

CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO

Informe Científico¹

PERIODO ²: 2015-2016

1. DATOS PERSONALES

APELLIDO: BALATTI

NOMBRES: PEDRO ALBERTO

Dirección electrónica (donde desea recibir información, que no sea "Hotmail"):

pbalatti@gmail.com

2. TEMA DE INVESTIGACION

Bases moleculares de las interacciones planta microorganismos

PALABRAS CLAVE (HASTA 3) Patogenesis Simbiosis Blocontrol

3. DATOS RELATIVOS A INGRESO Y PROMOCIONES EN LA CARRERA

INGRESO: Categoría: Fecha:

ACTUAL: Categoría: desde fecha:

4. INSTITUCION DONDE DESARROLLA LA TAREA

Universidad y/o Centro: Centro de Investigaciones de Fitopatología

*Facultad: Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales -Comision de Investigaciones de la
Provincia de Buenos Ai*

Departamento: Ciencias Biologicas

Cátedra: Fitopatología

Otros:

Dirección: Calle: 60 y 119 N°:

Localidad: La Plata CP: 1900 Tel: 4236758

Cargo que ocupa: Profesor Titular -Investigador Principal

5. DIRECTOR DE TRABAJOS (En el caso que corresponda)

Apellido y Nombres:

Dirección Particular: Calle: N°:

Localidad: CP: Tel:

Dirección electrónica:

¹ Art. 11; Inc. "e"; Ley 9688 (Carrera del Investigador Científico y Tecnológico).

² El informe deberá referenciar a años calendarios completos. Ej.: en el año 2017 deberá informar sobre la actividad del período 1°-01-2015 al 31-12-2016, para las presentaciones bianuales. Para las presentaciones anuales será el año calendario anterior.

Firma del Director (si corresponde)

Firma del Investigador

6. RESUMEN DE LA LABOR QUE DESARROLLA

Descripción para el repositorio institucional. Máximo 150 palabras.

Mi trabajo de investigación tiene como objetivo utilizar a las herramientas moleculares para conocer las interacciones básicas planta microorganismos tanto de aquellas positivas como es la simbiosis rizobio-leguminosa como de interacciones negativas como son las relaciones patógeno hospedante. Mi trabajo en relación con los patógenos tiene como eje dos patologías que socurren con frecuencia en los cultivos de tomate bajo cobertura. Una es el moho de la hoja del tomate enfermedad provocada por *Cladosporium fulvum* y la otra es la mancha gris de la hoja del tomate que tiene como agente causal a *Stemphylium lycopersici*. En el caso de *Cladosporium* estudio las poblaciones del hongo con el fin de determinar la presencia de razas utilizando como herramienta a los genes de avirulencia. Si bien las razas por el momento parecerían ser solo dos, he detectado polimorfismos de los genes de avirulencia. En lo que hace a *Stemphylium* también he estudiado la población del hongo y hemos encontrado en primer lugar que todos son *S. lycopersici* y por otro lado que los aislados difieren en su virulencia. Estoy haciendo genómica comparativa de los aislados de *Stemphylium* que difieren en su virulencia y esporulación y transcritómica, con el fin de detectar los genes claves en la patogénesis. Por otro lado estamos trabajando en el análisis de los endofitos de tomate que hemos encontrado vienen en la semilla y estamos analizando si podemos introducirlos en plantas de tomate. Además estudio su capacidad para biocontrolar patógenos o promover el crecimiento de las plantas. Por otro lado continuo estudiando la simbiosis rizobio soja en particular con aislados de suelos con historia del cultivo de la soja que se destacan por su capacidad de fijación de nitrógeno.

7. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO.

Debe exponerse, en no más de una página, la orientación impuesta a los trabajos, técnicas y métodos empleados, principales resultados obtenidos y dificultades encontradas en el plano científico y material. Si corresponde, explicita la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.

Exposición sintética de la labor realizada

En primer lugar continuamos con los estudios de la simbiosis rizobio soja, estos estudios fueron llevados a cabo por la Dra Silvina López y la Dra Graciela Pastorino. Silvina prosiguió y terminó su plan de tesis como resultado de estos trabajos identificamos aislados de rizobios de suelo naturalizados con una alta capacidad de fijación de nitrógeno que no presentaron polimorfismos en las fragmentos del genoma que codifican las proteínas en el proceso regulatorio y estructural de la fijación de nitrógeno. Aun así se detectaron un par de simbiontes que se destacaron porque superaron a la cepa control que es la cepa comercial E109. Una de esas cepas se encontró que fija más nitrógeno porque presenta una actividad importante de ACC deaminasa y de esa manera retrasa la senescencia de los nódulos y por eso en un ciclo de cultivo la planta fija más nitrógeno. Graciela Pastorino también concluyó sus estudios de doctorado bajo mi dirección y encontró que la variabilidad de los rizobios no fue sustancialmente distinta en los suelos bajo labranza convencional y labranza mínima. Por otro lado esos suelos albergaron mayoritariamente cepas de *B. japonicum*, algunas *B. elknaii* y una de la especie *B. diazoefficiens*, que de alguna manera reflejan el ingreso de cepas con los inoculantes comerciales. Las cepas nativas aisladas difirieron en su capacidad de formar biofilm, sobrevivencia sobre la semilla y producción de regulares vegetales. En cuanto a los patógenos de tomate hemos encontrado que si bien hasta el momento solo he detectado la presencia de dos razas de *Cladosporium fulvum* pero el análisis de las secuencias de los genes de avirulencia demostraron que las poblaciones de este hongo están sufriendo cambios genéticos que podrían devenir en un futuro próximo en la aparición de nuevas razas. En lo que hace a *Stemphylium lycopersici* hemos realizado un importante número de aislamientos (70) hemos realizado un análisis genético y determinado que todos son representantes de *Stemphylium lycopersici* lo que confirma que en la Argentina la mancha gris de la hoja del tomate es

provocada solo por esta especie de *Stemphylium*. Se secuenció el genoma del hongo y una vez recibidos los contigs se procedió a ensamblar el ADN así se dispuso del tamaño total y se predijeron la cantidad y función de los genes encontrados. En este sentido hemos sido el primer laboratorio en disponer de la secuencia de este patógeno a nivel mundial y en estos momentos estamos secuenciando otros genomas de la misma especie para realizar genómica comparativa.

Para llevar adelante estos trabajos hemos utilizado técnicas convencionales de cultivo de hongos y bacterias. La identificación a nivel morfológica se realizó con observaciones del material que se realizaron en lupas y microscopios. En cuanto al trabajo molecular se realizaron las extracciones de ADN, limpieza del material genético y amplificación de genes específicos. En cuanto a la secuenciación esta se realizó en MacroGen Korea adonde enviamos ADN puro para su secuenciación. El procesamiento de la información se realizó en una computadora adquirida para tal fin con software público.

Los inconvenientes encontrados son fundamentalmente la falta de apoyatura de la facultad que carece de buenos invernáculos, carecemos de mantenimiento mínimo de nuestros espacios. No hay tampoco un buen sistema de limpieza y todo esto comoloca nuestro trabajo.

8. TRABAJOS DE INVESTIGACION REALIZADOS O PUBLICADOS EN ESTE PERIODO.

8.1 PUBLICACIONES. *Debe hacer referencia exclusivamente a aquellas publicaciones en las que haya hecho explícita mención de su calidad de Investigador de la CIC (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Toda publicación donde no figure dicha mención no debe ser adjuntada porque no será tomada en consideración. A cada publicación, asignarle un número e indicar el nombre de los autores en el mismo orden que figuran en ella, lugar donde fue publicada, volumen, página y año. A continuación, transcribir el resumen (abstract) tal como aparece en la publicación. La copia en papel de cada publicación se presentará por separado. Para cada publicación, el investigador deberá, además, aclarar el tipo o grado de participación que le cupo en el desarrollo del trabajo y, para aquellas en las que considere que ha hecho una contribución de importancia, deberá escribir una breve justificación. Asimismo, para cada publicación deberá indicar si se encuentra depositada en el repositorio institucional CIC-Digital.*

1. Ensifer fredii strain S40 and Bradyrhizobium japonicum E109 infect soybean with a different efficiency and differ in their competitive ability. Pastorino G.N1., Martinez Alcántara V.1, Videira L.1, Sarinelli J.1, Malbrán I.2 and P.A. Balatti

Aims: The purpose of this work was to compare the efficiency of Bradyrhizobium japonicum and Ensifer fredii to infect and develop nodules on soybean. Furthermore we also evaluated the competitive ability of both species and how this was altered by the plant genotype and the soil pH. Study Design: The design of the experiments was completely at random and the number of replicates was different on each of the different experiments tested. Place and Duration of Study: The place of the studies was the Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales Universidad Nacional de La Plata and the duration of the study was a year and a half. Methodology: Roots of inoculated soybean plants were fixed and the number of infection initiation sites was evaluated by means of microscopic observation. The number of nodules developed by inoculated plants was also evaluated. Results: Bacteria were equally effective at developing infection initiation sites on soybean however, E. fredii induced more nodules than B. japonicum, probably due to the fact that E. fredii is more efficient than B. japonicum at nodulating soybean. However, Bradyrhizobium was more competitive than E. fredii which was unrelated to the soybean genotype but altered by the soil pH. Under the conditions described E. fredii was less competitive than B. japonicum probably due to the high cultivar-rhizobia specificity. Conclusion: E. fredii was as efficient as B. japonicum at nodulating soybeans. However Bradyrhizobium was a better competitor though this is affected by the plant genotype and the soil

pH. The selection and use of fast growing rhizobia in inoculant production seems to depend on broadening the genetic base of soybean or in selecting cultivars with specificity for fast growing rhizobia.

2. A Survey on Occurrence of *Cladosporium fulvum* Identifies Race 0 and Race 2 in Tomato-Growing Areas of Argentina. Medina R., S. M. Y. López, M. E. E. Franco, C. Rollan, L. Ronco, M. C. N. Saparrat, P. J. G. M. De Wit, P. A. Balatti. *Plant Disease* December 2015, Volume 99, Number 12 Pages 1732-1737 <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-12-14-1270>

The presence of *Cladosporium fulvum* (syn. *Passalora fulva*), causal agent of tomato leaf mold, was confirmed in the two main greenhouse-production areas for tomato in Argentina. Using both morphological characters and internal transcribed spacer sequencing, we confirmed the presence of physiological races of this pathogen. A diagnostic multiplex polymerase chain reaction (PCR) was also developed, using primers derived from *C. fulvum* avirulence (Avr) genes. In all, 20 isolates of *Cladosporium* spp. were obtained as monospore cultures and 12 were identified as *C. fulvum*. By this method, we showed that, of these 12 isolates, 5 were race 0 (carrying functional Avr2, Avr4, Avr4E, and Avr9 genes) and 7 were race 2 (lacking the Avr2 gene). Race identity was confirmed by testing their virulence on a set of tomato differentials carrying different Cf resistance genes. All Avr genes could be amplified in single or multiplex PCR using DNA isolated from in vitro grown monospore cultures but only three Avr could be amplified when genomic DNA was isolated from *C. fulvum*-infected necrotic leaf tissue.

3. First report of a resistance-breaking isolate of Tomato spotted wilt virus infecting sweet pepper harboring the Tsw gene in Argentina". L.Ferrand, M. L. García, R.O. Resende, P. A. Balatti, E. Dal Bó. (2015). *Plant disease* <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-02-15-0207-PDN>.

The disease caused by Tomato spotted wilt virus (TSWV) is endemic on vegetable crops in the Buenos Aires green belt, the most important vegetable-production area in Argentina (18,000 ha). Approximately half of the greenhouse surface planted with sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) in the country is located in La Plata (Buenos Aires). In this area, TSWV had limited sweet pepper production until the introduction of resistant genotypes harboring the Tsw resistance gene that replaced 100% of the susceptible cultivars. However, in November 2013, resistant peppers showing typical Tospovirus symptoms were observed in La Plata. Symptoms appeared 20 days after transplanting in early spring, and by midsummer 100% of the plants were affected in many greenhouses, causing important economic losses in this season. Samples from symptomatic plants were analyzed by ELISA with antisera against the viruses: TSWV, Groundnut ringspot virus (GRSV), Tomato chlorotic spot virus (TCSV), Potato virus Y (PVY), Cucumber mosaic virus (CMV), and Tobacco mosaic virus (TMV). All samples were positive only for TSWV. Presence of TSWV was confirmed by RT-PCR with primers designed from a conserved sequence of the N gene that amplified a fragment of about 450 bp. Further, RFLP using BstNI and HinCII enzymes that cut the 450-bp fragment specifically (Dewey et al. 1996) showed the typical restriction pattern of TSWV. To test the ability to overcome the resistance, this greenhouse-isolate, named TSWV-A2, was mechanically transmitted to two commercial pepper cultivars carrying the Tsw gene, cvs. Almuden and Platero (10 plants each). After two weeks, all plants were systemically infected, showing the typical symptoms of TSWV infection. RT-PCR (as previously described) from total RNA extracted from symptomatic leaves of these plants confirmed the presence of TSWV-A2. Therefore, we demonstrated that TSWV-A2 is able to overcome Tsw gene resistance. Furthermore, to amplify the complete N gene of TSWV-A2 isolate, a new RT-PCR was carried out (Lovato et al. 2008). A specific 800-bp product was cloned and sequenced (GenBank Accession No. KP719131). BLAST analysis showed that the sequence was 99% homologous at the nucleotide

as well as the amino acid sequence to the N gene of isolates EF195230 and EF195224 from South Korea (Kim et al. 2004). In addition, TSWV-A2 shared common characteristics with the resistant-breaking isolates infecting sweet pepper cultivars carrying the Tsw gene, previously reported in Italy (Roggero et al. 2002) and Spain (Margarita et al. 2004). Overall, based on biological, serological, and molecular features, this is the first report of a local isolate of TSWV breaking the Tsw-resistance in sweet pepper in Argentina.

5. Applying Ligninolytic Fungi on *Eucalyptus grandis* Wood for Pulping Pretreatment or Fractionation María C. Inalbona*, Paulina Mocchiutti, Miguel A. Zanuttini, Pedro A. Balatti Mario Rajchenberge and Mario C. N. Saparrat *Procedia Materials Science* 8 (2015) 1099 – 1107

The effects of three different fungal treatments on several technology characteristics of *Eucalyptus grandis* wood, were studied on industrial chips and blocks. The percentage of the substrate mass loss by the fungal treatment, and the relative amount of extractives and lignin were determined. The effective capillarity of wood, pH and total reducing sugars concentration in watersoluble fraction (WSF) were also determined. There was a reduced mass loss of the substrate by the fungal treatment (less than 3%). *Gelatoporia subvermispora* FBCC 313 showed the highest reduction in the Klason lignin content, the highest endoglucanase activity on the WSF as well as the highest ability to increase the effectively capillarity in the radial wood direction. This last effect is interesting since it might facilitate the wood impregnation processes and therefore to reduce the consumption of reagents in industrial treatments.

6. Response of the fungus *Pseudocercospora griseola* f. *mesoamericana* to Tricyclazole Alejandra Bárcena Gabriela Petroselli , Silvia M. Velasquez , José M. Estévez, Rosa Erra-Balsells , Pedro A. Balatti Mario C. N. Saparrat *Mycological Progress* 14:76

Abstract *Pseudocercospora griseola*, an anamorph of *Mycosphaerella*, causes Angular Leaf Spot (ALS). The mycelia and conidia from *P. griseola* are coloured due to the synthesis of 1,8 dihydroxynaphthalene (DHN)- melanin. The aim of this work was to identify in *P. griseola* f. *mesoamericana* isolate T4 intermediary compounds as a result of the inhibition of melanin synthesis by tricyclazole and to analyze at the structural level the localization of these dark pigments. The main metabolites were analyzed using ultraviolet matrix assisted laser desorption-ionization mass spectrometry (UV-MALDI MS). Tricyclazole affected *P. griseola* f. *mesoamericana* in several different ways. The most evident effect was the reduction of melanin synthesis and therefore diffusible shunt products were found and identified. Flaviolin was the main intermediate metabolite found in cultures supplemented with tricyclazole. This inhibitor, which affected pigmentation and the cell wall structure of mycelium, revealed macroscopically by the reduction in growth, decreased the stratification and deposition of melanin in the hyphal wall. These results suggest a possible role of tricyclazole to control ALS.

7. Draft Genome Sequence and Gene Annotation of *Stemphylium lycopersici* Strain CIDEFI-216 Mario E. E. Francoa, Silvina Lópezb, Rocio Medinac, Mario C. N. Saparratb,d,e & Pedro Balattia,e. *Genome Announc.* 2015 Sep 24;3(5). pii: e01069-15. doi: 10.1128/genomeA.01069-15.

Abstract

Stemphylium lycopersici is a plant-pathogenic fungus that is widely distributed throughout the world. In tomatoes, it is one of the etiological agents of gray leaf spot disease. Here, we report the first draft genome sequence of *S. lycopersici*, including its gene structure and functional annotation.

8. Antagonism of entomopathogenic fungi by *Bacillus* spp. associated with the integument of cicadellids and delphacids. Toledo, A., López, S., Aulicino, M., Remes Lenicov de, A.M., Balatti, P. 2015 International Microbiology 18 (2), 91-97.

Abstract

Cicadellids and delphacids are considered serious pests of agricultural crops due to their ability to transmit plant pathogens and to cause mechanical damage to plants during feeding and oviposition. Entomopathogenic fungi have considerable potential for control of these insects since these microorganisms invade their hosts through the integument. However, fungi occasionally fail to penetrate the host, not only due to the presence of antimicrobial substances associated with the insect cuticle, but also to the presence of microorganisms on the cuticle that can inhibit the fungal growth by mean of an antibiosis relationship. In view of the impact of entomopathogenic fungi on biological control of insect pests worldwide, the objectives of the present work were to characterize 10 strains of *Bacillus* isolated from the integument of Cicadellids and Delphacids by means of molecular studies, and to identify and select isolates of *B. bassiana* and *M. anisopliae* resistant to the antagonistic activity exerted by *Bacillus* species. Antagonistic activity of 10 strains of *Bacillus* sp., *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus* and *B. subtilis* against 41 isolates of *B. bassiana* and 20 isolates of *M. anisopliae* were investigated in vitro on tryptic soy agar by mean of the central disk test. A factorial analysis of the results obtained showed that the antagonism exerted by *Bacillus* species against fungal isolates was different. As a result of these we identified isolates of *B. bassiana* and *M. anisopliae* resistant to antagonistic bacteria which might be resources for the formulation of products for biocontrol.

9. Bacteriomes of the corn leafhopper *Dalbulus maidis* ((DeLong and Wollkot 1923) Insecta Hemiptera, Cicadellidae, Delthocefalinae) harbor *Sulcia* symbiont: molecular characterization, ultrastructure and transovarial transmission Brentassi ME1,2, Franco E3, Balatti Pedro, Medina R4, Bernabei F3, Marino de Remes Lenicov AM Protooplasma 2016 Oct 11 PMID:27730310 DOI: 10.1007/s00709-016-1033-4

Abstract

In this study we surveyed bacteriome-associated microbiota of the corn leafhopper, *Dalbulus maidis* by means of histological, ultrastructural and molecular analyses. Amplification and sequencing of 16S rDNA genes revealed that the endosymbiont 'Candidatus *Sulcia muelleri*' (Phylum Bacteroidetes) resides in bacteriomes of *D. maidis*. The phylogenetic analysis showed that the sequence of *Sulcia* of *Dalbulus maidis* was closely allied to other found in representatives of the subfamily Deltocephalinae. By a metagenomic approach we investigated the possible presence of others bacterium that could be harbored in the bacteriomes of *D. maidis* and we found that the sequence of *Sulcia* accounted 98.56% of all the sequences and the remaining corresponded to contaminating organisms. Histological and ultrastructural observation showed that microorganisms harbored in the bacteriomes (central syncytium and cytoplasm of uninucleate bacteriocytes) look like others *Sulcia* described in hemipterans species: they are large and electron-dense pleomorphic bacteria and they were transovarially transmitted from one generation to the next which is typical of obligate endosymbionts. The only presence of *Sulcia* in the bacteriomes of *D. maidis* was discussed.

10. Comparison of the efficiency of 5 methods for fungal DNA extraction from crop debris and evaluation of its suitability for the amplification of *Fusarium graminearum* by PCR. Mourellos, CA; Malbrán, I; Mengual Gómez, D.; Balatti, PA; Ghiringhelli, PD; Lori, GA. 2016. Crop Protection 82: 7-9

LARRAN S., VERA BAHIMA J., G DAL BELLO, E. FRANCO AND P. A. BALATTI. *Colletotrichum siamense* causing anthracnose in *Bauhinia forficata* subsp. *pruinosa*

in Argentina. Australasian Plant Disease Note.: Springer. 2015 vol. n°. p - . issn 1833-928X.

Abstract *Bauhinia forficata* subsp. *pruinosa* is a common perennial tree species native to South America that belongs to the Fabaceae. In December 2010 and 2011, plants from a nursery located in the province of Buenos Aires, Argentina presented typical symptoms of anthracnose. We isolated from the lesions of diseased leaves a fungus that based on morphological as well as the ITS (KC132841) and β -tubulin sequences (KJ829534) was identified as *Colletotrichum siamense*. After 12 days leaves inoculated with the fungal spore suspension developed lesions similar to those observed in natural infections. The fungus was then re-isolated fulfilling Koch's Postulates. To our knowledge, this is the first report of *Colletotrichum siamense* causing anthracnose in *Bauhinia forficata* subsp. *pruinosa* in Argentina.

G. DAL BELLO & E. FRANCO & S. LARRÁN & P. BALATTI. First report of *Alternaria alternata* causing black spot on pink lapacho (*Handroanthus impetiginosus*). Australasian Plant Disease Notes.: Springer. 2015 vol. n°. p - . issn 1833-928X.

Abstract A severe leaf spot disease was observed on pink lapacho trees, *Handroanthus impetiginosus* for the first time in Buenos Aires province, Argentina during the autumn of 2013. The pathogen was identified as *Alternaria alternata* based on the morphological characteristics and sequence data from the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA, and partial β -tubulin sequence. A pathogenicity test was performed and Koch's postulates were confirmed by re-isolating the fungus from artificially inoculated leaves. This is the first report of *Alternaria* black spot of *Handroanthus impetiginosus* trees.

8.2 TRABAJOS EN PRENSA Y/O ACEPTADOS PARA SU PUBLICACIÓN. *Debe hacer referencia exclusivamente a aquellos trabajos en los que haya hecho explícita mención de su calidad de Investigador de la CIC (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Todo trabajo donde no figure dicha mención no debe ser adjuntado porque no será tomado en consideración. A cada trabajo, asignarle un número e indicar el nombre de los autores en el mismo orden en que figurarán en la publicación y el lugar donde será publicado. A continuación, transcribir el resumen (abstract) tal como aparecerá en la publicación. La versión completa de cada trabajo se presentará en papel, por separado, juntamente con la constancia de aceptación. En cada trabajo, el investigador deberá aclarar el tipo o grado de participación que le cupo en el desarrollo del mismo y, para aquellos en los que considere que ha hecho una contribución de importancia, deberá escribir una breve justificación.*

8.3 TRABAJOS ENVIADOS Y AUN NO ACEPTADOS PARA SU PUBLICACION. *Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo, indicando el lugar al que han sido enviados. Adjuntar copia de los manuscritos.*

ANDREA TOLEDO, , MARIO E.E. FRANCO, SILVINA M.Y. LOPEZ, MARIA INES TRONCOZO, MARIO CN SAPARRAT Y P. A. BALATTI. Melanins in Fungi: types, localization and putative biological roles. PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR PLANT PATHOLOGY. Manchester: ACADEMIC PRESS LTD-ELSEVIER SCIENCE LTD.

Abstract

Melanin is a secondary metabolite made up by complex heterogeneous polymers. Several classes of fungal melanins have been described like γ -glutaminyl-3,4-dihydroxy-benzene (GDHB)-, L-DOPA-(eumelanin), DHN-, catechol-melanin, pyromelanin, p-aminophenol (PAP)-melanin, heterogeneous melanins as well as two others based on 5-deoxybostrycoidin and aspulvinone E. They have been mostly localized in cell walls of different structures of fungi, which suggest that they play a different biological role. They have been related mostly with morphogenesis, stress

resistance, virulence and energy transduction. However, an enormous amount of work remains to be done to clarify, among other things, the role melanins play in fungi.

MARIO E.E. FRANCO, MARIA INES TRONCOZO, SILVINA M.Y. LOPEZ, ROCIO GUSTAVO LUCENTINO, ROCIO MEDINA, BLANCA LIA RONCO, MARIO SAPARRAT Y P.A. BALATTI. A survey on tomato leaf grey spot in the two main production areas of Argentina led to the isolation of *S. lycopersici* representatives, which were genetically diverse and differ in virulence.. EUROPEAN JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY. Berlin: SPRINGER.

Abstract

Tomato gray leaf spot was first reported in Argentina in 1990. Since then, the disease has not only increased in endemic areas, but also disseminated in other tomato-growing areas. In a survey of plants with typical symptoms of Tomato grey leaf spot disease we isolated 27 *Stemphylium* representatives from the two main tomato-growing areas of Argentina. Cultural features such as sporulation, conidia morphometry among others revealed high variability between isolates, which was confirmed by Inter simple sequence repeat (ISSR)-PCR technique. A molecular phylogenetic analysis comprising the Internal Transcribed Spacer (ITS) and the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gpd) gene partial sequences unambiguously identified all isolates as *Stemphylium lycopersici*. Based on disease severity on detached leaves, isolates were grouped in three categories high, medium and low virulent one. No correlation was found between phenotypic and genotypic characters and the geographical origin of the isolates..

8.4 TRABAJOS TERMINADOS Y AUN NO ENVIADOS PARA SU PUBLICACION.

Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo.

Nodulation capacity of soybean (*Glycine max* L. Merr) cultivars inoculated with commercial strains of *Bradyrhizobium japonicum*

The purpose of this research was to evaluate the nodulation potential of 30 Argentinean soybean commercial cultivars (Nidera Semillas), being the most important aim the identification of cultivars with high nodulation and therefore nitrogen fixation potential. Among 31 soybean commercial cultivars those with the highest nodulation capacity response developed twice the amount of nodules than the low nodulating ones suggesting this that variation is related to soybean genotypes. This was independent of the *bradyrhizobia* strain inoculated. The ability of cultivars to develop a larger number and biomass of nodules was unrelated with the maturity group they belong to and also was not a quorum sensing related response. Even though the environment influenced the bacterial plant interaction, differences between cultivars remained the same. Our results suggest that breeding programs can be aimed at improving the nodulation capacity of soybean and those cultivars from different maturity groups can be a source of nodulation QTLs. Cultivars with high nodulation capacity will potentially fix more nitrogen provided that the nodules were mostly induced by the efficient strain.

A survey on tomato leaf grey spot in the two main production areas of Argentina led to the isolation of *S. lycopersici* representatives, which were genetically diverse and differ in virulence.

Tomato gray leaf spot was first reported in Argentina in 1990. Since then, the disease has not only increased in endemic areas, but also disseminated in other tomato-growing areas. In a survey of plants with typical symptoms of Tomato grey leaf spot disease we isolated 27 *Stemphylium* representatives from the two main tomato-growing areas of Argentina. Cultural features such as sporulation, conidia morphometry among others revealed high variability between isolates, which was confirmed by Inter simple sequence repeat (ISSR)-PCR

technique A molecular phylogenetic analysis comprising the Internal Transcribed Spacer (ITS) and the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gpd) gene partial sequences unambiguously identified all isolates as *Stemphylium lycopersici*. Based on disease severity on detached leaves, isolates were grouped in three categories high, medium and low virulent one. No correlation was found between phenotypic or genotypic characters and the geographical origin of the isolates..

Nodulation and delayed nodule senescence, two strategies of *Bradyrhizobium japonicum* isolates with high capacity to fix nitrogen

The purpose of this work was to evaluate the nodulation and nitrogen fixing capacity of two isolates, collected from fields that have been cultivated with soybean for many years, proved to be highly efficient in fixing nitrogen. We evaluated and compared the nodulation and nitrogen fixing capacity and the level of expression of regulatory as well as structural genes of nitrogen fixation and the ACC deaminase gene. We found that isolate *Bradyrhizobium japonicum* 163 and 366 were highly efficient to fix nitrogen. While isolate 366 develop a higher number of nitrogen fixing nodules, isolate 163 developed nodules that remained actively fixing nodules probably because the highly level of ACC deaminase reduce ethylene, retarding in this way senescence, which was confirmed by the higher levels of leghemoglobin and lower levels of ammonia found in nodules induced by isolate 163 than in nodules induced by isolate 366 and control strain E109.

8.5 COMUNICACIONES. *Incluir únicamente un listado y acompañar copia en papel de cada una. (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores).*

8.6 INFORMES Y MEMORIAS TECNICAS. *Incluir un listado y acompañar copia en papel de cada uno o referencia de la labor y del lugar de consulta cuando corresponda. Indicar en cada caso si se encuentra depositado en el repositorio institucional CIC-Digital.*

9. TRABAJOS DE DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS.

9.1 DESARROLLOS TECNOLÓGICOS. *Describir la naturaleza de la innovación o mejora alcanzada, si se trata de una innovación a nivel regional, nacional o internacional, con qué financiamiento se ha realizado, su utilización potencial o actual por parte de empresas u otras entidades, incidencia en el mercado y niveles de facturación del respectivo producto o servicio y toda otra información conducente a demostrar la relevancia de la tecnología desarrollada.*

9.2 PATENTES O EQUIVALENTES *Indicar los datos del registro, si han sido vendidos o licenciados los derechos y todo otro dato que permita evaluar su relevancia.*

9.3 PROYECTOS POTENCIALMENTE TRANSFERIBLES, NO CONCLUIDOS Y QUE ESTAN EN DESARROLLO. *Describir objetivos perseguidos, breve reseña de la labor realizada y grado de avance. Detallar instituciones, empresas y/o organismos solicitantes.*

9.4 OTRAS ACTIVIDADES TECNOLÓGICAS CUYOS RESULTADOS NO SEAN PUBLICABLES *(desarrollo de equipamientos, montajes de laboratorios, etc.).*

9.5 Sugiera nombres (e informe las direcciones) de las personas de la actividad privada y/o pública que conocen su trabajo y que pueden opinar sobre la relevancia y el impacto económico y/o social de la/s tecnología/s desarrollada/s.

10. SERVICIOS TECNOLÓGICOS. Indicar qué tipo de servicios ha realizado, el grado de complejidad de los mismos, qué porcentaje aproximado de su tiempo le demandan y los montos de facturación.

11. PUBLICACIONES Y DESARROLLOS EN:

11.1 DOCENCIA

Se ha trabajado en la mejora de los materiales destinados a las actividades prácticas de las asignaturas Microbiología Agrícola y Fitopatología
Además se ha desarrollado materiales para el Taller de Semillas actividad extracurricular

11.2 DIVULGACIÓN

Entrevistas de radio para la difusión de actividades del Centro de Investigaciones

En cada caso indicar si se encuentran depositados en el repositorio institucional CIC-Digital.

12. DIRECCION DE BECARIOS Y/O INVESTIGADORES. Indicar nombres de los dirigidos, Instituciones de dependencia, temas de investigación y períodos.

Dirección de Investigadores

Director: Dr. Pedro Alberto Balatti. Codirector: Dra. Ana María Marino de Remes Lenicov. De Investigador Asistente Dra Andrea Toledo Ingreso: 01 de abril de 2009. Institución: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Tema: "Hongos patógenos como factores de mortalidad de insectos vectores de enfermedades al maíz (Hemiptera: Auchenorrhyncha). Detección de mecanismos antagonistas". Resoluciones: N° 205/09 de fecha 23/03/2009. Ingreso: 01 de abril de 2009

. Director Gladys Lori Codirector Pedro Balatti Investigador Asistente Dr. Ismael Malbrán. Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) para trabajar en aspectos moleculares de la Fusariosis de la Espiga

Dirección de Becarios

. Director de Beca postdoctoral FONCYT en el marco del proyecto PICT2012-2760 Tema Mancha gris de la hoja del tomate: Bases biológicas y moleculares de la interacción planta (*Lycopersicon esculentum* Mill) - patógeno (*Stemphylium*)"abril 2013 a 31 de Marzo 2017

. Codirector de la Lic. María Inés Troncozo, Carrera del Doctorado de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata. Proyecto de tesis presentado a la respectiva Comisión de postgrado de la Facultad. Categoría CONEAU A. Tema: "Transformación fúngica de residuos del vino de la costa de Berisso" (en realización). Becaria de la Universidad Nacional de La Plata

. Director de Beca Postdoctoral CONICET de Silvina Marianela Yanil Lopez Tema Endófitos antagonistas de patógenos del tomate [*Solanum lycopersicum* L.]: Población fuente de inóculo, sitio y modo de ingreso e infección. 1/4/2016 a 31/3/2018.

. Director de beca de Gustavo Lucentino Tema: Los Polimorfismos en los avr de *Cladosporium fulvum* afectan la virulencia y el control de la cladosporiosis con la resistencia sistémica inducida y adquirida". 1/04/2016 al 31/03/2018

13. DIRECCION DE TESIS. Indicar nombres de los dirigidos y temas desarrollados y aclarar si las tesis son de maestría o de doctorado y si están en ejecución o han sido defendidas; en este último caso citar fecha.

•Tesis de Maestría

Codirector de Tesis para optar al grado de Magister Ciencia Ariel Barbieri Tema Comportamiento de cultivares de soja frente a la Mancha Marron de la hoja causada por Septoria glycines. 1 de Septiembre de 2015 Sobresaliente diez

Tesis de Doctorado

- Director de Tesis para optar al grado de Dr. Del Lic. Dario Salvucci Tema Loci de Caracteres cuantitativos (QTLs) de la soja (*Glycine max* L. Merr) asociados a su capacidad de nodular y fijar nitrógeno Facultad de Ciencias Exactas y Naturales UBA Sobresaliente 10 (diez) 26 de Junio de 2015

- Director de Tesis de Graciela N. Pastorino para optar al grado de Dr. en Ciencias Biológicas Tema Diversidad de los rizobios que nodulan la soja en los suelos e identificación de inoculantes comerciales. Facultad de Ciencias Naturales y Museo- Universidad Nacional de La Plata (Expte 05270/2006) Fecha de Ingreso 28/8-2006. Fecha de alta 16-11-2007. Fnalizada Sobresaliente 10 (diez) Octubre 5 de Octubre de 2016.

- Director de Tesis de Silvina Lopez para optar al grado de Dr. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata Tema Mutantes de *Bradyrhizobium japonicum* y *Bradyrhizobium elkanii* que difieren en su capacidad de fijar nitrógeno, tienen alteraciones estructurales y/o regulatorias en los genes de nodulación y/o fijación de nitrógeno." Sobresaliente 10 (diez) 18 de Marzo de 2016

- Codirector de Tesis de la Dra Adriana Alippi Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales Tema Evaluacion de la variación fenotípica y genotípica de cepas de *Paenibacillus larvae* patógenas de abejas melíferas e investigación de los mecanismos moleculares de la resistencia a Tetraciclina Marzo 2015. Sobresaliente (10) diez

- Codirector de Tesis de Marcela Ruscitti para optar al grado de Dr. Facultad de Ciencias Exactas Universidad Nacional de La Plata "La micorrización modifica la respuesta de las plantas de pimiento en presencia de cobre en el suelo En ejecucion

. Director de Tesis de Doctor de Gustavo Lucentino Tema Los polimorfismos en los avr de *cladosporium fulvum* afectan la virulencia y el control de la cladosporiosis con la resistencia sistémica inducida y adquirida. Codirector Mario Saparrat. En ejecucion

14. PARTICIPACION EN REUNIONES CIENTIFICAS. *Indicar la denominación, lugar y fecha de realización, tipo de participación que le cupo, títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas y autores de los mismos.*

IV Jornadas de enfermedades y plagas de cultivo bajo cubierta.

Actividad enzimática de Lipoxigenasas y Peroxidasas y su relación con la severidad en plantas con infección natural de *Passalora fulva* Silvina Lopez, Rocio Median, Ernesto Franco, Mario Saparrat y Pedro A. Balatti.

El arsenal defensivo de las plantas incluye entre otras cosas una resistencia hospedante no específica, la resistencia gen a gen, tolerancia a patógenos que está determinada por QTLs. Además en la planta existen sistemas que se inducen por la presencia de patógenos biotróficos como la Resistencia Sistémica Adquirida (RSA) y la Resistencia Sistémica inducida (RSI) que es activada por los patógenos necrotrofos. Los microorganismos biocontroladores son agentes que activan algunos sistemas de la planta y de esta manera reducen el impacto de los patógenos. Es decir que ellos reprograman la expresión de genes en las plantas, generando la síntesis de vías enzimáticas que se encuentran asociadas a los mecanismos de defensa de la planta.

Así plantas tratadas con Bion o ácido. Salicílico responden aumentando la síntesis de proteínas PR como la peroxidasa. Por otro lado las bacterias saprófitas como *Bacillus megaterium* activan la RSI que se refleja en el aumento de actividad de la enzima LOX involucrada en la dioxigenación de lípidos. Esta activación va acompañada de la síntesis de ácido Jasmónico y de Etileno. El objetivo de este trabajo fue describir la actividad de Lipoxigenasas (LOX) y Peroxidasas (POX) en plantas infectadas con *Cladosporium fulvum*. El ensayo consistió en la aplicación de microorganismos biocontroladores en plantas de tomate cultivadas en tres bloques de invernáculo. Luego de 3 y 7 días de aplicados los productos se tomaron muestras de material vegetal, a partir del cual se realizaron extractos para la determinación de dos actividades enzimáticas: Peroxida (POX) y Lipoxigenasa (LOX). Además se determinaron índices de incidencia y severidad en base a la presencia de signos de Cladosporiosis sobre las plantas tratadas. Los resultados mostraron que el bloque con mayor incidencia de Cladosporiosis en las plantas, se correspondió con plantas con menor actividad enzimática LOX y POX

Annual Meeting of the American Phytopathological Society Pasadena California USA
1-5 de Agosto 2015

Cultural, Morphological and Molecular Diversity Among *Stemphylium lycopersici* Isolates Causing Tomato Gray Leaf Spot in Argentina

Mario Emilio Ernesto Franco¹, José Vera Bahima¹, Lia Ronco¹, Mario Carlos Nazareno Saparrat^{2, 3} & Pedro Alberto Balatti¹.

1. Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI), Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP. La Plata, Buenos Aires, Argentina.

2. Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE), UNLP-CONICET. La Plata, Buenos Aires, Argentina.

3. Instituto Carlos Spegazzini, Facultad de Ciencias Naturales y Museo. La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Twenty eight *Stemphylium lycopersici* strains were isolated from a similar number of tomato plants growing in several regions of Argentina with typical symptoms of gray leaf spot disease between 2010 and 2013. Cultural and morphological characteristics were studied on both homemade and commercial Potato Dextrose Agar (PDA) after culturing them for 7 days at 25 °C in the dark. Features such as growth rate, colony color, elevation, margin, zonation, media pigmentation and sporulation were examined. Furthermore, fifty mature conidia from each isolate were measured at x100 magnification and their morphology was assessed. Also variability was analyzed by using six inter-simple sequence repeat markers (ISSR-PCR). High levels of variability were observed at cultural and morphological characteristics. Using genomic fingerprints isolates were clustered at similarity coefficient values between 0.83 and 1.00 and no relationship was found between phenotypic and genotypic characters as well as the place of origin. The high rate of cultural and morphological variability as well as their sensitivity to environmental conditions, suggesting that the cultural conditions for diagnostic purposes must be carefully standardized, which should be accompanied by markers developed based on conserved gene sequences.

Annual Meeting of the American Phytopathological Society Pasadena California USA
1-5 de Agosto 2015 Draft Genome Sequence of the Plant-Pathogenic Fungus *Stemphylium lycopersici* Strain CIDEFI-216

Mario Emilio Ernesto Franco¹, Silvina López², Rocio Medina³, Mario Carlos Nazareno Saparrat^{2, 4} & Pedro Alberto Balatti¹.

1. Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI), Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP. La Plata, Buenos Aires, Argentina.

2. Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE), UNLP-CONICET. La Plata, Buenos Aires, Argentina.
3. Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), UNLP-CONICET. La Plata, Buenos Aires, Argentina.
4. Instituto Carlos Spegazzini, Facultad de Ciencias Naturales y Museo. La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Stemphylium lycopersici is a pathogenic fungus that provokes the leaf spot disease on over 30 host genera worldwide, among them Tomato. Here we report the draft genome sequence of *S. lycopersici* strain CIDEFI-216. Total genomic DNA was isolated from a monosporic culture using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) and was used to construct 100 bp paired-end libraries. They were used to, which were then sequenced by Illumina HiSeq 2000 technology. Reads were assembled using SOAPdenovo2 software at MacroGen (Korea). Gene prediction was performed by Fgenesh software (Softerry), functional annotation was carried out with Blast2GO software (BioBam) and tRNAs and rRNAs were predicted using tRNAscan-SE and HMM-rRNA tools from WebMGA server. The paired-end libraries produced 31117554 reads with a total of 3142872954 bp, representing an average coverage of 77.39 X. The genome was assembled into 419 scaffolds with a total length of 35.18 Mbp (1000 bp; N50=498048 bp) and an overall G+C content of 50.5 %. A total of 8998 protein-coding genes were predicted, whose functional annotation is discussed. Additionally, 94 tRNAs and 44 rRNAs were found. This draft genome sequence, the first available for *S. lycopersici*, represents a new resource for further research into the taxonomy, biology and phytopathology of this plant pathogen.

Annual Meeting of the American Phytopathological Society Tampa Florida USA 30-3 de Agosto 2016 Mitochondrial and nuclear gene sequences to infer the phylogeny of Pezizomycotina (Ascomycota)

Mario E. E. Franco¹, Silvina M. Y. López¹, Mario C. N. Saparrat^{2, 3, 4} & Pedro A. Balatti^{1, 4}.

1. CIDEFI, Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIC-UNLP). Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Buenos Aires, Argentina.
2. INFIVE, Instituto de Fisiología Vegetal (CONICET-UNLP). Facultad de Ciencias Naturales y Museo y Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Buenos Aires, Argentina.
3. Instituto Carlos Spegazzini. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Buenos Aires, Argentina.
4. Cátedra de Microbiología Agrícola. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Buenos Aires, Argentina

Pezizomycotina is the largest subphylum of Ascomycota. It includes filamentous species widespread in nature, where they live as saprotrophs, mutualists and/or parasites of animal, plants and fungi. We evaluated the phylogeny of such an important subphylum not only by analyzing the sequence of nuclear genes but also of the core mitochondrial ones, since this organelle may provide additional information. Hence, we compared the phylogenetic reconstitution provided by the concatenated nucleotide sequences of 12 core mitochondrial genes (*atp6*, *cob*, *cox1-3*, *nad1-6* and *nad4L*) and the individual and concatenated nucleotide sequences of 5 widely used nuclear genes (*β-tub*, *tef-1α*, *gpd*, *rpb1* and *rpb2*) of 28 Pezizomycotina species. Alignments were generated with ClustalW and automatically curated with Gblocks 0.91b. Best-fit model of evolution was selected with jModelTest 2.1.7 and data matrices were analyzed under maximum likelihood and bayesian criteria in PhyML 3.0 and MrBayes 3.2, respectively. We found that only *rpb2* and the concatenated nuclear and mitochondrial datasets

clustered species in accordance with the current systematic of this subphylum, although incongruences were observed in some internal nodes. Discrepancies between the remaining datasets are indicative of the complex evolutionary histories and confirmed that the genes for an accurate phylogenetic estimation should be chosen with special care.

Annual Meeting of the American Phytopathological Society Tampa Florida USA 30-3 de Agosto 2016 . In silico screening of genes coding for secondary metabolites in the phytopathogenic fungus *Stemphylium lycopersici*

Mario E. E. Franco¹, Silvina M. Y. López¹, Mario C. N. Saparrat^{2, 3, 4} & Pedro A. Balatti^{1, 4}.

1. CIDEFI, Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIC-UNLP). Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Buenos Aires, Argentina.

2. INFIVE, Instituto de Fisiología Vegetal (CONICET-UNLP). Facultad de Ciencias Naturales y Museo y Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Buenos Aires, Argentina.

3. Instituto Carlos Spegazzini. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Buenos Aires, Argentina.

4. Cátedra de Microbiología Agrícola. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Buenos Aires, Argentina

Secondary metabolites (SMs) are a highly diverse set of low molecular weight bioactive compounds that play different biological roles. They are dispensable when microorganism are cultivated in vitro, but usually play a key role in nature, providing organisms with adaptive advantages in different niches. Among them, toxins produced by phytopathogenic fungi play crucial roles in virulence and host nutrition. We hypothesized that the genome of *Stemphylium lycopersici* strain CIDEFI-216, an etiological agent of tomato gray leaf spot, contains several gene clusters that code for the synthesis of SMs, such as those involved in the biosynthesis of virulence factors. We searched by means of the bioinformatic tools Secondary Metabolite Unknown Region Finder (SMURF) and Antibiotics and Secondary Metabolite Analysis Shell (antiSMASH) enabling the ClusterFinder algorithm for potential SMs gene clusters within the draft genome sequence of the fungus. This led to the prediction of 32, 33 and 64 additional SMs gene clusters by SMURF, antiSMASH and ClusterFinder, respectively. They included polyketides synthase (PKS), non-ribosomal peptide synthase (NRPS), terpene synthase, dimethylallyl tryptophan synthase, hybrid PKS-NRPS, lanthipeptide synthase, fatty acid synthase and others gene clusters of unknown nature. This knowledge provides critical information to understand the biological bases of the tomato-*S. lycopersici* interaction.

Congreso Latinoamericano de Microbiología 26-30 de Septiembre Rosario Argentina
Diversidad de los rizobios que nodulan la soja en los suelos de la Pampa húmeda e identificación de cepas para la fabricación de inoculantes comerciales Pastorino G.1, López S.M.Y. 2, Lucentini G.3, Balatti P.A. 1 3 4

Las labores culturales, provocan modificaciones de las propiedades físicas, químicas y biológicas de los suelos (Dorr de Quadros et al. 2012). Estas se clasifican en: labranza convencional, labranza vertical y siembra directa. Cada tecnología de manejo genera estreses a los que las poblaciones microbianas se adaptan, como resultado de cambios morfológicos, fisiológicos y genéticos (Gomes Barcellos et al. 2009).

La inoculación de la soja (*Glycine max* [L.] Merr) es una tecnología que se introdujo en la Argentina junto con el cultivo y por ello los inoculantes fueron el vehículo de introducción de las cepas exóticas de *Bradyrhizobium*, que una vez incorporadas al

suelo, se adaptaron y establecieron dando origen a las poblaciones de rizobios naturalizadas (Ferreira & Hungria 2002; Mendes et al. 2004; Lodeiro 2015). Lo que condujo a generar diversidad a nivel del genoma de los bradirizobios (Suominen et al. 2001; Moulin et al. 2004).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la diversidad de los simbiontes de soja que se encuentran en la población del suelo y el rol que cumple como recurso en la selección de cepas para su producción comercial.

Se evaluaron dos muestras de suelo que durante los últimos 8 años fueron trabajadas con siembra directa (SD) y con labranza convencional (LC). Se realizó el recuento y aislamiento de rizobios. Los aislados se caracterizaron fisiológica y genéticamente. La diversidad se evaluó mediante la amplificación de las secuencias BOX A1R. Se seleccionaron 52 aislados que se identificaron amplificando las regiones RSq y nifD y la secuenciación del fragmento ITS 16S - 23S rDNA.

El recuento de rizobios mostró que en el suelo bajo SD y antecesor soja la población fue mayor (8×10^3 rizobios.g suelo⁻¹) que en la muestra de suelo bajo LC y antecesor maíz (6×10^2 rizobios.g suelo⁻¹). La caracterización fisiológica de 200 aislados mostró que los suelos LC contuvieron más cepas tolerantes a salinidad (0,5 % NaCl) y más cepas resistentes a alta temperatura (37 °C). El análisis del fenograma generado con los fingerprints BOX A1R, mostró que hay mayor diversidad en los suelos bajo SD.

Sobre los 52 aislados analizados en base a la secuencia del ITS se encontró que el 70 % son *Bradyrhizobium japonicum* y 30 % *B. elkanii*. Se identificaron 3 aislados que comparten características genéticas de ambas especies de *Bradyrhizobium*.

Los aislados además mostraron diferencias a nivel de su capacidad de sobrevivencia sobre la superficie de la semilla y en su capacidad para fijar nitrógeno.

Las poblaciones naturalizadas son un recurso para la identificación de rizobios con características superiores para la fabricación de inoculantes, sin embargo es necesario continuar con las evaluaciones de la supervivencia, tolerancia, competitividad y promoción del crecimiento vegetal de rizobios naturalizados para emplearlos como bioinoculantes.

Congreso Latinoamericano de Microbiología 26-30 de Septiembre Rosario Argentina
Bradyrhizobios naturalizados, la expresión de genes de nodulación y su fenotipo.
Pastorino G.1, López S.2; Balatti P.1,2. Cátedra de Microbiología Agrícola, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales – UNLP, La Plata, Buenos Aires, Argentina. 2) Centro de Investigaciones en Fitopatología (CIDEFI), Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales – UNLP, La Plata, Buenos Aires, Argentina Dirección de e-mail: gnpastorino@gmail.com

La soja es exótica en Argentina y América del Sur y por ello el 90 % de la superficie se inocula en el momento de la siembra con bacterias del género *Bradyrhizobium*. Estas bacterias alóctonas que nodulan soja se naturalizaron en los suelos y en este proceso sufren cambios genéticos que contribuyen a su sobrevivencia y a su capacidad competitiva; si bien habitualmente se ven alteradas negativamente en su capacidad de fijación de nitrógeno. Objetivo: Explicar la diversidad fenotípica de aislados alóctonos simbiontes de la soja y su relación con los niveles de expresión de genes de nodulación.

Se realizaron estudios de diversidad sobre 12 *bradyrhizobios* aislados de suelo. Estos aislados son *B. japonicum* y *B. elkanii*, sin embargo el perfil de regiones repetitivas mostró que existe diversidad genética entre ellos. Dos de estos aislados, el 163 y 366 se destacan por su supervivencia, tolerancia a glifosato, síntesis de exopolisacáridos y formación de biopelícula. Comparando con la cepa control (E109), se estudió en los nódulos la expresión de los genes: *nifA*, *fixL*, *nodW*, *nodD1*, *nodD2*, *rhcC1*, *nopP*, *blr0241* y *fixX*. El análisis, mostró que la cepa 163 sería más eficiente debido a que el nivel de expresión de los genes fue mayor. La otra cepa, 366 tendría mecanismos alternativos de promoción de crecimiento vegetal asociados a la fijación simbiótica de nitrógeno.

El estudio de las características diferenciales de los aislados naturalizados y la implicancia de estos resultados sobre la nodulación y fijación biológica de nitrógeno, contribuyen a la selección de cepas que interactúen con la planta de manera más eficientemente.

Congreso Latinoamericano de Microbiología 26-30 de Septiembre Rosario Argentina
Caracterización de rizobios de *Poecilanthe parviflora* Benth. “Lapachillo” de la Reserva Natural isla Martín García, Buenos Aires, Argentina. Martínez Alcántara V.1 Gauna J. M.1,2, Cellini J.M.2, y Balatti P.A.1

Las leguminosas (Fabaceae) arbóreas que fijan N₂ (Nitrógeno) contribuyen a su disponibilidad en suelos herramienta que es utilizada en sistemas silviculturales para su restauración y la mejora de áreas degradadas. *Poecilanthe parviflora* Benth. “Lapachillo” (Papilionoideae, Brongniartieae), es una leguminosa arbórea nativa y endémica de Sudamérica. Se encuentra en Argentina en Buenos Aires, Corrientes, Entre Ríos y Misiones (Burkart, 1952), en Brasil, Paraguay y Uruguay (Meireles y Tozzi, 2007). Interactúa con *Bradyrhizobium* sp. con los que forma nódulos indeterminados fijadores de N₂ (Faria et. al. 1987; Oono et. al, 2010). *P. parviflora* crece en el área intangible de la Reserva Natural Isla Martín García (34°11'19"S, 58°15'00"O) ubicada en el Río de La Plata en el extremo norte de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. Allí existen cinco unidades de vegetación (U.V.): bosque ribereño, selva marginal, bosque de coronillo, pastizal, bosque xerófito, y bosque xerófito inundado. Las tres primeras representan el 87% del área y contienen a las leguminosas: *P. parviflora*, *Vachellia caven* (Molina) Seigler & Ebinger, *Inga affinis* DC., *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong, *Erythrina crista-galli* L., *Gleditsia triacanthos* L., *Lonchocarpus nitidus* (Vogel) Benth, *Mimosa bonplandii* Benth., *Mimosa pilulifera* Benth. Cada U.V. presenta especies de leguminosas arbóreas nativas y características ambientales que sugieren que el suelo debe contener diversidad de rizobios. El objetivo de este trabajo es analizar y caracterizar los rizobios que nodulan *P. parviflora* en diferentes UV.

Se aislaron y caracterizaron rizobios que nodulan *P. parviflora* en el bosque ribereño, selva marginal y bosque de coronillo, del área intangible de la isla. Las muestras compuestas de suelo se tomaron bajo el dosel de un ejemplar de *P. parviflora*/parcela y además se recolectaron tres plantas/parcela. A partir de los nódulos de plantas inoculadas o recolectadas, desarrollaron rizobios en medio YEM (Vincent, 1970). Estos crecieron lentamente en YEM y TY y alcalinizaron el medio YEM con azul de bromo timol. La secuencia del amplicon 16S rRNA y otros genes conservados permitirán la identificación de los aislados.

Referencias

- Burkart, A. 1952. Las Leguminosas Argentinas Acme Agency. Buenos Aires 569 pp.
Faria M, McInroy SG, Sprent JI. 1987. Can. J. Bot. 65: 553-558.
Meireles, J. E. & Tozzi, A. M. G. A. 2007. Rodriguésia 58 (2):255-264
Oono R, Schmitt I, Sprent JI, Denison RF. 2010. New Phytologist 187: 508–520 doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03261.x
Vincent J.M. 1970. A Manual for the Practical Study of Root-nodule Bacteria. International Biological Programme [by] Blackwell Scientific. 164 pp.

Congreso Latinoamericano de Microbiología 26-30 de Septiembre Rosario Argentina
Fijación de N₂ y diversidad de rizobios que nodulan soja aislados de suelos sin historia del cultivo de soja. Martínez Alcántara, Virginia 1; Balagué, Laura 1; Pastorino, Graciela 1; Diosma, Gabriela 1; Balatti, Pedro 1, 2

Congreso Latinoamericano de Microbiología 26-30 de Septiembre Rosario Argentina
La cepa *Neorhizobium galegae* RGAA1, aislada de *Galega officinalis* L. nodula *Vachellia* spp. y *Acacia* spp. Virginia Martínez Alcántara¹, Seyed Abdollah Mousavi², Kristina Lindström² y Pedro A. Balatti¹⁻³.

El género *Galega* (Leguminosae, Papilionoideae), incluye *G. orientalis* Lam. y *G. officinalis* L. especies que nodulan y fijan N₂ con *Neorhizobium galegae* (Lipsanen y Lindström, 1988; Lindström, 1989). Las cepas que nodulan y fijan N₂ con *G. officinalis* nodulan, pero no fijan N₂, con *G. orientalis* y viceversa (Lindström, 1989; Lindström et al 1983; Andronov et. al, 2003) así se separan en dos symbiovariedades (sv.), *orientalis* y *officinalis* (Radeva et. al. 2001; Mousavi et al. 2014).

La Reserva Natural Punta Lara (34° 48' LS, 58° 00' LO), Provincia de Buenos Aires, Argentina, alberga 42 leguminosas (Leguminosae) nativas e introducidas como: *Acacia melanoxylon* R. Br., *Vachellia caven* (Molina) Seigler & Ebinger, *Sesbania punicea* (Cav.) Benth., *Sesbania virgata* (Cav.) Poir., *Trifolium polymorphum* Poir., *Trifolium repens* L. y *G. officinalis* L.

A partir de *G. officinalis*, especie naturalizada en Argentina (Burkart, 1952), se aisló, caracterizó y analizó el rango de hospedantes de RGAA1. Las secuencias del 16S rDNA y nodC confirmaron que RGAA1 es *N. galegae* que formó nódulos en *Vachellia caven* (Molina) Seigler & Ebinger, *Vachellia horrida* (L.) Kyal. & Boatwr. y *Acacia longifolia* (Andrews) Willd.. El rango de hospedantes de *N. galegae* abre un interrogante sobre la especificidad de este rizobio.

Referencias Andronov EE, Terefework Z, Roumiantseva ML, Dzyubenko NI., Onichtchouk OP, Kurchak ON et. al. Symbiotic and genetic diversity of *Rhizobium galegae* isolates collected from the *Galega orientalis* gene center in the Caucasus. *Applied and Environmental Microbiology* 2003;69: 1067-1074.

Burkart A. Las leguminosas argentinas, silvestres y cultivadas, ACME Agency, Buenos Aires; 1952.

Lindström K, Jarvis BDW, Lindström PE, Patel JJ. DNA homology, phage-typing, and cross-nodulation studies of rhizobia infecting *Galega* species. *Canadian Journal of Microbiology* 1983;29 (7): 781-789.

Lindström K. *Rhizobium galegae* a new species of legume root nodule bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1989;39: 365-367.

Lindström K. *Rhizobium galegae* a new species of legume root nodule bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1989;39: 365-367.

Lipsanen P, Lindstrom K. Infection and root nodule structure in the *Rhizobium galegae* sp. nov.-*Galega* sp. symbiosis. *Symbiosis* 1988;6: 81-96.

Mousavi SA, Österman J, Wahlberg N, Nesme X, Lavire C, Vial L. et al. Phylogeny of the *Rhizobium*-*Allorhizobium*-*Agrobacterium* clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 2014;37 (3) 208-215.

Radeva G, Jurgens G, Niemi M, Nick G, Suominen L, Lindström K. Description of two Biovars in the *Rhizobium galegae* species: Biovar Orientalis and Biovar Officinalis. *Systematic and Applied Microbiology* 2001;24: 192-205.

15. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC. *Señalar características del curso o motivo del viaje, período, instituciones visitadas, etc.*

16. SUBSIDIOS RECIBIDOS EN EL PERIODO. *Indicar institución otorgante, fines de los mismos y montos recibidos.*

Subsidio del ICGBE para organizar el curso internacional Microbial Inoculants for a sustainable agriculture Monto otorgado 11000 Euros Marzo 2016- Julio 2016. Responsables del Curso Dr. Giuliano De Grassi y Dr. Pedro A. Balatti.

Subsidio para organización de eventos IV jornadas de enfermedades y plagas de cultivos bajo cubierta Institución financiadora CICBA Estas jornadas están destinadas a realizar actualizaciones técnicas sobre el manejo y control biológico de enfermedades y plagas de los cultivos hortícolas y florícolas Monto Otorgado 7500 \$ 2015

Subsidio para organización de eventos IV jornadas de enfermedades y plagas de cultivos bajo cubierta Institución financiadora CONICET Estas jornadas están destinadas a realizar actualizaciones técnicas sobre el manejo y control biológico de

enfermedades y plagas de los cultivos hortícolas y florícolas Monto Otorgado 70.000 \$
2015

Subsidio para viajes del concurso de subsidios de la CICBA valor 8000 2015 para concurrir al congreso de la Asociación Norteamericana de Fitopatología en Pasadena California Usa

] Proyecto de incentivos

Proyecto Moho de la hoja del tomate y mancha gris: Bases moleculares de las interacciones patógeno hospedantes y el manejo de las patologías. Proyectos de Investigación Científica y Tecnológica (2012) FONCYT Código Proyecto PICT-2012-2760 Duración 22/11/2013 a 22/04/2017 Monto 320.000 \$

- Proyecto 11/A247 – Fijación Biológica de N en la soja Rol de la diversidad genética de los rizobios y los genes de nodulación del hospedante Director Pedro Alberto Balatti Proyecto financiado por la Universidad Nacional de La Plata 2013-2016. Monto 35000 \$

- Proyecto de Incentivos Interacciones patógeno hospedante y el manejo de las patologías provocadas por agentes fúngicos, bacterias, virus y nematodos. Director Pedro A. Balatti y Codirector Mario C.N. Saparrat Acreditado Monto 35000 \$

17. OTRAS FUENTES DE FINANCIAMIENTO. *Describir la naturaleza de los contratos con empresas y/o organismos públicos.*

Trabajos a Terceros realizados en el marco de los expedientes de servicios a terceros de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales que permitieron generar recursos para llevar adelante las líneas de trabajo Valor 30.000 \$

18. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO.

Premio al Investigador de Trayectoria Universidad Nacional de La Plata Expediente 200-2338/18 Resolucion 286 del 2 de Diciembre de 2016

19. ACTUACION EN ORGANISMOS DE PLANEAMIENTO, PROMOCION O EJECUCION CIENTIFICA Y TECNOLÓGICA. *Indicar las principales gestiones realizadas durante el período y porcentaje aproximado de su tiempo que ha utilizado.*

Miembro del Consejo Regional INTA CERBAS designado en Octubre de 2015 como representante del sector científico en el consejo regional

Miembro y Coordinador de la comisión asesora de Ciencias Agrícolas, producción y salud animal.

Director del Centro de Investigaciones de Fitopatología CICBA-UNLP.
de investigación aplicada, Proyectos de desarrollo experimental o tecnológico
Proyectos de investigación Básica Universidad Nacional del Comahue Neuquén 2015

Evaluador de Proyectos de Investigación programa de incentivos a la investigación secretaria de Políticas Universitarias Universidad Nacional de Lujan 2015

Evaluador de Proyectos de Investigación programa de incentivos a la investigación secretaria de Políticas Universitarias Universidad Nacional de Mar del Plata 2015

Evaluador de Proyectos de Investigación programa de incentivos a la investigación secretaria de Políticas Universitarias Universidad Nacional de Mar del Plata 2016

Evaluador Invitado al foro de Proyectos de Investigación y Desarrollo SENACYT Secretaria de Ciencia y Técnica de Panamá Panamá Agosto 2016

Auditor de proyectos de Investigación convocado por la Secretaria de Ciencia y Técnica SEMACYT Panamá Noviembre 2016

Integrante del panel de evaluación convocado por el FONCYT Concurso 2014 Area Tecnología Agropecuaria

Integrante del panel de evaluación convocado por el FONCYT Argentina Innovar concurso 2015

Miembro del Comité de evaluadores estables de Biology and Fertility of Soils

Miembro del Comité Evaluador de Physiological and Molecular Plant Pathology

Miembro evaluador del Proceso de Categorización Convocado en la Ciudad de Corrientes para el proceso de categorización de los investigadores del Programa de Incentivos de la Secretaria de Políticas Universitarias Convocada pro al Regional compuesta por Misiones-Chaco-Corrientes y Entre Ríos.

20. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO. *Indicar el porcentaje aproximado de su tiempo que le han demandado.*

En mi carácter de profesor Titular de Microbiología durante el ciclo 2015 y 2016 desarrolle las siguientes tareas. Dictado de clases teóricas del curso que tiene una carga horaria de 64 horas distribuidas en un periodo de 16 semanas. Se coordinó el grupo de docencia, se conformaron las mesas mensuales de evaluación final. Además se trabajó en el mejoramiento de los materiales didácticos para la cursada de Microbiología Agrícola. Por otro lado se dictaron dos actividades extracurriculares de las que soy responsables cuya duración en los dos casos consiste en seis encuentros de cinco horas cada uno. Una actividad es Taller de Inoculantes y la otra actividad que se realiza en colaboración con el Dr. Mario Saparrat es extracurricular Hongos lignocelulolíticos y su impacto en el sector agro-forestal.

En el caso de mi cargo de Profesor de Fitopatología durante los ciclos 2015 y 2016 también realice las siguientes actividades: Dictado de las clases teóricas del curso de fitopatología que tiene una carga horaria de 80 horas distribuidas en 16 semanas., coordine la actividad docente con los auxiliares del curso, se conformaron las mesas de examen final mensuales. Además soy responsable de dos actividades extracurriculares una Taller de Semillas y el otro taller de actualización: manchas foliares del trigo reconocimiento, diagnóstico y manejo. Se trabajó en material didáctico de la asignatura. El tiempo dedicado a la docencia en virtud de lo expuesto es considerable sobre todo en el segundo semestre del año en que coinciden las actividades docentes de los dos cursos. Además de esto soy docente del curso de posgrado del módulo bacterias del curso Biología de los Microorganismos de la Maestría de Protección Vegetal.

21. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES. *Bajo este punto se indicará todo lo que se considere de interés para la evaluación de la tarea cumplida en el período.*

22. TITULO, PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PROXIMO PERIODO. *Desarrollar en no más de 3 páginas. Si corresponde, explicita la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.*

Bases moleculares de las interacciones benéficas y patógenas que se establecen entre los microorganismos y las plantas

Endófitos de tomate su actividad promotora del crecimiento o biocontrol de patógenos

Las interacciones planta-microorganismo son procesos claves para el crecimiento y la sobrevivencia de las plantas. Estas interacciones están además fuertemente influenciadas por las condiciones ambientales que incluyen a las características del suelo. Las interacciones entre la planta y los microorganismos endófitos no están tan expuestas a los cambios ambientales bruscos, sin embargo estos enfrentan el problema de la competencia en la colonización. Considerando el impacto de los endófitos en las plantas, el desarrollo de formulaciones de bioinoculantes comerciales de los mismos, aparece como una tecnología de potencial importancia que demanda estudios de investigación básicos destinados a conocer los microorganismos y sus capacidades fuera y dentro de la planta donde conviven con otros microorganismos. La mayor colonización de los ambientes por microorganismos endófitos es clave para que estos cumplan su rol sobre todo al principio del ciclo de vida. Es decir que es necesario conocer más sobre la biología de los endófitos que interactúan con los cultivos hortícolas en distintas condiciones ambientales y edáficas. El conocimiento de las comunidades microbianas que componen los microbiomas generará las bases para desarrollar prototipos de biotratamientos. Se dedicará especial atención a los microbiomas, analizando variables como genotipos, variedades y estados de sanidad de los cultivos, las fases de crecimiento, el manejo agrícola y las características del suelo. Se realizarán aislamientos considerando las capacidades como antagonista de fitopatógenos.

Objetivos específicos:

- 1- Aislamiento de endófitos de raíces, hojas y tallos y evaluación de las capacidades de biocontrol de patógenos fúngicos del cultivo de tomate como *Stemphylium* y *Cladosporium*. Se dispone de una colección de estos dos patógenos para la inoculación de plantas.
- 2- Identificación taxonómica de los endófitos de raíces, tallos y hojas que componen el microbioma del tomate.
- 3- Comparación de la composición endofítica de plantas de regiones con mayor y con menor incidencia de enfermedades.
- 4- Estudio de las vías de ingreso y la colonización en las plantas de los endófitos seleccionados.
- 5- Diseño de formulaciones comerciales en endófitos (Objetivo a largo plazo).

En lo que hace a las patologías del tomate dos son las que serán motivo de estudio por un lado el moho de la hoja del tomate que tiene como agente causal a *Cladosporium fulvum* (*Passalora fulva*). Esta enfermedad que prolifera en los invernáculos en que se cultiva tomate debido a que prolifera en ambientes con alta humedad relativa. En este contexto los objetivos del trabajo son Incrementar el número de aislamientos de *C. fulvum* con el fin de aumentar la colección del CIDEFI. Realizar un análisis morfo-fisiológico y molecular de los aislados de *C. fulvum*. Identificar y caracterizar las razas del hongo que conviven en las áreas de producción muestreadas. Evaluar la capacidad de los aislados para sintetizar melaninas. Identificar el tipo de melanina producida por *C. fulvum* y el rol biológico de la misma. Evaluar si la inducción de SAR o de ISR en las plantas de tomate aumenta la sanidad del cultivo.

Por otro lado la otra patología que será objeto de nuestros estudios es la mancha gris de la hoja del tomate provocada por *Stemphylium lycopersici*. En este aspecto los objetivos que se han planteado en relación a esta patología son Analizar el secretoma en la interacción planta-patógeno. Pero además se realizarán estudios genómicos comparativos de dos aislados de *Stemphylium lycopersici* que provocan la mancha gris del tomate con distinta severidad con el fin de identificar secuencias genómicas que codifiquen factores de virulencia. También se identificarán y cuantificarán los metabolitos secundarios (factores de virulencia) que sintetizan los aislados de *Stemphylium lycopersici* virulentos y no virulentos. Por último se estudiará la expresión diferencial de los genes identificados en los estudios de genómica comparativa y/o genes que codifican los metabolitos secundarios que podrían ser determinantes clave de virulencia de aislados de *Stemphylium lycopersici* con distinto grado de virulencia.

Condiciones de la presentación:

- A. El Informe Científico deberá presentarse dentro de una carpeta, con la documentación abrochada y en cuyo rótulo figure el Apellido y Nombre del Investigador, la que deberá incluir:
- Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 22).
 - Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, en otra carpeta o caja, en cuyo rótulo se consignará el apellido y nombres del investigador y la leyenda "Informe Científico Período".
 - Informe del Director de tareas (en los casos que corresponda), en sobre cerrado.
- B. Envío por correo electrónico:
- Se deberá remitir por correo electrónico a la siguiente dirección: ininvest@cic.gba.gob.ar (puntos 1 al 22), en formato .doc zipeado, configurado para papel A-4 y libre de virus.
 - En el mismo correo electrónico referido en el punto a), se deberá incluir como un segundo documento un currículum resumido (no más de dos páginas A4), consignando apellido y nombres, disciplina de investigación, trabajos publicados en el período informado (con las direcciones de Internet de las respectivas revistas) y un resumen del proyecto de investigación en no más de 250 palabras, incluyendo palabras clave.
- C. Sistema SIBIPA:
- Se deberá petitionar el informe en la modalidad on line, desde el sitio web de la CIC, sistema SIBIPA (ver instructivo).

Nota: El Investigador que desee ser considerado a los fines de una promoción, deberá solicitarlo en el formulario correspondiente, en los períodos que se establezcan en los cronogramas anuales.