



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

RÍO CUARTO, 03 AGO. 2021

VISTO, la propuesta de protocolo de trabajo entre la FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES, UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO y la EMPRESA STOLLER DO BRASIL LTDA, Expediente Nro. 134546-1 y

CONSIDERANDO:

Que dicho protocolo de trabajo se enmarca en el Convenio Marco celebrado entre la UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO y la EMPRESA STOLLER DO BRASIL LTDA aprobado por Resolución del Consejo Superior Nro.: 141/20, Expediente Nro.: 134546.

Que el protocolo de trabajo tiene como objetivo general la validación y análisis funcional de un activador rizosférico [Rizo-stimulate®] para el tratamiento del cultivo de soja (*Glycine max* L [Merr.]) y maíz (*Zea mays* L.) en condiciones agronómicas.

Que los objetivos específicos del protocolo son: 1) Validar la formulación de un activador rizosférico conteniendo diferentes principios activos y moléculas con actividad biológica específica y sinérgica, con otros productos desarrollados por la empresa para los cultivos de interés. 2) Analizar el impacto de la aplicación de la formulación sobre la diversidad de microorganismos presentes en la rizosfera de plantas de soja y maíz en condiciones controladas de laboratorio. Análisis metagenómico y microbiológico. 3) Analizar el impacto de la aplicación de la formulación sobre la capacidad de los microorganismos presentes en la rizosfera de plantas de soja y maíz para promover el crecimiento y desarrollo vegetal en condiciones controladas de laboratorio. Análisis fisiológico en cámara de cultivo. 4) Analizar el impacto de la aplicación de la formulación sobre la capacidad de los microorganismos presentes en la rizosfera de plantas de soja y maíz para promover el crecimiento y desarrollo vegetal en condiciones de cultivo. Análisis agronómico.

Que se designa como Coordinador de las actividades por parte de la FACULTAD al Dr. Fabricio Cassán (DNI: 23.436.617), docente del Departamento de Ciencias Naturales, y como Coordinador por parte de la EMPRESA a la Sra. STELLA CONSORTE CATO, Directora de Pesquisa e Desenvolvimento, CPF n. 214.083.448-82, en carácter de Responsable Legal.

Que se cuenta con el Dictamen favorable de la Dirección de Asuntos Jurídicos Nro.: 8846 de esta Universidad, obrante a foja 23.

Que, asimismo, se cuenta con los vistos favorables de la Secretaría Económica y de la Secretaría de Extensión y Desarrollo de esta Universidad, obrantes a fojas 25 y 26 del expediente de referencia, y atento al plazo de duración, deberá ser autorizado por el Consejo Superior de esta Universidad.

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

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

Por ello y en uso de las atribuciones conferidas por 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:

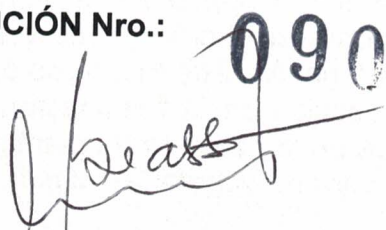
ARTÍCULO 1.- Aprobar el Protocolo de Trabajo entre la **FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES, UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO** y la **EMPRESA STOLLER DO BRASIL LTDA**, según se detalla en el ANEXO de la presente resolución.


ARTICULO 2.- Elevar la presente resolución al **CONSEJO SUPERIOR** de la **UNRC** para su tratamiento.

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

DADA EN LA SALA DE SESIONES DEL CONSEJO DIRECTIVO DE ESTA FACULTAD EN REUNION ORDINARIA VIRTUAL, A LOS VEINTINUEVE DIAS DEL MES DE JULIO DEL AÑO DOS MIL VEINTIUNO.

RESOLUCIÓN Nro.:


Dra. PAOLA RITA BEASSONI
Sec. Técnica Fac. Cs. Exactas Fco-Qcas y Nat.


Dra. MARISA ROVERA
Decana Fac. Cs. Exactas Fco-Qcas y Nat.



ANEXO
PROTOCOLO DE TRABAJO
ENTRE
LA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES DE
LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
y
STOLLER DO BRASIL LTDA

En el marco del convenio aprobado por Resolución de Consejo Superior N° 141/20 Exp. N° 134546 entre la Universidad Nacional de Río Cuarto y la empresa Stoller do Brasil LTDA. se estipula el presente protocolo entre la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la UNRC, en adelante "la FACULTAD", con domicilio en Ruta Nacional 36, Km 601 de la ciudad de Río Cuarto, representada en este acto por la Señora Decana, Dra. Marisa ROVERA, por una parte y por la otra la empresa Stoller do Brasil LTDA, en adelante "la EMPRESA", con domicilio en Estrada Municipal CMS-470, n. 300, Bairro Itapavussu, CEP 13151-352, Cosmópolis/SP-Brasil, representada por su apoderado, STELLA CONSORTE CATO, Directora de Investigación y Desarrollo, CPF 214.083.448-82 y ARTHUR DA COSTA MATTOS, Director Industrial, CPF 098.913.988-38, denominadas en conjunto las PARTES, el cual estará sujeto a los siguientes artículos:

OBJETO

Artículo 1° - : El objeto del presente protocolo de trabajo se basa en la validación y análisis funcional de un activador rizosférico [Rizo-stimulate®] para el tratamiento del cultivo de soja (*Glycine max* L [Merr.]) y maíz (*Zea mays* L.) en condiciones agronómicas.

Artículo 2° - : Para el logro de los objetivos mencionados en el artículo 1° se estructurará un Programa de Trabajo de 36 meses de duración, cuyas actividades se detallan en el ANEXO I que forma parte del presente protocolo.

Artículo 3° - : Por parte de la FACULTAD se designa como Coordinador de las actividades al Dr. Fabricio Dario Cassán (DNI: 23.436.617), docente del Departamento de Ciencias Naturales, y como Coordinador por parte de la EMPRESA a la Sra. STELLA CONSORTE CATO, Directora de Pesquisa e Desenvolvimento, CPF n. 214.083.448-82, en carácter de Responsable Legal.

Artículo 4° - : La FACULTAD designa como investigadores participantes a la Dra. Verónica Mora (DNI: 27.695.340); Dr. Gastón López (DNI: 32.113.135); Dra. Daniela Torres (DNI: 30.661.921); Dra. Romina Molina (DNI: 32.271.076); Mic. Anahí Coniglio (DNI: 33.133.286); Mic. Florencia Donadio (DNI: 36.366.578) y Mic. Sofía Nievas (DNI: 37.320.798), todos miembros del Laboratorio de Fisiología Vegetal e Interacción Planta-Microorganismo del Departamento de Ciencias Naturales y a Karina Maria Lima Milani (CPF:057.042.769-03) como miembros de la Empresa.

Artículo 5° - : Los coordinadores de ambas PARTES deberán presentar, al término de las actividades, un informe con las tareas realizadas y resultados obtenidos a la Secretaría de Extensión de la FACULTAD y otro a la EMPRESA.

Artículo 6º - : Las PARTES tienen la facultad de controlar y verificar la evolución de las actividades programadas.

Artículo 7º - : En caso de que surja la posibilidad de desarrollar un nuevo producto apto para su uso comercial, a partir de las investigaciones desarrolladas en el presente protocolo, las PARTES deberán acordar un nuevo Protocolo de Trabajo.

OBLIGACIONES DE LA FACULTAD

Artículo 8º - : La FACULTAD a través del Departamento de Ciencias Naturales, bajo la coordinación del Dr. Fabricio Dario Cassán, realizará los trabajos necesarios para el logro de los objetivos indicados en el artículo 1º.

OBLIGACIONES DE LA EMPRESA

Artículo 9º - : La EMPRESA aportará los recursos económicos necesarios para solventar los gastos materiales, de servicios y personal generados durante el desarrollo experimental por un monto total de u\$s 15.000 que se detalla en ANEXO II. Dicho monto se abonarán desde el momento de la firma del acuerdo, a razón de pagos semestrales sucesivos de u\$s2.500 hasta la finalización del presente protocolo.

OBLIGACIONES DE LA FACULTAD-UNRC

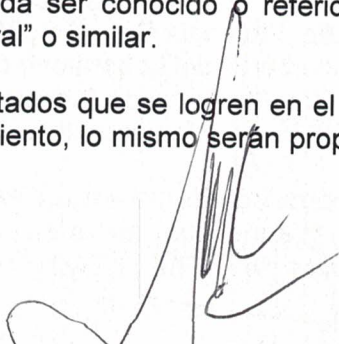
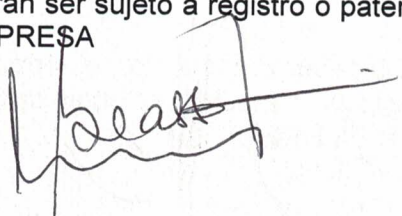
Artículo 10º - : La FACULTAD-UNRC aportará de manera semestral un informe de avance que se pondrá a disposición de la empresa. El informe se realizará conforme a los objetivos establecidos en el Anexo 1.

TITULARIDAD Y DERECHOS DE PROPIEDAD

Artículo 11º - : Las PARTES convienen que los resultados que se logren, parciales o definitivos, obtenidos como resultado de las tareas realizadas en el marco del presente protocolo, serán propiedad intelectual exclusiva de la EMPRESA sin derecho por parte de la FACULTAD a exigir y/o reclamar a la EMPRESA compensación alguna más allá de lo pactado en el presente contrato

A los efectos de la presente, el término "Propiedad Intelectual" significa los derechos intangibles a nivel mundial existentes bajo las leyes de patentes, de propiedad intelectual (copyright), de secreto comercial, de marcas, de lealtad comercial, incluyendo sin limitación patentes, marcas, invenciones, secretos comerciales, derechos de autor, know-how, derechos sobre bases de datos, y todo otro tipo de derecho intelectual e industrial, incluyendo todo tipo de trabajos derivados, mejoras, actualizaciones o evoluciones relacionados con los derechos antes mencionados. Asimismo, la Propiedad Intelectual incluye todos los derechos de paternidad, integridad, revelación, retiro y cualquier otro derecho que pueda ser conocido o referido como "derechos morales", "derechos de artista", "droit moral" o similar.

Artículo 12º - : En caso de que los resultados que se logren en el presente protocolo pudieran ser sujeto a registro o patentamiento, lo mismo serán propiedad exclusiva de la EMPRESA





CREER.CREAR.CRECER



CONFIDENCIALIDAD

Artículo 13° - Las PARTES se comprometen a no revelar la información resultante de este acuerdo o de su realización y se obligan a adoptar todas las medidas necesarias para que dicha información no sea divulgada, siendo responsables por la actuación de su personal dependiente y/o contratado al efecto e instrumentaran en relación a la información confidencial las medidas y formas que crean conveniente respecto de aquellas. La confidencialidad regirá por el período de duración de este protocolo y durante cinco (5) años con posterioridad al mismo. Para ello las PARTES deberán contar con autorización escrita para transmitir dicha información, salvo aquella que sea requerida por autoridad pública debidamente fundada.

RELACION DE LAS PARTES

Artículo 14° - Los bienes muebles e inmuebles que las PARTES destinen al desarrollo de este protocolo, continuarán en el patrimonio de la parte a la que pertenecen o con cuyos fondos fuesen adquiridos, salvo determinación expresa en contrario para cada caso.

Artículo 15° - Los elementos que fuesen facilitados por una de las PARTES a la otra en calidad de préstamo deberán ser reintegrados a la que los facilitó una vez cumplida la finalidad para la que fueron entregados, en buen estado de conservación, excepto el desgaste debido al uso normal y a la acción del tiempo.

Artículo 16° - En cualquier circunstancia o hecho que tenga relación con este protocolo, las PARTES mantendrán la individualidad y autonomía de sus respectivas estructuras técnicas y administrativas y asumirán particularmente las responsabilidades consiguientes. Ninguna de las PARTES tiene obligación con respecto a la otra en asuntos ajenos o extraños al motivo del presente protocolo.

Artículo 17° - Las PARTES se comprometen a consultarse recíprocamente en el caso de existir la posibilidad de convenir con otras instituciones y/o empresas la realización de actividades que puedan afectar lo acordado en el presente protocolo.

Artículo 18° - En caso de que la EMPRESA se fusione y/o transfiera deberá informarlo a la FACULTAD la cual decidirá sobre la continuación del presente protocolo con la nueva empresa.

La EMPRESA y la FACULTAD no podrán transferir el presente protocolo sin el consentimiento escrito de la otra parte para su efectivización.

RESCISIONES

Artículo 19° - No obstante, el período estipulado en este instrumento, cualquiera de las PARTES podrá rescindir este protocolo en cualquier momento dando aviso por escrito en forma fehaciente a la otra parte con treinta (30) días de anticipación.

RESOLUCION DE CONFLICTOS

Universidad Nacional de Río Cuarto
Facultad de Ciencias Exactas Físico-Quím

Artículo 20° - Las PARTES se comprometen a resolver directa y amistosamente entre ellas, los desacuerdos y discrepancias que pudieran originarse en el planeamiento y ejecución del protocolo, y en caso de contienda judicial se someten a la jurisdicción de los Tribunales Federales de la ciudad de Río Cuarto, constituyendo domicilios legales los ya mencionados.

NOTIFICACIONES / COMUNICACIONES

Artículo 21° - Todas las comunicaciones entre las PARTES referentes a este protocolo, se efectuarán por escrito por carta certificada con aviso de retorno, carta documento, y se considerarán cumplidas cuando su destinatario las haya recibido en los siguientes destinos, según corresponda:

FACULTAD: Ruta Nacional 36 Km. 601
CP 5800 Ciudad de Río Cuarto
T.E.: +54 358 4676432
FAX: +54 358 4676530

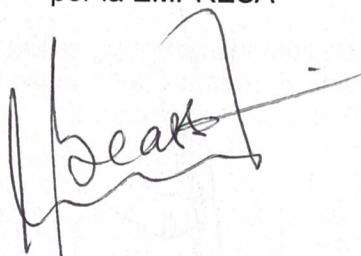
EMPRESA: Stoller do Brasil LTDA
Estrada Municipal CMS-470, n. 300, Bairro Itapavussu, CEP
13151-352,
Cosmópolis/SP – Brasil
T.E. +54 19 3872-8288

DURACION DEL PROTOCOLO

Artículo 22° - El presente Protocolo tendrá vigencia a partir de su firma y regirán por el plazo dispuesto en el Artículo 2°.

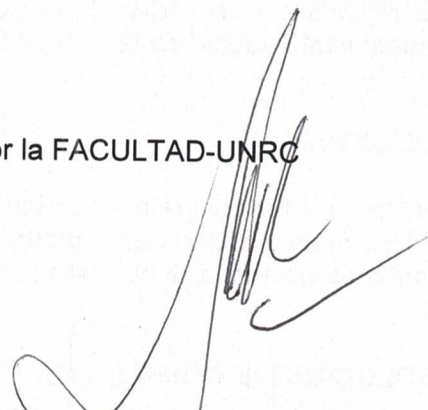
En prueba de conformidad se firman tres (3) ejemplares de un mismo tenor y a un solo efecto, a los xxxxxx días del mes de xxxxxx de 2021

por la EMPRESA



Dra. PAOLA RITA BEASSONI
Decana Fac. Cs. Exactas Fco-Qcas v Nat.

por la FACULTAD-UNRC



Dra. MARISA ROVERA
Decana Fac. Cs. Exactas Fco-Qcas v Nat.



ANEXO I

PROTOCOLO DE TRABAJO ENTRE LA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO y Stoller do Brasil LTDA

Plan de Trabajo

El **Objetivo general** del presente protocolo de trabajo se basa en la validación y análisis funcional de un activador rizosférico [Rizo-stimulate®] para el tratamiento del cultivo de soja (*Glycine max* L [Merr.]) y maíz (*Zea mays* L.) en condiciones agronómicas.

Para ello se consideran los siguientes **objetivos específicos**:

1. Validar la formulación de un activador rizosférico conteniendo diferentes principios activos y moléculas con actividad biológica específica y sinérgica, con otros productos desarrollados por la empresa para los cultivos de interés.
2. Analizar el impacto de la aplicación de la formulación sobre la diversidad de microorganismos presentes en la rizosfera de plantas de soja y maíz en condiciones controladas de laboratorio. Análisis metagenómico y microbiológico..
3. Analizar el impacto de la aplicación de la formulación sobre la capacidad de los microorganismos presentes en la rizosfera de plantas de soja y maíz para promover el crecimiento y desarrollo vegetal en condiciones controladas de laboratorio. Análisis fisiológico en cámara de cultivo.
4. Analizar el impacto de la aplicación de la formulación sobre la capacidad de los microorganismos presentes en la rizosfera de plantas de soja y maíz para promover el crecimiento y desarrollo vegetal en condiciones de cultivo. Análisis agronómico.

Los objetivos mencionado se basan en las siguientes **Hipótesis** de trabajo:

Hipótesis 1. El microbioma rizosférico de plantas de soja y maíz puede ser modificado (selección) y sujeto a un proceso de activación por la adición de compuestos con actividad biológica específica en el momento del establecimiento.

1. Metodología

Fase experimental O1: Validar la formulación de un activador rizosférico en base al análisis de diferentes principios activos y moléculas con actividad biológica específica y sinérgica con los demás productos desarrollados por la empresa para los cultivos de interés.

1.1. Desarrollo y evaluación de la formulación

Para preservar la confidencialidad del proyecto, la formulación del activador rizosférico así como la dosis de aplicación recomendadas serán informadas por la empresa en un documento independiente al presente plan de trabajo. Las consideraciones referentes a la selección de los compuestos que forman parte de la formulación se incluirán en el mencionado documento.

1.2. Fase experimental O2: Analizar el impacto de la aplicación de la formulación sobre la diversidad de microorganismos presentes en la rizosfera de plantas de soja y maíz en condiciones controladas de laboratorio. Análisis metagenómico.

1.2. 1. Análisis metagenómico y de actividad biológica

1.2.1.1. Toma de la muestra de suelo

Para el desarrollo del ensayo serán obtenidas muestras de suelo provenientes del Campo Experimental de la Universidad Nacional de Río Cuarto, en el Departamento Río Cuarto de la provincia de Córdoba. Los cultivos a partir de los que se realizará la toma de muestra serán maíz (*Zea mays* L.) y soja [*Glycine Max* L. (Merr.)] en estadios de desarrollo vegetativo tardío (V5-V6) o reproductivo (R1-R3).

1.2.1.2. Análisis físico-químico y acondicionamiento de la muestras de suelo

Como primer abordaje metodológico, se removerá la materia orgánica ubicada en la región superficial de la zona de muestreo. Luego, se tomará la muestra de la región rizosférica (horizonte A). Para llevar a cabo este paso, se utilizará una pala. Previo al ensayo, el suelo muestreado, se tamizará para descartar restos de raíces, piedras y otros elementos no deseados. El análisis físico-químico del suelo se realizará de acuerdo a los procedimientos estándares para muestras de suelo de uso agrícola en los que se determinará el contenido de Nitrógeno y N como nitrato, Materia Orgánica, Fósforo, pH, Calcio, Magnesio, Sodio, Potasio, el CIC, sales solubles, Textura, Arena, Limo, Arcilla, C y N orgánico.

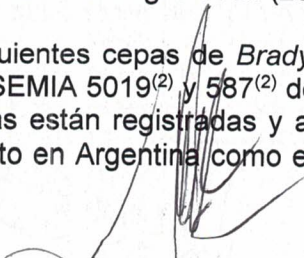
1.2.1.3. Diseño experimental

Se llevará a cabo en una cámara de crecimiento y bajo condiciones controladas con un diseño experimental al azar de 7 tratamientos y 3 repeticiones por tratamiento. Se utilizarán semillas de maíz y soja de interés de la empresa. Las serán cultivadas en macetas plásticas de 500 ml de capacidad conteniendo como sustrato el suelo rizosférico obtenido en el Apartado 2.3.1 mantenido en condiciones de capacidad de campo con riegos periódicos de agua destilada estéril. El diseño experimental considera los siguientes tratamientos:

- T1: Suelo sin semillas
- T2: Suelo sin semillas + activador rizosférico
- T3: Semillas de maíz
- T4: Semillas de maíz + activador rizosférico
- T5: Semillas de soja
- T6: Semillas de soja + activador rizosférico
- T7: Semillas de soja inoculadas con *B. japonicum*
- T8: Semillas de soja inoculadas con *B. japonicum* + activador rizosférico

La cámara de crecimiento se mantendrá con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad y un ciclo de temperatura de 30°C en condiciones de luz y 25°C en condiciones de oscuridad. Las plantas serán mantenidas por 21 días desde la emergencia (28 días desde la siembra) y una vez finalizado el experimento, se **realizará de la extracción de muestras de suelo rizosférico para el análisis metagenómico de cada uno de estos tratamientos** como se describe en Coniglio et al. (2020).

De manera conjunta, se definirá el uso de las siguientes cepas de *Bradyrhizobium*: CPAC15⁽²⁾ y E109⁽¹⁾ de *Bradyrhizobium japonicum*; SEMIA 5019⁽²⁾ y 587⁽²⁾ de *B. elkanii* y CPAC 7⁽²⁾ de *B. diazoefficiens*. Todas estas cepas están registradas y autorizadas para la formulación y producción de inoculantes tanto en Argentina como en Brasil. A



nivel vegetal, se utilizará aquella variedad de semillas de soja [*Glycine Max* L. (Merr.)] y maíz (*Zea mays* L.) de mayor interés de la empresa. Las semillas se colectarán de condiciones agronómicas de cultivo o serán tomadas de muestras de bolsas certificadas. La procedencia de las cepas a emplear se resumen a continuación: ⁽¹⁾Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola. Castelar. Argentina. ⁽¹⁾ Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola INTA-IMYZA. Castelar. Argentina ⁽²⁾ EMBRAPA soja. Londrina. Brasil

1.2.2. Análisis metagenómico

1.2.2.1. Extracción de DNA metagenómico

El ADN total se extraerá usando un el kit PowerSoil® DNA Isolation Kit (MOBIO Laboratories, Inc. USA) en su versión de 50 Preparaciones según las instrucciones del fabricante. La concentración total de ADN y su pureza se controlarán en geles de agarosa al 1%.

1.2.2.2. Análisis de la calidad y concentración de DNA

Con el fin de comprobar el rendimiento de las extracciones de DNA a partir de las muestras de suelo se realizará una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etídio (BrEt) por 40 minutos a 80 V y 100 mA.

1.2.2.3. Secuenciación del DNA

A partir de las muestras obtenidas en 2.3. se realizará el análisis metagenómico propiamente dicho. Para esto, se procederá a diluir o concentrar el DNA según la concentración de cada muestra verificada en 2.2 hasta ajustar la concentración a 20 ng/ml para el desarrollo de la reacción de PCR. Los cebadores 515F (5' GTGCCAGCMGCCGCGGTAA 3') and 806R (5' GGACTACHVHHHTWTCTAAT 3') serán utilizados para amplificar los genes 16S rRNA. La mezcla de reacción de PCR (25 µL) contendrá: 1 × solución tampón de PCR, dNTPs 200 µM, 0.2 µM de cada cebador, MgCl₂ 3 mM y ADN polimerasa Taq 2.5 U. Después de la desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min los productos de PCR serán sometidos a 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 seg, annealing a 56°C por 40 seg, alargamiento a 72°C por 1 min y extensión a 72°C por 10 min. Para secuenciar las librerías obtenidas, se realizaran los protocolos establecidos para la plataforma MiSeq de Illumina® considerando 250 ciclos en el modo pair-end.

1.2.2.4. Procesamiento de los datos

La calidad de las lecturas se verificará con FastQC (Andrews, 2010) y se analizará con las aplicaciones integradas QIIME2 (Kuczynski et al. 2012). El paso del filtro de calidad se realizará con el algoritmo DADA2 (Callahan et al. 2016). Las lecturas serán duplicadas y serán denominadas como variantes de secuencia de amplicón (ASV). El análisis de ASV difiere del análisis de OTU, donde estos se comparan con bases de datos 16S y retienen secuencias que cumplen con un límite de similitud arbitraria (generalmente 97%), lo que puede conducir a un descarte de secuencias con taxones subrepresentados en la base de datos como posibles artefactos. Por otro lado, en ASV, la asignación taxonómica se realiza utilizando un clasificador entrenado con secuencias de la base de datos Greengenes versión 13.8 (McDonald et al. 2012), donde se extrae la región específica dirigida por los cebadores 515F y 806R para construir el modelo. Las relaciones filogenéticas entre ASV se obtendrán construyendo un árbol filogenético utilizando el algoritmo FastTree (Price et al., 2010) basado en una alineación enmascarada construida con MAFFT (Katoh y Standley, 2013).

1.2.2.5. Análisis del microbioma

Las medidas de diversidad alfa para la diversidad (índice de diversidad de Shannon y la diversidad filogenética de Faith) y la uniformidad (uniformidad de Pielou) se calcularán utilizando la función QIIME core-metrics-phlogenetic, y los valores resultantes se compararán entre tratamientos por Kruskal Wallis. Para visualizar las tendencias generales de las comunidades bacterianas en general, se realizará un Análisis de Coordinación Principal (PCoA) y una agrupación jerárquica basada en la matriz de disimilitud de Bray-Curtis. La determinación estadística de las diferencias se evaluará mediante un análisis de varianza multivariante permutacional (PERMANOVA, Anderson, 2001) con 999 permutaciones aleatorias en la matriz de disimilitud de Bray-Curtis. El análisis estadístico y la visualización se realizarán de acuerdo a Oksanen et al., (2017) contenidas en el entorno R. Las diferencias microbianas se explorarán más a fondo utilizando LEfSe (Segata et al., 2011) e IndicSpecies (Cáceres y Legendre., 2009). Se usará LEfSe para identificar características biológicamente relevantes para cualquier grupo que usa Kruskal-wallis seguido de una prueba de suma de rangos de Wilcoxon para la comparación por pares, con un valor P de 0.05 como límite para determinar las características discriminantes. El contenido funcional metagenómico será predicho a partir del gen marcador de ARNr 16S usando FAPROTAX (Anotación funcional de Proxaryotic Taxa, Louca et al., 2016).

1.2.3. Actividad microbiológica

1.2.3.1 Respiración Basal

La actividad microbiológica del suelo se determinará mediante la evaluación de la producción de CO₂ por la actividad microbiana en condiciones controladas de acuerdo con el método de de Anderson (1982).

1.2.3.2 Carbono microbiano

El carbono microbiano se determinará mediante el método de esterilización y extracción, según Vance et al. (1987) a partir de muestras naturales y esterilizadas de cada tratamiento.

1.2.3.3. Coeficiente metabólico

La fracción de C-CO₂ liberado por unidad de biomasa microbiana, llamado cociente metabólico (qCO₂) se calculará de acuerdo a la siguiente ecuación de Anderson y Domsch (1990):

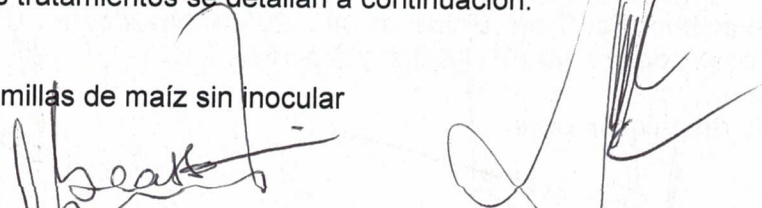
$$qCO_2 = (\mu g \text{ C-CO}_2 \text{ basal h}^{-1} \times \mu g \text{ Cmic}^{-1}) \times 10^3$$

Fase experimental O3: Analizar el impacto de la aplicación de la formulación sobre la capacidad de los microorganismos presentes en la rizosfera de plantas de soja y maíz para promover el crecimiento y desarrollo vegetal en condiciones controladas de laboratorio. Análisis fisiológico en cámara de cultivo.

1.3. Ensayos de promoción del crecimiento

Utilizando el esquema de tratamientos propuestos en la **Fase experimental 2** consideramos el desarrollo de bioensayos para plantas de soja y maíz en condiciones experimentales controladas que involucran la incorporación del activador rizosférico y la inoculación con los microorganismos normalmente utilizados en tales especies vegetales. Los tratamientos se detallan a continuación:

T1: Semillas de maíz sin inocular



- T2: Semillas de maíz sin inocular + activador rizosférico*
- T3: Semillas de maíz inoculadas con *A. brasilense*
- T4: Semillas de maíz inoculadas con *A. brasilense* + activador rizosférico*
- T5: Semillas de soja sin inocular
- T6: Semillas de soja sin inocular + activador rizosférico*
- T7: Semillas de soja inoculadas con *B. japonicum*
- T8: Semillas de soja inoculadas con *B. japonicum* + activador rizosférico*
- T9: Semillas de soja inoculadas con *B. japonicum* + *A. brasilense*
- T10: Semillas soja inoculadas con *B. japonicum* + *A. brasilense* + activador rizosférico*

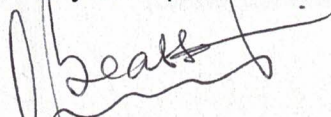
*Tales estrategias involucran alternativas metodológicas relacionadas con: [1] el momento de la aplicación del activador [10 o 5 días antes de la siembra; durante la siembra; 5 o 10 días después de la siembra]; [2] la dosis de aplicación [1, 2 o 3] y en el caso del tratamiento al momento de la siembra, [3] la aplicación sobre la semilla o en el suelo de manera conjunta con la semilla. Estas variables serán evaluadas y ajustadas en los siguientes ensayos.

1.3.1. Ensayo de crecimiento temprano

La experiencia se llevará a cabo con un diseño aleatorio de tres réplicas por tratamiento [n=45]. Para ello, 15 semillas de cada tratamiento y de cada especie serán sembradas por triplicado, en macetas plásticas de 250 ml de capacidad conteniendo el suelo agrícola obtenido en el **Apartado 1.2.2.1** como único sustrato y agua destilada esteril suministrada por riego capilar. En el caso de los tratamientos que involucren el tratamiento previo con el activador rizosférico, las macetas serán tratadas de manera exógena con la solución y mantenidas en condiciones de incubación hasta la siembra. Las plántulas serán mantenidas por 14 días en cámara de cultivo con un fotoperíodo de 16 h de luz a 30°C y 8 h de oscuridad a 25°C. Después de 21 días de cultivo serán evaluados los siguientes parámetros de crecimiento: [a] peso fresco aéreo y radical; [b] peso seco aéreo y radical; [c] longitud aérea y radical. Además se evaluará [d] la capacidad de colonizar de manera epifítica o endofítica las plántulas de cada especie [Döbereiner et al. 1995] y en el caso de las plantas de soja, se examinará el sistema radical para determinar: [d] número y localización de los nódulos; [e] contenido de nitrógeno en parte aérea, evaluado por SPAD y otros parámetros vinculados con la FBN. En este ensayo adicionalmente se considera la inoculación con bacterias que normalmente se utilizan con especies vegetales de interés.

1.3.2. Ensayo de crecimiento tardío

La experiencia se llevará a cabo con un diseño aleatorio de 5 réplicas por tratamiento [n=60]. Para ello, 15 semillas de cada tratamiento y de cada especie serán sembradas por triplicado, en macetas plásticas de 1000 ml de capacidad conteniendo el suelo agrícola obtenido en el **Apartado 1.2.2.1** como único sustrato y agua destilada esteril suministrada por riego capilar. Las plántulas serán mantenidas en invernáculo hasta completar su ciclo de crecimiento, con un fotoperíodo estacional ajustado para cada especie [suplementado con luz artificial en caso de ser necesario] y un ciclo de temperatura de 30° C en condiciones de luz 25° C en oscuridad. Tanto en R6 como una vez finalizado el ensayo, serán evaluados los siguientes parámetros de crecimiento: [a] peso seco aéreo y radical; [b] peso fresco y seco de granos. Además, en el caso de las plantas de soja, se examinará el sistema radical para determinar: [d] número y localización de los nódulos; [e] contenido de nitrógeno en parte aérea, evaluado por índice de SPAD y otros parámetros vinculados con la FBN.



Fase experimental O4. Analizar el impacto de la aplicación de la formulación sobre la capacidad de los microorganismos presentes en la rizosfera de plantas de soja y maíz para promover el crecimiento y desarrollo vegetal en condiciones de cultivo. Análisis agronómico.

1.4. Evaluación en condiciones agronómicas

Nota: Estos ensayos serán desarrollados por la empresa

Se pondrán en marcha a partir del segundo año de ejecución del proyecto y para ello se seleccionarán aquellos tratamientos con respuesta favorable sobre el crecimiento y establecimiento de la simbiosis en plantas de soja en las Etapas anteriores. Los ensayos se harán en suelos representativos y con el marco agronómico de referencia del cultivo en estudio. Estos ensayos se realizarán en diferentes localidades a los efectos de la representatividad de la información. Para los ensayos, cada parcela deberá tener al menos 5 surcos de 5 m de largo y estará distanciada a 1 o dos surcos de distancia entre tratamientos, para evitar efectos cruzados. Los parámetros de mayor importancia experimental serán aquellos directamente vinculados con la productividad del cultivo, tal como el rendimiento o la producción de biomasa. Para ello, de cada tratamiento se realizaron muestreos de un metro lineal en la etapa vegetativa (V4 o cuarto nudo) y en reproductivo avanzado (R5) y se determinará el número de nódulos, ubicación en el sistema radicular, peso fresco y seco de los nódulos, y peso seco de biomasa aérea. Al momento de cosecha de los ensayos se determinará el rendimiento ($\text{Kg}\cdot\text{ha}^{-1}$), N total en planta por Kjeldahl [Bremner, 1965] y el peso de 1000 granos de todos los tratamientos. También se determinará en grano proteína, nitrógeno por Kjeldahl, y fósforo utilizando el método descrito por Bray and Kurtz [1945]. El rendimiento en grano será corregido al 13,5% de humedad o según corresponda para cada especie. Finalmente, se evaluará la T y la HR del suelo durante el ciclo de cultivo.

1.4.1. Aplicación del producto

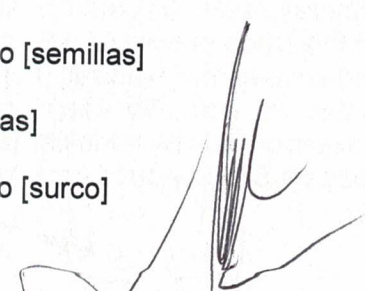
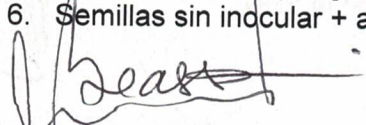
Si bien, una buena parte de las estrategias de mejora se obtendrán de la Etapa anterior del proyecto por la evaluación del efecto sobre el crecimiento y desarrollo vegetal en diferentes condiciones experimentales controladas, algunas estrategias de mejora solo podrán evaluarse en condiciones agronómicas. Por ello, hemos considerado los siguientes tratamientos para el caso del tratamiento de semillas de soja o maíz

Aplicación sobre semillas de soja

1. Semillas sin inocular
2. Semillas sin inocular + activador rizosférico [semillas]
3. *B. japonicum* [semillas]
4. *B. japonicum* + activador rizosférico [semillas]
5. *B. japonicum* + *A. brasilense* [semillas]
6. *B. japonicum* + *A. brasilense* + activador rizosférico [semillas]
7. Semillas sin inocular
8. Semillas sin inocular + activador rizosférico [surco]
9. *B. japonicum* [surco]
10. *B. japonicum* + *A. brasilense* [surco]
11. *B. japonicum* + *A. brasilense* + activador rizosférico [surco]

Aplicación sobre semillas de maíz

1. Semillas sin inocular [Semillas]
2. Semillas sin inocular + activador rizosférico [semillas]
3. *A. brasilense* [semillas]
4. *A. brasilense* + activador rizosférico [semillas]
5. Semillas sin inocular [surco]
6. Semillas sin inocular + activador rizosférico [surco]





090

Universidad Nacional de Río Cuarto
Facultad de Ciencias Exactas Físico-Quím

7. *A. brasilense* [surco]
8. *A. brasilense* + activador rizosférico [surco]

1.4.2. Aplicación al suelo previo a la siembra

1. 10 días antes de la siembra
2. 5 días antes de la siembra

1.4.3. Aplicación al suelo posterior a la siembra

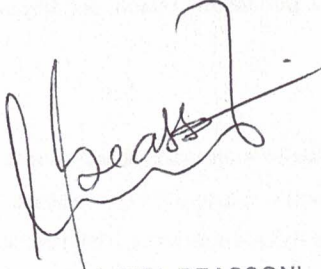
1. 5 días posteriores a la siembra
2. 10 días posteriores a la siembra

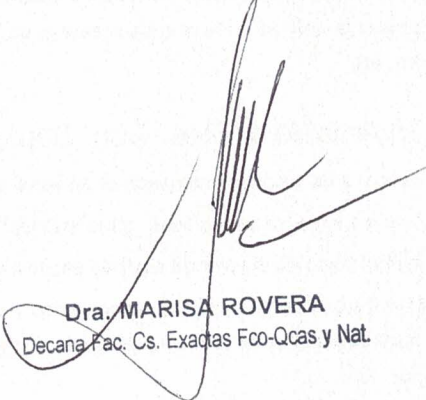
La inoculación sobre semillas se realizará de manera tradicional y respetando la dosis mínima de 3.0 ml.kg de semillas⁻¹ con una concentración mínima de cada producto microbiano de 1x10⁸ ufc/g o ml por tratamiento. En el caso de la inoculación en surco se utilizará una dosis de 10 mL·m⁻¹ [6 mL de inoculante + 1300 mL de agua desmineralizada].

2. Cronograma de actividades y entrega de informes

La FACULTAD-UNRC aportará de manera semestral un informe de avance que se pondrá a disposición de la empresa. El informe se realizará conforme a los objetivos específicos.

Objetivos	I1	I2	I3	I4	I5	I6	iF
Objetivo 1	x	x					x
Objetivo 2	x	x	x				x
Objetivo 3			x				x
Objetivo 4			x	x	x	x	x


Dra. PAOLA RITA BEASSONI
Sec. Técnica Fac. Cs. Exactas Fco-Qcas y Nat.


Dra. MARISA ROVERA
Decana Fac. Cs. Exactas Fco-Qcas y Nat.

ANEXO II

NOMBRE DEL SERVICIO A TERCERO/CONVENIO ESPECIFICO/PROTOCOLO DE TRABAJO

Protocolo de trabajo: formulación y análisis funcional de un activador rizosférico [Rizo-stimulate®]

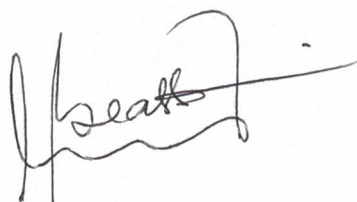
PRESUPUESTO	
Personal (1)	5.000,00
Insumos (2)	5.000,00
Equipos (3)	0,00
Gastos Generales (4)	2.000,00
Utilidades Equipo de Trabajo (5)	0,00
Utilidades Facultad (5)	0,00
Subtotal	12.000,00
Ret. UNRC (6)	3.000,00
Presupuesto Total *	15.000,00

*El presupuesto se ha confeccionado en dólares americanos (u\$s)

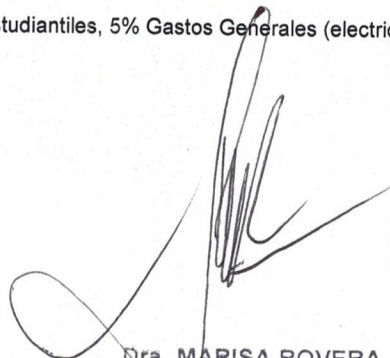
*Especificar la unidad en la que se presta el servicio ej. Por módulo, por determinación, por artículo, por hora, etc

Según Artículo 4° Res. Con. Sup. N° 117/04:

- (1) Se refiere a las asignaciones para el personal contratado que participa en la ejecución de actividades de proyecto.
- (2) Refiere a los gastos específicos, como material fungible, viáticos, pasajes, construcción de prototipos, etc.
- (3) Incluye el costo de alquiler de equipos especiales o de accesorios de equipos existentes, o de otra naturaleza.
- (4) Incluye los gastos relativos a la organización y administración de la prestación.
- (5) Se fijará sobre el costo total un porcentaje en concepto de utilidad, que las facultades y secretarías consideren apropiado, en función del interés o prioridad que asignen al proyecto y la posibilidad de generar recursos que permitan a la facultad o secretaría fortalecer políticas de vinculación social o desarrollarse en otras áreas.
- (6) Distribuido de la siguiente manera: 10% al Sistema de Becas Estudiantiles, 5% Gastos Generales (electricidad, gas, telefonía, internet, etc.) y 5% restante Programas Sociales (PEAM).



Dra. PAOLA RITA BEASSONI
Sec. Técnica Fac. Cs. Exactas Fco-Qcas y Nat.



Dra. MARISA ROVERA
Decana Fac. Cs. Exactas Fco-Qcas y Nat.