</sup> Ing. Agr., Ph.D., Profesor Asistente, Department of Agronomy, University of Wisconsin-Madison. gutierrezcha@wisc.edu

están desbalanceadas por los diversos niveles de parentesco entre los individuos, como es el caso del germoplasma de un programa de mejoramiento genético (Jannink et al., 2001). Asimismo, el uso de cofactores en el análisis de GWAS permite identificar QTL que sean independientes de la variable usada como cofactor (von Zitzewitz et al., 2011). El objetivo de este trabajo es identificar QTL para resistencia a NO y ROS en el germoplasma del Programa de Mejoramiento Genético de Arroz de INIA, que sean independientes del ciclo y la altura de la planta, y cuantificar la PVE de estos QTL en dicha población.

## **Materiales y métodos**

*Material vegetal:* Se usaron dos poblaciones para mapeo asociativo, constituidas por líneas representativas de la variabilidad presente en etapas avanzadas de evaluación del Programa de Mejoramiento Genético de Arroz de INIA. La población de líneas de tipo indica fue de 316 genotipos, y la de japónica tropical de 325 genotipos. *Fenotipado:* Se evaluó la resistencia a las enfermedades del tallo y la vaina en ensayos de invernáculo y de campo. En invernáculo, se realizaron dos ensayos para resistencia a NO, y tres para resistencia a ROS. En campo, se utilizaron datos de cuatro años de ensayos con infección natural para japónica tropical, y de dos años para indica, más un año con inoculación artificial para ambas poblaciones. Se registraron las covariables estado fenológico y ancho del tallo en los ensayos de invernáculo, y FT y PH en los de campo. Para cada enfermedad, las medias fenotípicas de la resistencia se estimaron ajustando un modelo sin covariables, y otro utilizando las covariables FT y PH. *Genotipado:* Se obtuvieron matrices de 50K y 29K SNP para las poblaciones indica y japónica tropical, respectivamente. *GWAS:* Se realizaron dos tipos de escaneos de GWAS para resistencia a NO y ROS: 1) usando las medias fenotípicas estimadas sin usar covariables, y el análisis de GWAS sin cofactores; 2) usando las medias fenotípicas estimadas corregidas por las covariables FT y PH, y análisis de GWAS con SNPs seleccionados como cofactores. También se realizó un escaneo de GWAS para FT y otro para PH. El PVE se estimó con un modelo multi-locus conjunto para todos los QTL, incluyendo un SNP por cada QTL significativo. Se estimó el efecto en FT y PH de combinar los alelos de resistencia de todos los QTL identificados en el modelo multi-locus. Se realizó una búsqueda bibliográfica y en bases de datos genómicas anotadas de QTL y genes para FT y PH. Los materiales y análisis de este trabajo se describen en mayor detalle en Rosas et al. (2017).

## **Resultados de la investigación**

Los QTL encontrados en los escaneos de GWAS 1 (medias fenotípicas sin corrección por covariables) coincidieron con los QTL encontrados para FT y PH. Los QTL encontrados con el escaneo de GWAS 2 mostraron diferentes arquitecturas de la resistencia a NO y a ROS en las poblaciones indica y japónica tropical, con PVE intermedias y bajas para ambas enfermedades en ensayos de campo y para NO en invernáculo, y muy bajas para ROS en invernáculo (Figura 1). El efecto de sustitución alélica de los QTL independientes de FT y PH identificados con el escaneo de GWAS 2 en FT y PH fue nulo o muy bajo. Además, ninguno de estos QTL colocalizó con genes o QTL reportados para FT o PH.

## Conclusiones

Los resultados de este trabajo demuestran la utilidad de incluir covariables en el análisis bioestadístico para la obtención de las medias fenotípicas ajustadas, así como el uso de SNPs como cofactores en el análisis de GWAS. De esta forma, se logra remover eficientemente el efecto de factores de confusión no deseados. Los QTL identificados en este trabajo para resistencia a NO y ROS no tienen efecto en FT o PH, por lo que pueden ser de utilidad para mejorar la resistencia por MAS sin alterar las características agronómicas. Los PVE de los QTL identificados para ensayos de campo sugieren la potencialidad de los SNP asociados para MAS de resistencia a NO y ROS. Análisis comparativos de precisión de la selección fenotípica y la asistida, considerando además factores logísticos y económicos, son necesarios para determinar el método de selección más conveniente en cada caso.

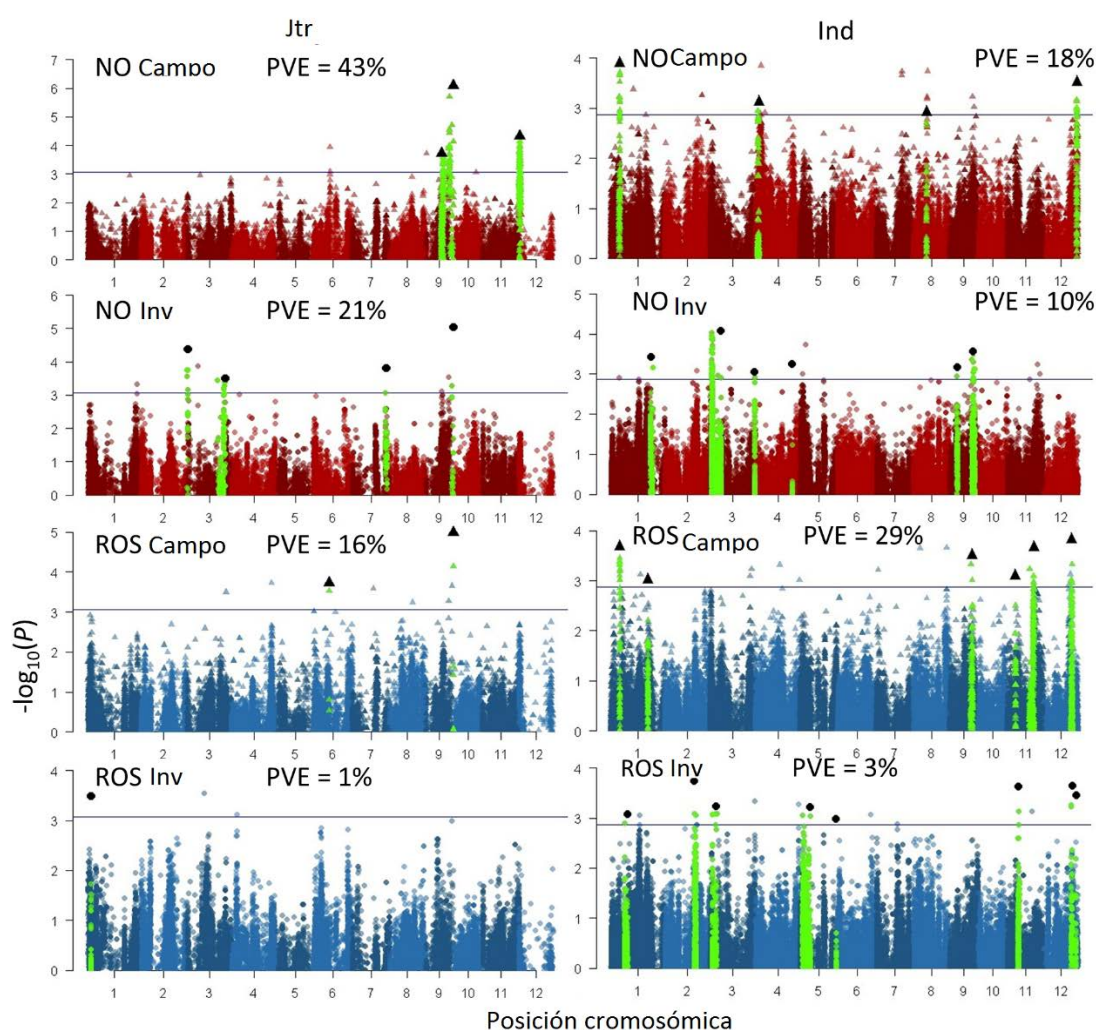


Figura 1. Escaneos de GWAS para resistencia a *Nakataea oryzae* (NO, rojo), y resistencia a *Rhizoctonia oryzae-sativae* (ROS, azul), en ensayos de campo (triángulos) e invernáculo (círculos) para las poblaciones japónica tropical (Jtr, izquierda) e índica (Ind, derecha). Todos los SNPs en las regiones definidas como QTL se marcan en verde, y el SNP con el mayor  $-\log_{10}(P)$  de cada QTL se marca en negro. Se reportan las proporciones de la varianza fenotípica explicada (PVE) por todos los QTL de cada escaneo que resultaron significativos en el modelo multi-locus.

## Referencias bibliográficas

**JANNINK, J.** 2001. Using complex plant pedigrees to map valuable genes. *Trends in Plant Science*, v. 6, p. 337-342.

**MASSMAN, J.M.; JUNG, H.J.G.; BERNARDO, R.** 2008. Genomewide selection versus marker-assisted recurrent selection to improve grain yield and stover-quality traits for cellulosic ethanol in maize. *Crop Science*, v. 53, p. 58-66.

**ROSAS, J.E.; MARTÍNEZ, S.; BLANCO, P.; PÉREZ DE VIDA, F.; BONNECARRÈRE, V.; MOSQUERA, G.; CRUZ, M.; GARAYCOCHEA, S.; MONTEVERDE, E.; MCCOUHC, S.; GERMÁN, S.; JANNINK, J.-L.; GUTIÉRREZ, L.** 2017. Resistance to multiple temperate and tropical stem and sheath diseases of rice. *The Plant Genome*, doi: 10.3835/plantgenome2017.03.0029.

**ROSAS, J.E.; MARTÍNEZ, S.; BONNECARRÈRE, V.; BLANCO, P.; PÉREZ DE VIDA, F.; MALOSETTI, M.; JANNINK, J.-L.; GUTIÉRREZ, L.** 2016. Comparison of phenotyping methods for resistance to stem rot and aggregated sheath spot in rice. *Crop Science*, v. 56, p. 1619–1627.

**VON ZITZEWITZ, J.; CUESTA-MARCOS, A.; CONDON F.; CASTRO A.J.; CHAO, S.; COREY, A.; FILICHKIN, T.; FISK, S.P.; GUTIÉRREZ, L.; HAGGARD, K.; KARSAI, I.; MUEHLBAUER, G.J.; SMITH, K.P.; VEISZ, O.; HAYES, P.M.** 2011. The genetics of winterhardiness in barley: perspectives from genome-wide association mapping. *The Plant Genome*, v. 4, p. 76-91.

## IDENTIFICACIÓN Y DINÁMICA DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS EN ALCACHOFA (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*) MEDIANTE TRANSCRIPTÓMICA

Maidana Matías<sup>1</sup>; Feijoo Matías<sup>1</sup>; Garaycochea Silvia<sup>1</sup>; Dalla Rizza Marco<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de proteínas, Unidad Técnica de Biotecnología, INIA Las Brujas, Ruta 48 Km. 10. Rincón del Colorado, Canelones, Uruguay. CP. 90.200.  
[matiasfeijoo@gmail.com](mailto:matiasfeijoo@gmail.com).

La aparición de patógenos resistentes a los antibióticos convencionales nos está dirigiendo a una "era post-antibióticos" en donde las estrategias terapéuticas previas dejarían de ser funcionales. En este sentido, dado su efecto directo sobre bacterias y hongos patógenos los Péptidos Anti-Microbianos (PAMs) han capturado la atención para el desarrollo de nuevas estrategias (Mahlapuu et al 2016). Los PAMs han sido aislados de diversas fuentes naturales, tales como invertebrados, anfibios, aves, peces, plantas e incluso mamíferos (Lee and Lee 2015). Son clasificados en diversas familias según su tamaño (12 a 150 aminoácidos), estructura, y sus organismos blanco (Vosloo 2016). La función de los PAMs forma parte tanto del sistema inmune basal como del sistema inmune adaptativo de los organismos. En plantas, los PAMs actúan directamente sobre los patógenos como complemento de inmunidad activada por PAMP (de su sigla en inglés, patrones moleculares asociados a patógenos) y en los mecanismos de inmunidad activados por efectores (Robinson et al 2012) y también como moduladores de la señalización defensiva (Bolouri Moghaddam et al. 2017). *Cynara cardunculus* var. *scolymus* (alcachofa o alcaucil) es una especie alógama originaria del mediterráneo perteneciente a la familia Asteraceae. Trabajos previos realizados en la Unidad de Biotecnología de INIA Las Brujas, reportan la presencia de al menos un péptido antimicrobiano purificado a partir de semillas. Con el fin de comprender la distribución y niveles de producción de estos péptidos, se analizó el transcriptoma en dos etapas del desarrollo de un mismo órgano, semillas inmaduras y semillas germinadas. La búsqueda de los PAMs presentes se realizó mediante la identificación de motivos de cisteína en los transcriptos ensamblados, según se reporta en Silverstein et al. (2007) y Slavokhotova et al. (2015) y permitió identificar 15 motivos (de los 146 escrutados) en 95 péptidos diferentes. Los PAMs encontrados comparten homología con péptidos validados experimentalmente tales como Dm-AMP1 (defensina), Snakin-1, Vv-AMP1 (defensina), Snakin-2, entre otros. A su vez, mediante el análisis de expresión diferencial se identificaron 47 péptidos que varían su nivel de expresión según el estado de la semilla.

### Referencias bibliográficas

Bolouri Moghaddam MR, Vilcinskas A, Rahnamaeian M. 2016. Cooperative interaction of antimicrobialpeptides with the interrelated immune pathways in plants. *Molecular Plant Pathology*. 17: 464-471

Fjell CD, Hiss JA, Hancock REW, Schneider G. 2012. Designing antimicrobial peptides: form followsfunction. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11: 37-51.



Mahlapuu M, Håkansson J, Ringstad L, Björn C. 2016. Antimicrobial Peptides: An Emerging category of Therapeutic Agents. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 6:1-12.

Silverstein KA, Graham MA, Paape TD, Vanden Bosch KA. 2005. Genome organization of more than 300 defensin-like genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 138:600-610.

Slavokhotova AA, Shelenkov AA, Odintsova TI. 2015. Prediction of *Leymus arenarius* (L.) antimicrobial peptides based on de novo transcriptome assembly. *Plant Molecular Biology*.

Vosloo JA. 2016. Optimized bacterial production and characterization of natural antimicrobial peptides with potential application in agriculture.

## RESISTENCIA A MARCHITEZ BACTERIANA EN PAPA MEDIADA POR EXPRESION DE EFR E INTROGRESSION DE GENES DE RESISTENCIA DE *SOLANUM COMMERSIONII*

Boschi F.<sup>1</sup>, Schwartzman C.<sup>2</sup>, Murchio S.<sup>2</sup>, Ferreira V.<sup>3</sup>, Siri M.I.<sup>3</sup>, Galván G.A.<sup>4</sup>, Smoker M.<sup>5</sup>, Stransfeld L.<sup>5</sup>, Zipfel C.<sup>5</sup>, Vilaró F.<sup>6</sup>, and Dalla-Rizza M.<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Semillas (INASE). <sup>2</sup>Unidad de Biotecnología, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), <sup>3</sup>Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Universidad de la República, <sup>4</sup>Departamento de Producción Vegetal, Centro Regional Sur (CRS), Facultad de Agronomía, Universidad de la República, <sup>5</sup>The Sainsbury Laboratory, <sup>6</sup>Programa de Producción Hortícola, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). \*[mdallarizza@inia.org.uy](mailto:mdallarizza@inia.org.uy)

Palabras Clave:

### Introducción

La marchitez bacteriana o Bacterial Wilt (BW) causada por *Ralstonia solanacearum* es considerada como una de las enfermedades más destructivas en plantas con una distribución mundial. *R. solanacearum* puede persistir en suelo, desechos de plantas, rizósfera y puede asimismo alternar entre hospederos. Su principal forma de dispersión es por semilla pero también puede propagarse a través de herramientas de laboreo y del agua de riego, haciendo compleja la erradicación de la bacteria (Hayward, 1991). A la fecha no hay control eficiente de esta enfermedad a nivel de planta ni variedades comerciales resistentes disponibles para la producción (Álvarez et al., 2010).

La papa (*Solanum tuberosum*), es el cuarto cultivo más importante y uno de los más significativos del grupo solanácea. En Uruguay se plantan alrededor de 5000 ha, produciéndose 120000 toneladas por año (DIEA, 2016). Para la papa, la marchitez bacteriana es uno de los principales problemas productivos, siendo la segunda patología en importancia (Priou et al., 1999). El uso de cultivares resistentes es un método de control de bajo costo y amigable con el medio ambiente. Sin embargo, hay hasta el momento pocas fuentes de resistencia disponibles en el germoplasma de papa. *Solanum commersonii* (cmm), es una especie salvaje diploide nativa de Uruguay, Este de Argentina y Sur de Brasil que contiene muchos caracteres deseables como tolerancia a baja temperatura y resistencia a varios patógenos incluyendo *R. solanacearum* (Carputo et al., 2009). El Programa de Horticultura de INIA a logrado generar cruzamientos entre *S. tuberosum* y *S. commersonii* con niveles de resistencia variables a *R. solanacearum*. El receptor EFR de *A. thaliana* (At) perteneciente al sistema de reconocimiento PTI reconoce el factor de elongación Tu (Elongation Factor Tu, EF-Tu) descrito en la familia Brassicaceae, (Kunze, 2004). Se ha evaluado la expresión heteróloga de EFR en *Nicotiana benthamiana* y tomate (variedad Moneymaker), ambos miembros de la familia Solanaceae, observando que confiere resistencia a un rango filogenéticamente diverso de bacterias patógenas incluyendo *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* y *R. solanacearum* (Lacombe et al., 2010).

En este sentido, INIA en colaboración con The Sainsbury Laboratory, transformaron plantas del cultivar comercial susceptible INIA Iporá y el clon de mejoramiento 09509.6

(parcialmente resistente) con el receptor AtEFR. La evaluación de los genotipos generados evidenció expresión funcional del receptor EFR determinándose adicionalmente el número de copias del gen en cada evento (Boschi et al., 2017). En este trabajo se evaluó el efecto de la expresión del gen EFR en una línea comercial de papa (INIA Iporá) y un clon de mejoramiento (09509.6), al desarrollo de marchitez bacteriana en condiciones controladas de bioseguridad. Los resultados aquí presentados fueron publicados en Boschi et al 2017.

### Metodología

Se trabajó con tres líneas de INIA Iporá (3, 12 y 27) y tres líneas del clon 09509.6 (34, 37 y 41) transformadas con el receptor EFR y sus respectivos testigos sin transformar. Para determinar la respuesta a *R. solanacearum* se realizaron ensayos de inoculación con daño de raíz con la cepa de *R. solanacearum* UY031 (Siri, 2010) a una concentración de  $10^7$  ufc/ml. Cada parcela constó de 16 plantas en un diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones. Se estudió el índice de enfermedad (IE) en una escala de 0 a 4 (0= sin síntomas y 4= muerte de planta) cada 7 días hasta el día 28 después de la inoculación. Además, se realizó el estudio del área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC). Para evaluar la transmisión de *R. solanacearum* a los tubérculos, 11 plantas por evento fueron inoculadas y mantenidas en condiciones de tuberización por 90 días. Los tubérculos de plantas resistentes fueron cosechados y analizados en la presencia de *R. solanacearum*. La detección de infecciones de *R. solanacearum* en plantas resistentes (infecciones latentes) fue evaluada mediante BIO-multiplex PCR utilizando primers específicos para el filotipo IIB secuevar 1 y conteo en placa en medio selectivo mSMSA de tallos y estolones de los mini-tubérculos colectados.

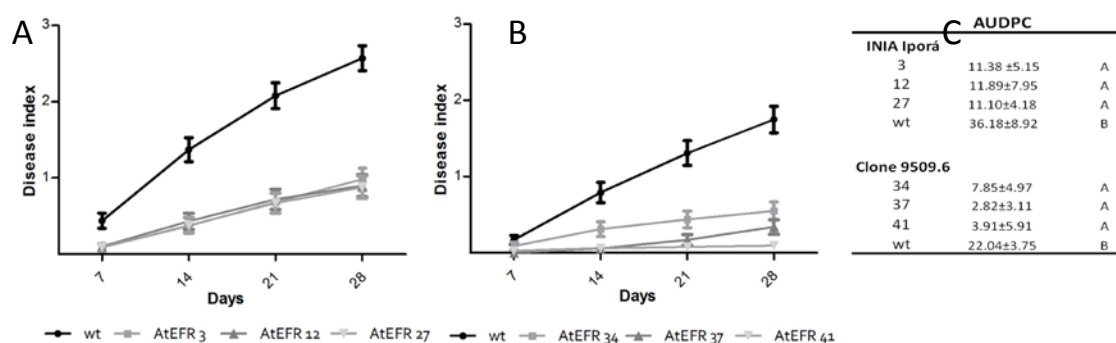


Figura 1. Curvas de progreso de enfermedad en Inia Iporá (A) y clon 09509.6 (B) luego de inoculación en suelo con *R. solanacearum*. En C, valores de AUDPC promedio de dos ensayos independientes y significancia estadística ( $p < 0,05$ ) por test de tukey. Adaptado de Boschi et al 2017.

### Resultados

La evaluación de la respuesta a *R. solanacearum* en condiciones de cámara de crecimiento mostraron que los eventos transformados de ambos genotipos son significativamente más resistentes respecto a los controles sin transformar (Figura 1).

INIA Iporá-AtEFR mostró una reducción de enfermedad del 68% mientras que en el caso del clon 09509.6-AtEFR un 77%. Estos resultados sugieren que el gen EFR confiere resistencia parcial a BW. Más aún, genes de resistencia menores introgresados de cmm estarían potenciando la respuesta observada medida por EFR.

Infecciones latentes y asintomáticas de *R. solanacearum* son un problema mayor en el control de BW y son un impedimento en el uso de los tubérculos como semilla-papa. Para determinar la infección latente de plantas resistentes de los ensayos de inoculación, se evaluaron tallos a los 28 días post inoculación. La proporción de plantas positivas a nivel de presencia de *R. solanacearum* en tallo se muestra en la figura 2A. Todos los eventos de transformación mostraron una reducción en el porcentaje de tallos infectados en comparación con los controles sin transformar. INIA Iporá EFR presentó un promedio de  $10^3$  cfu.mL<sup>-1</sup> mientras que en el clon 09509.6 AtEFR  $10^2$  cfu.mL<sup>-1</sup>.

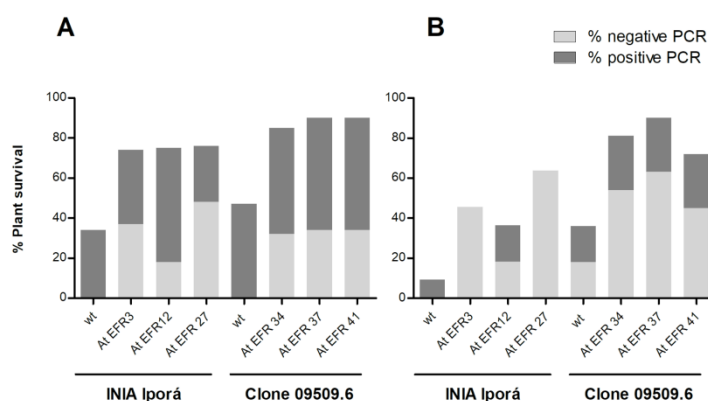


Figura 2. Las barras corresponden al porcentaje de sobrevivencia de plantas luego de la inoculación (28 días) en A o 90 días en B. La proporción de plantas positivas para *R. solanacearum* en tallo (A) o tubérculo (B) se denotan en gris oscuro. Promedio de 2 experimentos independientes, n=4. Adaptado de Boschi et al 2017.

En ensayos de tuberización, las plantas transformadas mostraron ser más resistentes a BW a los 90 días luego de la inoculación respecto los controles sin inocular. Más aún, los tubérculos cosechados mostraron menor proporción de presencia de bacteria cuando se comparan con los controles sin transformar (Figura 2B), siendo las cargas bacterianas menores a  $10^3$  cfu.mL<sup>-1</sup> en INIA Iporá 3 y 27, mientras que en el clon, los tubérculos positivos mostraron en promedio  $10^2$  cfu.mL<sup>-1</sup>. Estos resultados muestran que en las condiciones evaluadas, la respuesta a BW se mantiene hasta la tuberización, siendo las plantas transformadas más resistentes que las sin transformar. Si bien se detectó infección latente en tallo y tubérculo, hubo menor proporción y carga bacteriana en los eventos de transformación.

## Conclusiones

Ambos genotipos de papa transformadas con el receptor EFR mostraron mayor resistencia a la marchitez bacteriana y menor presencia de infecciones latentes en tallo y tubérculo. Más aún, las líneas del clon de mejoramiento 09509.6 EFR mostraron una respuesta potenciada, indicando que la resistencia parcial derivada de mejoramiento clásico puede ser combinada con estrategias de ingeniería genética para generar un efecto. Los eventos generados pueden contribuir hacia un control integrado de la marchitez bacteriana en papa.

## Referencias bibliográficas

- Álvarez, B., Biosca, E. G., and López, M. M. (2010). On the life of *Ralstonia solanacearum*, a destructive bacterial plant pathogen. *Technol. Educ. Top. Appl. Microbiol. Microb. Biotechnol.*, 267–279. Available at: [https://pdfs.semanticscholar.org/aa85/77e213e2977a0e4eb739795e3fea51187181.pdf?\\_ga=2.156465595.1055873898.1504096691-1311319012.1504096691](https://pdfs.semanticscholar.org/aa85/77e213e2977a0e4eb739795e3fea51187181.pdf?_ga=2.156465595.1055873898.1504096691-1311319012.1504096691).
- Boschi, F., Schwartzman, C., Murchio, S., Ferreira, V., Siri, M. I., Galván, G. A., et al. (2017). Enhanced Bacterial Wilt Resistance in Potato Through Expression of Arabidopsis EFR and Introgression of Quantitative Resistance from *Solanum commersonii*. *Front. Plant Sci.* 8, 1642. doi:10.3389/fpls.2017.01642.
- Carpato, D., Aversano, R., Barone, A., Di Matteo, A., Iorizzo, M., Sigillo, L., et al. (2009). Resistance to *ralstonia solanacearum* of sexual hybrids between *solanum commersonii* and *S. tuberosum*. *Am. J. Potato Res.* 86, 196–202. doi:10.1007/s12230-009-9072-4.
- DIEA (2016). Anuario estadístico agropecuario.
- Hayward, A. C. (1991). Bacterial Wilt Caused by *pseudomonas solanacearum*. *Annu rev Phytopathol* 29, 65–87. doi:10.1146/annurev.py.29.090191.000433.
- Kunze, G. (2004). The N Terminus of Bacterial Elongation Factor Tu Elicits Innate Immunity in Arabidopsis Plants. *Plant Cell Online* 16, 3496–3507. doi:10.1105/tpc.104.026765.
- Lacombe, S., Rougon-Cardoso, A., Sherwood, E., Peeters, N., Dahlbeck, D., van Esse, H. P., et al. (2010). Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. *Nat. Biotechnol.* 28, 365–369. doi:10.1038/nbt.1613.
- Priou, S., Aley, P., Chujoy, E., Lemaga, B., and French, E. R. (1999). Integrated Control of Bacterial Wilt of Potato. CIP Series IV-III. Lima Available at: <http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/10/guiaing.pdf>.

## IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE UN CLON DE FRUTILLA MEDIANTE MARCADORES MICROSATÉLITES

Giambiasi Mario<sup>1</sup>, Vicente Esteban<sup>2</sup>, Arruabarrena Ana<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología, INIA Salto Grande, Salto, Uruguay.

<sup>2</sup>Programa Nacional de Producción Hortícola, INIA Salto Grande, Salto, Uruguay.

Mail: aarruabarrena@inia.org.uy

### Introducción

La frutilla es un producto tradicional de la horticultura del noroeste de Uruguay. El cultivo se realiza en unidades de producción familiar, en pequeñas superficies que utilizan una importante cantidad de mano de obra. Actualmente en Salto se produce más del 50% de la frutilla nacional. La zona está especializada en la producción precoz de invierno e inicios de la primavera. Las variedades utilizadas son en su gran mayoría provenientes del programa de mejoramiento genético de INIA (Vicente *et al.*, 2012).

El programa comenzó en 1992 y busca obtener cultivares con calidad superior de fruta, resistencia a enfermedades y adaptadas a las condiciones del Uruguay. Previamente a liberarse una nueva variedad se validan los clones avanzados en predios de productores representativos (Vicente *et al.*, 2004).

A comienzos del año 2017 surgieron dudas sobre la identidad de un clon avanzado en el predio de uno de los validadores. Este genotipo concordaba con las características morfológicas del clon N25.1, valioso por su alta resistencia a enfermedades de tallo y raíz.

Los marcadores microsatélites (SSR) son segmentos cortos de ADN de 1 a 6 pares de bases (pb), que se repiten en tándem y de forma aleatoria en el genoma. Son considerados por la mayoría de autores una poderosa herramienta para estudios genéticos dado a que presentan un elevado grado de polimorfismo, su herencia es mendeliana simple, son codominantes, repetitivos y automatizables. Estos marcadores se encuentran generalmente en regiones no codificantes del genoma y distribuidos uniformemente (Goldstein y Schlotterer, 1999). En el laboratorio de Biotecnología de INIA Salto Grande se cuenta con un set de marcadores moleculares SSR de Frutilla previamente seleccionados y ajustados (Arruabarrena *et al.*, 2016)

En este trabajo se planteó estudiar la identidad del clon avanzado de frutilla y confirmar si se trata de N25.1.

### Materiales y Métodos

Se recolectaron muestras de hoja y se extrajo ADN del clon problema (sitio 1), de otro predio de validación (sitio 2) y de la planta original mantenida en el banco de germoplasma de INIA Salto Grande. También se recolectaron hojas y se extrajo ADN del clon R14.1, que tiene como uno de sus parentales al clon N25.1.

Se utilizó un set de 4 marcadores moleculares (loci SSR) previamente ajustados y seleccionados en el laboratorio de Biotecnología de INIA SG para realizar el estudio. Para confeccionar la matriz y analizar los resultados se utilizó información adicional de las

configuraciones alélicas de otros genotipos relacionados o no a N25.1 para dar mayor confiabilidad al método. Los genotipos utilizados, su origen y la relación con N25.1 se detallan en la Tabla 1.

Para el análisis filogenético se generó una matriz binaria, donde los alelos fueron contados como “1” para presente y “0” para ausente. Las relaciones genéticas entre genotipos se calcularon por el método de similitud genética propuesto por Nei y Li (1979). La matriz de distancias generada se utilizó para construir un dendrograma por medio del coeficiente Dice y el método UPGMA utilizando el software SplitsTree4.

### Resultados y discusión

Los resultados obtenidos determinaron que el clon N25.1 del banco de germoplasma de INIA y el obtenido en el 2, tienen la misma configuración alélica que el clon sin identificar del sitio 1. En la Tabla 1 se detalla la configuración alélica de cada uno de los genotipos analizados. Los alelos presentes en el clon N25.1 están resaltados. El resto de los genotipos estudiados comparten algunos alelos con el clon de referencia, pero en ningún caso comparten la totalidad.

Tabla 1. Configuración alélica de los 4 marcadores (FG7cd, D11, FG1cd y FG2cd) en los genotipos analizados en este trabajo. Los números corresponden con el tamaño en pares de bases del alelo presente. Los espacios vacíos indican la ausencia de ese alelo.

Genotipo	FG7cd	marcador D11					FG1cd	FG2cd	Relación con N25.1
Clon Sitio1	255 264 272 315	203 209 212				229	489 501 507	398 406 418 424 437	se sospecha N25.1
N25.1 Sitio 2	255 264 272 315	203 209 212				229	489 501 507	398 406 418 424 437	N25.1
N25.1 INIA	255 264 272 315	203 209 212				229	489 501 507	398 406 418 424 437	clon original
R14.1	255 264 315 328	203 212				229	489 495 507	398 406 418 424 437	hijo de N25.1
Q75.1	255 264 315 328	209 212 215 218				232	489 501 507	406 418 437	hijo de N25.1
Q75.3	255 264 272 328	209 212 215				232	489 501 507 517	418 437	hijo de N25.1
Q80.1	255 264 272 315 328	209 212 215				232	489 501 507 517	398 406 418 424 437	hijo de N25.1
N6.3	255 264 315 328	209 212 215 218				232	489 501 507 517	378 418 437 442	sin relación directa
O6.6	255 264 290 315	203 209 212 215			226	232 489	501 507 517	378 406 418 437 442	sin relación directa
Agata	255 264 315 328	209 215				232 489 495 501 507	378 406 418 437	sin relación directa	
Guapa	255 264 290 315 328	203 209 215				232 489 501 507	378 398 406 418 424 437	sin relación directa	
Yurí	255 264 272 315	209 215				232 489 507 517	378 406 418 424 437	sin relación directa	
Camarosa	255 264 290 315	203 209 212 215				232 489 501 507 517	378 418	presente en pedigree	
Aromas	255 264 272 315	209 212 215			226 229 232	489 495 507 517	378 418 424 437	presente en pedigree	
Oso Grande	255 264 315	209 212 215				232 489 501 507 517	378 406 418	presente en pedigree	
S. Charlie	255 264 272 290	203 209 212 215			226 229 232	489 501 507	378 406 418 424 437	presente en pedigree	
Addie	255 264 272 309	209 212 215 218 220				232 489 495 507	418 437 442	presente en pedigree	

El dendrograma resultante del análisis filogenético se observa en la Figura 1A donde se representan las distancias génicas entre los individuos analizados. En este caso los individuos del clon N25.1 y el clon problema (sitio1) se agrupan. El individuo más próximo a este grupo es R14.1 de acuerdo a lo esperado ya que uno de sus parentales es N25.1. Los marcadores moleculares permitieron discriminar los diferentes genotipos, emparentados y no emparentados, observado configuraciones alélicas diferentes entre ellos.

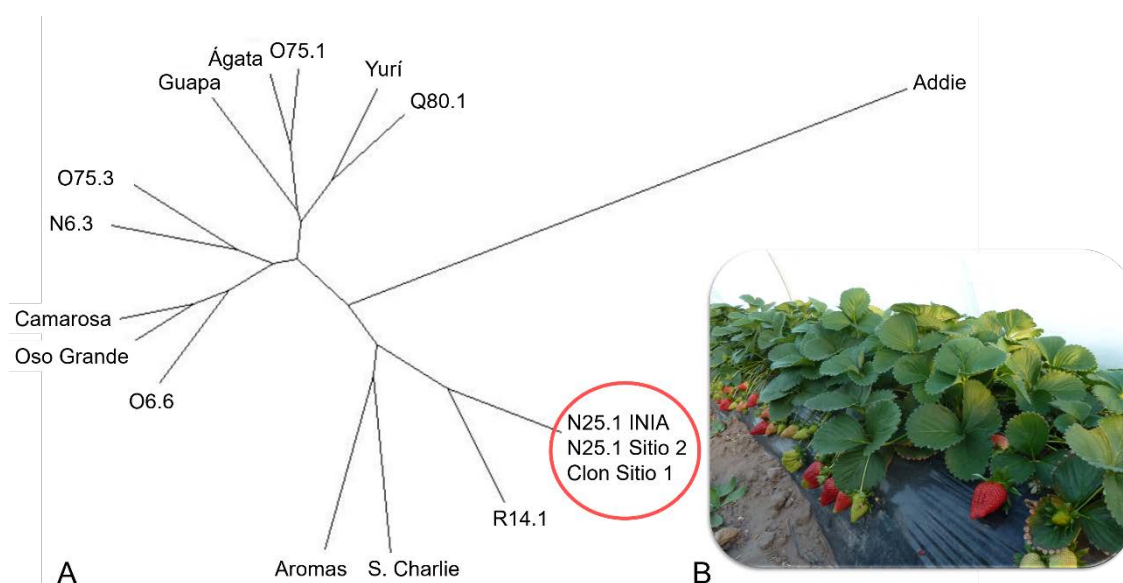


Figura 1. A. Análisis filogenético de los genotipos analizados. B. Planta de N25.1.

En la Figura 1B se pueden apreciar las características de la planta y de la fruta del clon N25.1. El clon se destaca por mostrar tolerancia a diferentes tipos de hongos de corona y raíz, además de excelente calidad de fruta.

### Conclusiones

Los marcadores moleculares permitieron discriminar los diferentes genotipos, emparentados y no emparentados.

Se confirmó que el clon problema del sitio 1 corresponde a N25.1 ya que las configuraciones alélicas de los genotipos clon sitio 1, N25.1 sitio 2 y N25.1 INIA son idénticas.

### Referencias bibliográficas

Nei, M., Li, W. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(10), 5269-5273.

Goldstein, B. D. y C. Schlotterer C. 1999. *Microsatellites evolution and applications*. Oxford University Press, New York, 352pp.

Vicente, E., Manzioni, A., González, M., Giménez, G., Barros, C., Vassallo, M. 2012. La producción de frutilla en salto: investigación, desarrollo e innovación. *Revista INIA*, diciembre 2012.

Vicente, E., Giménez, G., Manzioni, A., Cabot, M. 2004. Avances del programa de mejoramiento genético de frutilla en Uruguay. *Simpósio nacional de morango*. Pelotas. Palestras, Embrapa Clima Temperado, 38-45.

Arruabarrena A., Salvo M., Giambiasi M., Vicente E., Giménez G., Speranza P. 2016. Caracterización genética preliminar del programa de mejoramiento de frutilla de INIA, Uruguay. *XVI Congreso Latinoamericano de Genética*. Montevideo.



## PROSPECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *BACILLUS.SPP* MOVILIZADORES DE FÓSFORO DEL SUELO, PARA EL DESARROLLO DE INOCULANTES MICROBIANOS

Martin N.<sup>1</sup>; Beyhaut E.<sup>2</sup>; Altier N.<sup>1</sup>; Abreo E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Bioproducción, <sup>2</sup> Laboratorio de Microbiología de Suelos

Plataforma de Bioinsumos - INIA Las Brujas – Uruguay

[nmartin@inia.org.uy](mailto:nmartin@inia.org.uy)

Palabras clave: Fósforo, *Bacillus.spp*, soja, biofertilizante.

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

\*Trabajo ya presentado el 27 de Octubre del 2017 en el Simposio “Microorganismo para la Agricultura” en INIA Las Brujas.

## COMPOSICIÓN Y ABUNDANCIA DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS DE CAMPO NATURAL ASOCIADAS AL CONTENIDO Y MECANISMO DE RETENCIÓN DEL FÓSFORO

Silvia Garaycochea<sup>1,2</sup>, Elena Beyhaut<sup>1</sup>, Nora Altier<sup>1</sup>

1. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria
2. Estudiante de Doctorado en Ciencias Agrarias, Facultad de Agronomía, UdelaR

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