



VISTO la propuesta del Protocolo de Trabajo entre la Universidad Nacional de Río Cuarto y la Empresa CERES-DEMETER SRL. obrante en el Expediente N° 106964-2; y

CONSIDERANDO:

Que dicho Protocolo de Trabajo se encuadra en el Convenio de Cooperación entre la Universidad Nacional de Río Cuarto y la Empresa CERES-DEMETER SRL., vigente desde el 22 de febrero de 2013 aprobado por Resolución del Consejo Superior N° 373/12 (Exp. N° 106964).

Que en el marco del Protocolo referido en el visto la Facultad a través del Departamento de Biología Molecular y la empresa CERES-DEMETER SRL desarrollarán actividades conjuntas entorno a la temática: “producción de bioformulados para la promoción del crecimiento vegetal en el cultivo del maní”.

Que se cuenta con el dictamen favorable de la Dirección de Asuntos Jurídicos N° 7934 de la Universidad Nacional de Río Cuarto, y atento al plazo de duración de 24 meses, deberá ser autorizado por el Consejo Superior.

Que el mismo cumple con los requisitos establecidos en las reglamentaciones vigentes.

Que se cuenta con el despacho de la Comisión de Investigación, Postgrado y Transferencia del Consejo Directivo de esta Facultad.

Por ello y en uso de las atribuciones que le confiere el Artículo 32 del Estatuto de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

**EL CONSEJO DIRECTIVO
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS,
FISICO-QUIMICAS Y NATURALES**

RESUELVE:

ARTICULO 1ro.- Aprobar el **PROTOCOLO DE TRABAJO** entre **LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO** y **la EMPRESA CERES-DEMETER S.R.L.**, según se detalla en el **ANEXO** de la presente.



Universidad Nacional de Río Cuarto
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales

“Celebrando el Bicentenario de la Declaración de la Independencia Argentina y el 45° Aniversario de la Creación de la Universidad Nacional de Río Cuarto”

1.

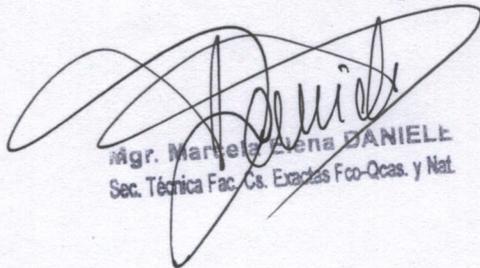
ARTICULO 2do.- Elevar la presente Resolución para su tratamiento en el Consejo Superior.

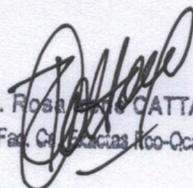
ARTICULO 3ro.- Regístrese, comuníquese. Tomen conocimiento las Areas de competencia. Cumplido, archívese.

DADA EN LA SALA DE SESIONES DEL CONSEJO DIRECTIVO A LOS DIEZ DEL MES DE NOVIEMBRE DE DOS MIL DIECISEIS.

RESOLUCION NRO.:

346


Mg. Marcela Elena DANIELI
Sec. Técnica Fac. Cs. Exactas Fco-Qcas. y Nat.


Dra. Rosa María GATTANA
Decana Fac. Cs. Exactas Fco-Qcas. y Nat.



346

Universidad Nacional de Río Cuarto
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales

“Celebrando el Bicentenario de la Declaración de la Independencia Argentina y el 45° Aniversario de la Creación de la Universidad Nacional de Río Cuarto”

A N E X O
PROTOCOLO DE TRABAJO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FCO-QCAS Y NATURALES Y
LABORATORIO CERES-DEMETER S.R.L.

En el marco del convenio aprobado por Res. Consejo Superior N° 373/12 - Expte. N° 106964 entre la Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC) y Laboratorios CERES-DEMETER S.R.L., se estipula el presente protocolo de trabajo entre la Facultad de Ciencias Exactas, Fco-qcas y Naturales, en adelante “la FACULTAD”, con domicilio en Ruta Nacional 36 Km. 601 de la ciudad de Río Cuarto, representada en este acto por la Sra. Decana, Dra. Rosa CATTANA y el laboratorio Ceres-Demeter S.R.L., en adelante “la EMPRESA”, con domicilio en calle Ruta A005 km 8 de la ciudad de Río Cuarto, representado en este acto por su gerente, el Sr. Cr. Federico Javier GARCIA CORDOBA, el cuál se regirá por las siguientes cláusulas:

PRIMERA: La FACULTAD a través del Departamento de Biología Molecular y la EMPRESA desarrollarán actividades conjuntas en torno a la temática: “Producción de bioformulados para la promoción del crecimiento vegetal en el cultivo del maní”.

SEGUNDA: Para obtener los resultados mencionados en la cláusula primera, se estructurará un Programa de Trabajo de 24 meses de duración y cuyas actividades se detallan en el ANEXO I que forma parte integrante del presente protocolo.

TERCERA: El proyecto de trabajo corresponde tipológicamente a un estudio de investigación con ensayos a desarrollar en el laboratorio y a campo. Específicamente se llevarán a cabo actividades con el objeto de lograr eficiencia en los procesos de producción de biofertilizantes destinados a la promoción del crecimiento vegetal en cultivos de importancia agroeconómica de la provincia de Córdoba.

Los aspectos específicos de este Protocolo de Trabajo, en lo que concierne a materiales, procedimientos metodológicos, relevamiento de muestras, y valoración de resultados son presentados en detalle en el ANEXO I.

CUARTA: Para el logro de los objetivos arriba mencionados, la FACULTAD y la EMPRESA aportarán personal, infraestructura y equipamiento. La modalidad del aporte por parte de la EMPRESA consistirá en la transferencia de productos y de servicios técnicos específicos y especializados, tales como como nuevos bioformulados y ensayos de nodulación a nivel de laboratorio y a campo.

QUINTA: Las partes tienen la facultad de controlar y verificar la evolución de las actividades programadas.

SEXTA: Las partes garantizan la observancia de las normas sobre secreto profesional y la confidencialidad de la información de conformidad con las disposiciones legales por parte de todas las personas que participan de la actividad, motivo del presente protocolo.



346

SEPTIMA: Los resultados serán informados por medio de un acuerdo entre las partes en un reporte que se elaborará al finalizar el presente protocolo. Para ello los responsables deberán presentar, al término de las actividades dos informes con las tareas realizadas y resultados obtenidos, uno a la Secretaria de Extensión de la FACULTAD y otro a la EMPRESA.

OCTAVA: Por parte de la "FACULTAD" se designa como Coordinador de las actividades al Dr. Walter GIORDANO, DNI: 18.431.644, del Departamento de Biología Molecular y como Coordinador por parte de la "EMPRESA" al Dr. Sergio BONANSEA, DNI: 25.698.343, Socio-Gerente de la misma.

NOVENA: La EMPRESA designa como profesional participante del presente protocolo al Dr. Dario G. GÓMEZ, DNI: 26.423.237; y la "FACULTAD" designará al Dr. Walter GIORDANO, DNI: 18.431.644, como responsable técnico que llevará adelante dicho protocolo.

DECIMA: Los documentos y/o proyectos que se elaboren, sean parciales o definitivos, como resultado de las tareas realizadas en el marco del presente Convenio, serán de propiedad intelectual, por partes iguales, de la EMPRESA y de la UNRC, y cuando los signatarios lo consideren conveniente, inscribirán esos derechos según la normativa vigente.

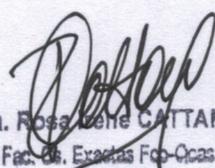
DECIMA PRIMERA: En toda circunstancia o hecho que tenga relación con este Protocolo, las partes tendrán la individualidad y autonomía de sus respectivas estructuras técnicas, académicas y administrativas y asumirán particularmente, por lo tanto, las responsabilidades consiguientes.

DECIMA SEGUNDA: Este Convenio tiene vigencia a partir de su firma y regirán por el plazo dispuesto en la CLAUSULA SEGUNDA. Cualquiera de las Partes podrá rescindir el presente acuerdo en cualquier momento, mediante notificación por escrito cursada a la otra parte con una antelación mínima de 30 (treinta) días corridos a la efectiva rescisión.

DECIMA TERCERA: Ambas partes acuerdan que por cualquier contingencia derivada del presente acuerdo, se someten a los Tribunales Federales de ciudad de Río Cuarto, y constituyen como sus domicilios especiales los consignados para cada uno de ellos.

En prueba de conformidad se firman tres ejemplares de un mismo tenor y a un solo efecto, en la ciudad de Río Cuarto, a los días del mes dedel año 2016.-


J. Mariana Daniela DANIELE
C. Técnica Fac. Cs. Exactas Fco-Ccas. y Nat.


Dra. Rosa Irene CATTANA
Decana Fac. Cs. Exactas Fco-Ccas. y Nat.



ANEXO I

PROTOCOLO DE TRABAJO

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FCO-QCAS Y NATURALES Y LABORATORIO CERES-DEMETER S.R.L.

Producción de bioformulados para la promoción del crecimiento vegetal en el cultivo del maní

A) OBJETIVOS GENERALES:

El objetivo general del presente proyecto apunta, por un lado, a evaluar en que medida el desarrollo de diferentes estrategias de biofertilización puede favorecer la competitividad y la supervivencia de la cepa introducida en suelos con poblaciones microbianas nativas y por otro lado, a determinar el impacto final sobre el rendimiento a cosecha de los cultivos.

B) OBJETIVOS PARTICULARES:

La aplicación adecuada de biofertilizantes y una labranza prudente en los cultivos, produce cambios en la morfología de la planta que se ponen de manifiesto de diferentes maneras. Por ejemplo, un mayor desarrollo radicular, una mayor producción de materia vegetal y lo que es más importante, una mayor producción de granos. En consecuencia la investigación será dividida en los siguientes objetivos particulares:

Objetivo 1. Analizar la respuesta de la planta frente a distintas estrategias de biofertilización tales como la inoculación en semilla o en el surco de siembra.

Objetivo 2. Evaluar el efecto de la coinoculación *Bradyrhizobium* sp. - *Azospirillum* sobre el crecimiento y la fijación biológica del nitrógeno en maní.

C) ANTECEDENTES

En la búsqueda de mecanismos que permitan un manejo adecuado y sustentable de los cultivos, adquiere una gran relevancia la inoculación con rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas o PGPR "*Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*" (Kloepper *et al.*, 1989), las cuales se caracterizan por su habilidad de facilitar directa o indirectamente el desarrollo vegetal. La estimulación indirecta del crecimiento de plantas incluye por ejemplo una variedad de mecanismos por los cuales la bacteria inhibe la acción de patógenos vegetales. La estimulación directa puede incluir la fijación de nitrógeno, la producción de hormonas, enzimas, sideróforos y solubilización de fosfatos, entre otros.

La inoculación en semilla de maní (*Arachis hypogaea* L.) con cepas de referencia y nativas de *Bradyrhizobium* spp., suele resultar en una baja ocupancia de nódulos, siendo una de las posibles causales su pobre movilidad y la amplia distribución de rizobios nativos en el perfil del suelo, que les permite formar nódulos sobre la totalidad del sistema radical. En nuestro grupo de investigación del Depto.



de Biología Molecular existe una amplia experiencia de trabajos referidos a la respuesta a la inoculación en maní con *Bradyrhizobium* sp., tanto en experiencias realizadas a nivel de laboratorio (Bogino *et al.*, 2010, 2011, 2015, Nievas *et al.*, 2012a,b y Vicario *et al.*, 2015), como así también en ensayos realizados a campo (Bogino *et al.*, 2006, 2008 y Vicario *et al.*, 2016), cuyos resultados además permitieron la culminación de tres tesis doctorales.

Tomando como base estos datos y en la búsqueda de nuevas estrategias de biofertilización para maní, planeamos desarrollar nuevas formulaciones para experimentar la co-inoculación por medio de ensayos en el laboratorio y a campo.

D) DISEÑO EXPERIMENTAL Y MÉTODOS

Los enfoques experimentales del presente proyecto se van a realizar en los dos laboratorios participantes, es decir de la UNRC y de CERES-DEMETER S.R.L. La experiencia que el grupo posee en el manejo este cultivo y el abordaje de distintos aspectos, entendemos que ayudará a cumplir el objetivo global.

Métodos Generales

Los métodos descriptos a continuación podrían ser usados indistintamente para el desarrollo de los objetivos específicos del proyecto.

1. *Cepas Bacterianas*: Para los experimentos de nodulación en maní, se emplearán las cepas de referencias tales como *Bradyrhizobium* sp. C-145, SEMIA, USDA 4438. En forma paralela se emplearán cepas nativas nodulantes de maní aisladas y caracterizadas por nuestro grupo (Bogino *et al.*, 2010). Las bacterias serán cultivadas en medio líquido YEM hasta una DO_{600} de 0.8 a 1.0 para inocular las raíces de las plantas. Los rizobios aislados de nódulos serán caracterizados por la capacidad de virar el pH del medio YEMA con el agregado de azul de bromotimol. En caso de ser necesario el marcado de determinada cepa bacteriana con proteínas fluorescentes para los experimentos en que usemos el microscopio de fluorescencia, emplearemos la técnica descrita en Giordano *et al.*, (2002), para lo cual básicamente introduciremos a la cepa de interés el plásmido pHc60, el cual expresa la proteína GFP (*green fluorescent protein*).

2. *Material vegetal*: Semillas de maní (*Arachis hypogaea* L. cv Tegua), serán esterilizadas en superficie y luego germinadas en jarras de Magenta (Magenta Corp., Chicago IL), conteniendo medio de Hoagland's sin nitrógeno o germinadas en forma aséptica en cajas de plástico conteniendo perlita y vermiculita. Para los experimentos de nodulación o formación de biofilms en raíz, las plantas serán inoculadas con los cultivos bacterianos de acuerdo a las condiciones descriptas por Giordano *et al.*, (2002).

3. *Ensayos de inoculación en invernadero*: El ensayo se llevará a cabo en macetas de 100 g de vermiculita, regadas con 100 ml de agua destilada estéril. Cada maceta portaba una planta, con 10 repeticiones para cada uno de los siguientes tratamientos:

- Sin inocular (control negativo).
- Inoculados con *Bradyrhizobium* C145 y cepas nativas.



- Inoculados con *A. brasilense* Az39.
- Co-inoculadas *Bradyrhizobium*-*A. brasilense* Az39.

Una vez desinfectadas y pre germinadas las semillas, se depositaron una por macetas y se inocularán. Para las inoculaciones simples se colocará 1 ml de cultivo de las diferentes cepas de *Bradyrhizobium* con un recuento de 10^9 UFC/ml y 1 ml de *A. brasilense* Az39 con un recuento de células de 10^6 UFC/ml, mientras que los tratamientos co-inoculados se inocularán con 1 ml de una cepa de *Bradyrhizobium* y 1 ml del cultivo de *Azospirillum*. Las plantas serán cultivadas durante 32 días en una cámara de cultivo con un ciclo de 16 horas de luz, 8 horas de oscuridad a 24 °C y la humedad relativa se mantendrá en torno al 80%. Los riegos se efectuarán en días alternos a lo largo de los 32 días, con agua destilada estéril y solución Jensen sin nitrógeno estéril.

Se determinarán seis parámetros en cada ensayo: longitud de tallo y raíz medidos en cm, peso seco de parte aérea y raíz estimados en mg/planta, número de nódulos/planta y peso seco de nódulos estimado en mg/planta.

4. *Ensayos a campo*: Los tratamientos consistirán de co-inoculaciones en surco con las cepas de *Bradyrhizobium* y *Azospirillum* Az39 y controles sin inocular. Cada tratamiento será realizado en cuatro parcelas (repeticiones distribuidas aleatoriamente) de siete surcos de 5 m de largo distanciados 0,7 m entre sí. La densidad de siembra fue de 16 semillas por metro lineal. En todos los casos las semillas fueron tratadas con el fungicida carboxin 20 % + tiram 20 %, a una dosis de 200 ml/100 Kg semilla. La inoculación en surco se realizará aplicando 1,5 l de inoculante por ha de *Bradyrhizobium* y 1 l de inoculante por ha de *Azospirillum* Az39. Las formulaciones empleados contenían aproximadamente 1×10^9 UFC/ml. En la etapa R1 (floración, 60días) se tomarán muestras de plantas. A los diferentes tratamientos se les realizará medida de tallo, peso seco de parte aérea, número y peso seco de nódulos. Alrededor de los 150 días, plantas recogidas de una superficie de 1 m² serán cosechadas y analizadas para determinaciones de peso de parte aérea, número y peso seco de nódulos y peso de cajas.

5. *Determinación de actividad nitrogenasa*: la actividad de la enzima nitrogenasa en bacterias de vida libre, en nódulos y en biofilms se determinará mediante el ensayo de reducción de acetileno (ARA) en las condiciones descritas por Hardy *et al.*, (1973).

6. *Análisis estadísticos*: las experiencias serán realizadas usando diseños aleatorizados y los valores obtenidos representarán las medias de al menos cinco repeticiones. Los datos se analizarán empleando el test de Anova con una comparación múltiple de variables por el test de Fisher 5 Lsd considerando diferencia significativa un nivel de $P=0,05$. Todos los análisis estadísticos se evaluarán con el software Infostat 1.0 (Group Infostat, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).



E) RECURSOS DISPONIBLES Y FACTIBILIDAD DEL PLAN DE TRABAJO

El plan presentado significa la continuidad del trabajo que se está desarrollando en el grupo de investigación del Dr. Walter Giordano perteneciente al Dpto. de Biología Molecular, UNRC; cuyos laboratorios disponen de los siguientes equipos y aparatos: campana de flujo laminar, agitador orbital, centrifugas y microcentrifuga, balanzas, estufas, freezer -20 y -80°C, equipos de electroforesis vertical y horizontal, termociclador, destilador de agua, cromatógrafo líquido de alta performance, cromatógrafo de gases, espectrofotómetro, cámara de incubación con control de fotoperíodo y microscopio óptico. El Dr. Pablo Bogino colaborará de manera directa en el desarrollo de este plan.

REFERENCIAS

- Bogino, P., Banchio, E. & Giordano, W. (2010). Molecular diversity of peanut-nodulating rhizobia in soils of Argentina. *J Basic Microbiol* 50, 274-279.
- Bogino, P., Banchio, E., Bonfiglio, C. & Giordano, W. (2008). Competitiveness of a *Bradyrhizobium* sp. strain in soils containing indigenous rhizobia. *Curr Microbiol* 56, 66-72.
- Bogino, P., Banchio, E., Rinaudi, L., Cerioni, G., Bonfiglio, C. & Giordano, W. (2006). Peanut (*Arachis hypogaea*) response to inoculation with *Bradyrhizobium* sp. in soils of Argentina *Ann Appl Biol* 148 207-212.
- Bogino, P., Nievas, F. & Giordano, W. (2015) A review: Quorum sensing in *Bradyrhizobium*. *Appl. Soil Ecol.* 94, 49-58.
- Bogino, P., Nievas, F., Banchio, E. & Giordano, W. (2011). Increased competitiveness and efficiency of biological nitrogen fixation in peanut via in-furrow inoculation of rhizobia. *Eur J Soil Biol* 47, 187-193.
- Bogino, P., Oliva, M.M., Sorroche, F.G. & Giordano, W. (2013b). The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 15838-15859.
- Giordano, W., Lum, M.R. & Hirsch, A.M. (2002). Effects of a Nod-factor overproducing strain of *Sinorhizobium meliloti* on the expression of the *ENOD40* gene in *Melilotus alba*. *Can J Bot* 80 907-915.
- Hardy, R., Burns R. & Holsten T. (1973). Application of the acetylene reduction assay for the measurement of nitrogen fixation. *Soil Biol Biochem.* 5, 47-81
- Kloepper, J.W., Lifshitz, R. & Zablutowicz, R.M. (1989). Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol* 7, 39-49
- Nievas, F., Bogino P., Nocelli, N. & Giordano, W. (2012a). Genotypic analysis of isolated peanut-nodulating rhizobial strains reveals differences among populations obtained from soils with different cropping histories. *Appl. Soil Ecol.* 53, 74-82.
- Nievas, F., Bogino, P., Sorroche, F. & Giordano, W. (2012b). Detection, characterization, and biological effect of quorum-sensing signaling molecules in peanut-nodulating bradyrhizobia. *Sensors-Basel.* 12, 2851-2873.



346

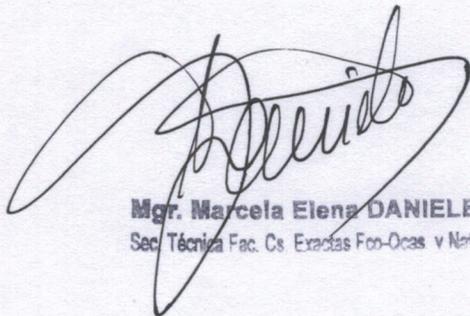
5

Universidad Nacional de Río Cuarto
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales

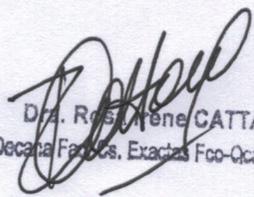
“Celebrando el Bicentenario de la Declaración de la Independencia Argentina y el 45° Aniversario de la Creación de la Universidad Nacional de Río Cuarto”

Vicario, J.C., Dardanelli, M.S. & Giordano, W. (2015) Swimming and swarming motility properties of peanut-nodulating rhizobia. *FEMS Microbiol. Letters*. 362, 1-6.

Vicario, J.C., Primo, E., Dardanelli, M.S. & Giordano, W. (2016) Promotion of peanut growth by co-inoculation with selected strains of *Bradyrhizobium* and *Azospirillum*. *J Plant Growth Regul.* 35, 413-419.



Mgr. Marcela Elena DANIELE
Sec. Técnica Fac. Cs. Exactas Fco-Occas y Nat



Dra. Rosalene CATTANA
Decana Fac. Cs. Exactas Fco-Occas. y Nat.