



2021 – "AÑO DE HOMENAJE AL PREMIO NOBEL DE MEDICINA DR. CÉSAR MILSTEIN"

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

RIO CUARTO, 15 OCT. 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. 134546-2, y;

CONSIDERANDO:

Que dicho Protocolo de Trabajo se encuadra en el Convenio Marco aprobado por Resolución del Consejo Superior N° 141/20 y ha sido avalado por el Departamento de Ciencias Naturales de esa unidad Académica.

Que, la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales a través del Departamento de Ciencias Naturales y la Empresa Stoller do Brasil LTDA, desarrollarán actividades para la identificación y análisis funcional de bacterias endofíticas de nódulos de soja (*Glycine max* L. [Merr.]) y la interacción con productos comerciales de la empresa, destinados al tratamiento de cultivo en condiciones agronómicas.

Que para el logro de los objetivos mencionados arriba se estructurará un Programa de Trabajo de 36 meses de duración.

Que se designa como coordinador de las actividades al Dr. Fabricio Darío Cassán (DNI: 23.436.617), docente del Departamento de Ciencias Naturales por parte de la FCEFQyN, y a la Sra. Stella Consorte Cato, Directora de Pesquisa e Desenvolvimento, CPF n. 214.083.448-82 por parte de la EMPRESA, en carácter de Responsable Legal.

Que se 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 Malina (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 Urna Milani (CPF:057.042.769-03) como miembro de la Empresa.

Que las partes convienen que los resultados que se logren, parciales o definitivos, 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.

Que se cuenta con el Dictamen favorable de la Dirección de Asuntos Jurídicos Nro.: 8880 de esta Universidad, obrante a foja 17.



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

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 19 y 20 del expediente de referencia, y atento al plazo de duración, deberá ser autorizado por el Consejo Superior de esta Universidad.

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**, Expediente Nro. 134546-2, según se detalla en el ANEXO de la presente resolución.

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

ARTÍCULO 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 SIETE DIAS DEL MES DE OCTUBRE DEL AÑO DOS MIL VEINTIUNO.

RESOLUCIÓN Nro.:

194

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

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



**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, Diretora de Investigación y Desarrollo, CPF 214.083.448-82 y ARTHUR DA COSTA MATTOS, Diretor Industrial, CPF 098.913.988-38, denominadas en conjunto las PARTES, el cual estará sujeto a los siguientes artículos:

OBJETO

Artículo 1º- : El objeto del presente protocolo de trabajo se basa en la identificación y análisis funcional de bacterias endofíticas de nódulos de soja (*Glycine max* L [Merr.]) y interacción con productos comerciales de la empresa, destinados al tratamiento del cultivo en condiciones agronómicas.

Artículo 2º- : Para el logro de los objetivos mencionados en el artículo 1º 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 3º- : 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, Diretora de Pesquisa e Desenvolvimento, CPF n. 214.083.448-82, en carácter de Responsable Legal.

Artículo 4º- : 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 miembro de la Empresa.

Artículo 5º-: 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 30.000 que se detalla en el ANEXO II. Dicho monto se abonará desde el momento de la firma del acuerdo y en pagos semestrales sucesivos de u\$s 5.000 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



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.



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

RESOLUCION DE CONFLICTOS

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

Por la FACULTAD-UNRC

.....
Firma y aclaración. Directora de Investigación y Desarrollo

.....
Firma y aclaración. Deca

.....
Firma y aclaración. Director Industrial



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 identificación y análisis funcional de bacterias endofíticas de nódulos de soja (*Glycine max* L [Merr.]) y interacción con productos comerciales de la empresa, destinados al tratamiento del cultivo en condiciones agronómicas.

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

1. **Analizar el metagenoma** de semillas de **soja** naturales o inoculadas con una o mas cepas de *B. japonicum* (a definir por la empresa) a partir de variedades comerciales de interés de la compañía.
2. **Analizar el metagenoma** de plantas [**nódulos** y **raíces**] de soja naturales o inoculadas cultivadas a partir de semillas analizadas en el **Objetivo 1** y comparar los diferentes grupos taxonómicos en cada caso.
3. Aislar e identificar bacterias endofíticas obtenidas a partir de **nódulos** de las plantas de soja empleadas en el **Objetivo 2**. Evaluar la presencia de mecanismos de promoción de crecimiento, fijación biológica de nitrógeno y asociación simbiótica en tales aislamientos.
4. **Analizar el metagenoma** de semillas de soja obtenidas a partir de plantas cultivadas en el **Objetivo 2** y comparar los grupos taxonómicos identificados en las mismas.
5. **Analizar el metagenoma** de plantas [**nódulos** y **raíces**] de soja naturales o inoculadas cultivadas a partir de las semillas analizadas en el **Objetivo 3** y comparar los diferentes grupos taxonómicos en cada caso.
6. Aislar e identificar bacterias endofíticas obtenidas a partir de **nódulos** de las plantas de soja empleadas en el **Objetivo 5**. Evaluar la presencia de mecanismos de promoción de crecimiento, fijación biológica de nitrógeno y asociación simbiótica en tales aislamientos.
7. Seleccionar uno o mas aislamientos de interés a partir de su comportamiento fisiológico y evaluar su capacidad de colonizar y promover el crecimiento de plantas de soja inoculadas con productos de la empresa y tales bacterias a partir de semillas naturales.



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

Hipótesis 1. El microbioma de las semillas de soja se hereda de una generación a otra desde la semilla. **Hipótesis 2.** En el microbioma de las semillas de soja puede haber bacterias capaces de colonizar los nódulos en plantas adultas. **Hipótesis 3.** Algunas de las bacterias que forman parte del microbioma de la semillas serían capaces de colonizar y promover el crecimiento de plantas de soja cuando son re-inoculadas.

1. Metodología

1.1 Material Biológico

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.)] 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. Condiciones de cultivo generales

[1] *B. japonicum/elkanii/diazoefficiens*: Las cepas serán reactivadas en medio Extracto de levadura-manitol [EMA] de acuerdo a Vincent [1970]. Los cultivos serán mantenidos a 30° C y 180 rpm en agitación orbital hasta alcanzar una fase exponencial tardía correspondiente a una DO₅₉₅ aproximada de 1.2. Durante esta fase se tomarán alícuotas de 100 µl y se transferirán a frascos de 100 ml de capacidad conteniendo 25 ml de medio fresco. Las bacterias serán cultivadas a 30°C y 80 rpm durante 120 horas, luego de las que se evaluará: [a] producción de biomasa [DO₅₉₅]; [b] viabilidad celular [ufc.ml⁻¹] y como control de la pureza será sembrada por agotamiento en placas de agar tripteína-soja [TSA]. Una vez probada la pureza y crecimiento adecuados de todas las cepas, los cultivos serán destinados a la extracción del material genético.

Objetivos 1-2-4-5. Estos objetivos consideran el **análisis metagenómico** de semillas o material vegetal obtenido de plantas de soja en diferentes momentos del proyecto por lo que se considerará una descripción metodológica, común en todos los casos.

2. Análisis metagenómico

2.1. Material Biológico

Consistirá de semillas naturales e inoculadas, así como nódulos y raíces [sin la presencia de nódulos] obtenidas de plantas inoculadas y sin inocular de la variedad de soja seleccionada por la empresa. Cada material de partida se acondicionará y será procesado de acuerdo a diferentes metodologías disponibles para la obtención del material genético microbiano.

2.2. Extracción de DNA metagenómico

Las muestras serán lavadas con agua destilada estéril para eliminar las partículas de tierra y otros elementos interferentes, se enjuagaran tres veces con agua estéril desmineralizada y luego se utilizarán para extracción de ADN total. El ADN total se



extraerá usando un Kit de extracción de ADN de plantas HP (Omega) según las instrucciones del fabricante. La concentración total de ADN y su pureza se controlarán en geles de agarosa al 1%.

2.3 Análisis de la calidad y concentración de DNA

Con el fin de comprobar el rendimiento de las extracciones de DNA a partir del material vegetal 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.

2.4. 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 μ L) contendrá: 1 \times solución tampón de PCR, dNTPs 200 μ M, 0.2 μ M 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 realizarán los protocolos establecidos para la plataforma MiSeq de Illumina® considerando 250 ciclos en el modo pair-end.

2.5. 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).

2.5.1 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).

3. Cultivo de soja en condiciones controladas-Fase 1

En todos los casos, se tomarán 100 gramos de semilla de soja naturales o inoculadas con dosis agronómicas [3ml.kg^{-1}] de cultivos de una o mas cepas seleccionadas en el apartado 1.1. Las semillas serán utilizadas para el análisis metagenómico descrito en el apartado 2 o serán cultivadas para obtener plantas adultas. Para ello, serán sembraran por triplicado, en macetas plásticas de 1000 ml de capacidad conteniendo vermiculita: arena:perlita [1:1:1], estéril como único sustrato y solución de Hoagland [15 %] suministrada por riego capilar. Las plántulas serán mantenidas en invernáculo hasta completar su ciclo de crecimiento con un fotoperíodo estacional [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. Una vez finalizado el ensayo, serán evaluados los parámetros de crecimiento y desarrollo de mayor interés: [a] peso seco aéreo y radical; [b] peso fresco y seco de granos. Además se evaluará: [c] la capacidad de colonización endofítica y simbiótica en las plantas inoculadas y no inoculadas [Döbereiner et al. 1995]. Para ello, en el sistema radical se evaluará: [d] número y localización de los nódulos.

3.1. Análisis metagenómico y microbiológico del material vegetal

3.1.1. Análisis metagenómico

Serán colectadas semillas, así como nódulos de las plantas obtenidas en el Apartado 3 con el objetivo de realizar un nuevo análisis metagenómico. Para ello se procederá a reproducir el procedimiento descrito en el **Apartado 2**.

3.1.2. Análisis microbiológico

En el caso de los nódulos obtenidos de las plantas del Apartado 3, se realizará el aislamiento y caracterización de bacterias endofíticas, tal como se describe a continuación. Se tomarán nódulos de raíces principales de plantas de soja y se desinfectarán por exposición a una solución de Cloramina T (1% v/v) por 10 min; etanol comercial (90 % v/v) por 5 min y 3 lavados consecutivos con agua destilada estéril. A continuación se realizará el macerado de los nódulos de manera estéril y se tomaron 20 μL del homogenato que se sembrarán en diferentes medios de cultivo: LB, EMA (Vincent, 1970), NFB (Döbereiner, 1995) con el objetivo de aislar diferentes grupos microbianos de interés. Posteriormente se seleccionarán las colonias de acuerdo al morfotipo diferencial y realizarán ensayos de secuenciación del gen 16S rRNA (Macrogen) y la identificación de mecanismos de promoción del crecimiento vegetal.

3.1.2.1. Amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA

Se amplificará completamente el gen 16S rRNA utilizando los cebadores universales 1F (5'- GAG TTT GAT CAT GGC TCA GA- 3 ') y 9R (5'- AAG GAGGTG ATC CAA CCG CA- 3') de acuerdo con Edwards et al. (1989). El ADN de cada aislamiento presuntivo será extraído por los métodos presentados previamente y se utilizará como molde para amplificación por PCR. El tamaño esperado del producto será de aproximadamente 1500 pb. La secuenciación se realizará por el Servicio de

secuenciación de MacroGen® (Corea). Las secuencias estrechamente relacionadas del gen 16S rRNA obtenidas del Genbank (NCBI) serán seleccionadas y se alinearán utilizando el programa CLUSTAL X versión 1.83 (Thompson et al. 1997). El análisis filogenético se realizará utilizando el software MEGA 6 (Análisis Molecular de Genética Evolutiva, versión 6.0) (Tamura et al. 2013) y la topología de los árboles filogenéticos resultantes serán evaluadas por métodos de Neighbor-Joining (Saitou and Nei 1987), Máxima probabilidad y Máxima parsimonia (Fitch 1971).

3.1.2.2. Mecanismos de promoción del crecimiento

1. Fijación de nitrógeno: Se utilizará la metodología propuesta por Döbereiner et al (1995). Para ello, se prepararán frascos de 50 ml de capacidad conteniendo 10 ml de medio NFb-G (modificado por la adición de glutamato de sodio 5 mM). Se inocularán con 10, 20, 50 100, 200, 500, 1000, e 2000 μ L de un cultivo en fase exponencial de los aislamientos obtenidos previamente en medio NFb-G y se incubarán en agitador rotatorio a 30°C y 120 rpm por 24 horas. Después de este período se verificará el crecimiento bacteriano y se medirá la actividad nitrogenasa a través de la cuantificación del gas etileno, como producto de la conversión del acetileno por la enzima, a través de un equipo de cromatografía gaseosa equipado con una columna Porapak N. **2. Solubilización de fosfatos:** Se evaluará de acuerdo con Katznelson and Bose (1959). Para ello, se depositará 1 μ l de cultivo en fase exponencial de crecimiento en la mitad de una placa de Petri conteniendo medio NFb modificado por la adición de $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ o $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Las placas serán incubadas a 30°C y observadas diariamente durante 4 días para ver la formación de un halo transparente alrededor de cada colonia. En caso positivo se evaluará la solubilización de fosfatos en medio líquido por la reacción colorimétrica del reactivo de Backton, que determina las cantidades de PO_4^{3-} libre en el sobrenadante del medio de cultivo. **3. Producción de sideróforos:** Se evaluará de acuerdo con Schwyn y Neilands (1987). Para ello, se depositará 1 μ l de cultivo en fase exponencial de crecimiento en la mitad de una placa de Petri conteniendo agar cromo azurol (CAS). Las placas serán incubadas a 30°C y observadas diariamente durante 4 días para ver la formación de un color naranja alrededor de la colonia. En caso positivo se cuantificará en medio líquido por el método de Arnow. **4. Actividad ACC deaminasa:** Para la detección de la capacidad de utilizar ACC como única fuente nitrogenada se procederá según la técnica descrita por Glick et al. (1995). Las bacterias se sembrarán en el medio que contiene ACC como única fuente de nitrógeno y paralelamente en el mismo medio pero sin el agregado de ACC como control de la FBN. **5. Producción de fitohormonas:** Según la metodología descrita por Perrig et al. (2007) y Cassán et al. (20092). Brevemente, fracciones de cultivo bacteriano obtenidas en medio NFb o NFb-Trp (con adición de triptófano como precursor) en fase estacionaria de crecimiento serán procesadas e inyectadas en una columna de HPLC C_{18} fase reversa (μ Bondapack, 300 x 3,9 mm, Waters Asociados, Milford, MA) en un equipo Konik Modelo KNK-500, acoplado a un sistema de espectrofotometría UV-Vis con arreglo de diodos.

4. Cultivo de soja en condiciones controladas-Fase 2

A partir de las semillas obtenidas en el Apartado 3 del presente protocolo de trabajo se realizará la propagación del material vegetal. Para ello se utilizará el mismo procedimiento descrito con anterioridad para la obtención de plantas adultas en perfectas condiciones fisiológicas. A partir de estas plantas, se realizará el análisis metagenómico a partir de nódulos y raíces no noduladas de manera independiente.

4.1. Análisis metagenómico





Se realizará tal como se describió en el Apartado 2.

4.2. Análisis microbiológico

Se realizará tal como se describió en el Apartado 3, secciones 3.1.2 y siguientes.

5. Evaluación de la respuesta vegetal a la inoculación

Uno de los objetivos de este proyecto involucra la selección de aislamientos endofíticos de plantas de soja con potencialidad de promover su crecimiento en condiciones de cultivo. Por ello, proponemos una serie de ensayos de inoculación en diferentes estadios fenológicos de la especie utilizando bacterias aisladas de nódulos de soja y seleccionadas de acuerdo mecanismos de promoción de crecimiento evaluados en el Apartado 3.1.2.2. De esta forma nuestra propuesta de evaluación se resume a continuación:

5.1. Evaluación de la germinación

La experiencia se llevará a cabo con un diseño aleatorio, de tres réplicas por tratamiento [n=300]. Para ello, 100 semillas de maíz y soja serán sembradas de manera individual, en bandejas plásticas independientes, conteniendo como soporte papel y agua destilada estériles. Las semillas serán cultivadas en cámara de germinación con un fotoperíodo de 16 h de luz a 30°C y 8 h de oscuridad a 25°C durante 7-8 días, de acuerdo a la recomendación de ISTA para la especie. El esquema de tratamientos se resume a continuación:

1-Semillas sin inocular	[control]
2-Semillas inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i>	[3.0 ml.kg ⁻¹ de semillas]
3-Semillas inoculadas con aislamiento 1 [A1] semillas]	[3.0 ml.kg ⁻¹ de
4-Semillas inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> + A1 semillas]	[6.0 ml.kg ⁻¹ de
5-Semillas inoculadas con aislamiento 1 [A2] semillas]	[3.0 ml.kg ⁻¹ de
6-Semillas inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> + A2 semillas]	[3.0 ml.kg ⁻¹ de
7-Semillas inoculadas con aislamiento n [An] semillas]	[3.0 ml.kg ⁻¹ de
8-Semillas inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> + An semillas]	[3.0 ml.kg ⁻¹ de

Al final de cada experiencia serán evaluados, como principales parámetros de promoción de la germinación, crecimiento y adaptación: [a] el porcentaje de semillas germinadas por normas ISTA [con una radícula mayor a 5 mm] y [b] el crecimiento del hipocótilo y radícula. En todos los casos, los datos serán sometidos a un análisis de varianza con test de Tuckey *a posteriori*.

5.2. Evaluación del crecimiento temprano

La experiencia se llevará a cabo con un diseño aleatorio de tres réplicas por tratamiento [n=15]. Para ello 3 semillas serán sembradas por quintuplicado en vasos plásticos de 300 mL conteniendo vermiculita estéril como sustrato. Las plántulas se mantendrán con riego capilar a base de solución de Hoagland estéril deficiente en nitrógeno y al 25% (v/v) de concentración [Hoagland y Broyer, 1936]. Las plántulas se mantendrán durante 21 días en cámara de crecimiento y con un fotoperíodo de 16 h de luz (30°C)/8 h de oscuridad (20°C) con 80% de humedad relativa. Se inoculará con cultivos puros de una cepa de referencia de *Bradyrhizobium* y se consideran semillas sin inocular como tratamientos control. Por otro lado, se evaluará la capacidad de



promover el crecimiento vegetal de los aislamientos obtenidos en el Apartado 3.1.2. Al final de cada ensayo, se medirán los siguientes parámetros como indicadores del establecimiento de una simbiosis efectiva y promoción del crecimiento vegetal [Albanesi et al. 2013]: (a) nódulos de la raíz principal (b) nódulos de la raíz secundaria (c) número de nódulos totales (d) peso seco de la raíz y parte aérea, (d) porcentaje de plantas noduladas con tres o más nódulos en la raíz principal [Burton y col. 1972].

5.3. Evaluación del crecimiento tardío

Esta etapa del proyecto se realizará en colaboración con la empresa.

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 vermiculita: arena:perlita [1:1:1], estéril como único sustrato y solución de Hoagland [15 %] deficiente en N en todos los casos suministrada por riego capilar. Las plántulas serán mantenidas en invernáculo hasta completar su ciclo de crecimiento, con un fotoperíodo estacional [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 se evaluará el sistema radical para determinar: [d] número y localización de los nódulos; [e] contenido de nitrógeno en parte aérea, evaluado por índice de SPAD, Kjeldhal [Bremner, 1965] y otros parámetros vinculados con la FBN.

6. Cronograma para la 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
Objetivo 3			X				X
Objetivo 4				X	X		X
Objetivo 5				X	X		X
Objetivo 6						X	X
Objetivo 7						X	X

Por la EMPRESA

Por la FACULTAD-UNRC

.....
Firma y aclaración. Directora de Investigación y Desarrollo

.....
Firma y aclaración. Decana

.....
Firma y aclaración. Director Industrial

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



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

ANEXO II

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

Protocolo de trabajo: identificación y análisis funcional de bacterias endofíticas de nódulos de soja

PRESUPUESTO	
Personal (1)	10.000,00
Insumos (2)	10.000,00
Equipos (3)	0,00
Gastos Generales (4)	4.000,00
Utilidades Equipo de Trabajo (5)	0,00
Utilidades Facultad (5)	0,00
Subtotal	24.000,00
Ret. UNRC (6)	6.000,00
Presupuesto Total *	30.000,00

*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).

Por la EMPRESA

Por la FACULTAD-UNRC

Firma y aclaración. Directora de Investigación y Desarrollo

Firma y aclaración. Decana

Firma y aclaración. Director Industrial

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



CREER...CREAR...CRECER



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

RIO CUARTO, 15 OCT. 2021

VISTO la propuesta presentada por el Departamento de Ciencias Naturales referida al dictado del Curso Extracurricular de Grado denominado "**HERRAMIENTAS DE LA GESTIÓN AMBIENTAL**"; y

CONSIDERANDO:

Que es criterio de esta Facultad garantizar la formación continua de los Estudiantes de grado brindando actividades extracurriculares.

Que dicho Curso Extracurricular de Grado será dictado bajo modalidad no presencial, y que, el mismo tiene como principal objetivo brindar las herramientas básicas para la correcta gestión del medio ambiente.

Que el curso será dictado por la Dra. Laura TIONE, quién posee antecedentes académicos y científicos específicos en la temática.

Que la propuesta surge en el marco del Proyecto de Mejora de la Enseñanza de la Biología (PROMBIO) para aportar contenidos inherentes a la formación de los futuros egresados, que amplían la oferta académica curricular.

Que el Curso está destinado a Estudiantes avanzados de Carreras de Biología y afines, que se dictan en la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales.

Que se dispone del programa analítico, el cronograma y el sistema de evaluación propuesto.

Que se cuenta con el aval de la Comisión Curricular Permanente de la Carrera de Licenciatura en Ciencias Biológicas.

Que la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales avala este tipo de actividades por considerarlas de gran importancia como instancias de formación.

Que se cuenta con el Despacho de la Comisión de Enseñanza.

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
FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES**

RESUELVE:

ARTICULO 1.- APROBAR el dictado del Curso Extracurricular de Grado denominado "**HERRAMIENTAS DE LA GESTIÓN AMBIENTAL**", destinado a estudiantes avanzados de carreras de biología y afines, que se desarrollará los días 29 y 30 de noviembre de 2021 con una carga horaria total de 10 hs., ello bajo la modalidad no presencial

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

ARTICULO 2.- Designar como Coordinadoras a las Dras. María Cecilia **PROVENZAL (DNI: 14.624.950)** y Luciana **CIBILS MARTINA (DNI: 32.680.569)** y como Profesora Responsable a la Dra. Laura **TIONE (DNI:31.248.582)**, del mencionado Curso Extracurricular de Grado.

ARTICULO 3.- Determinar que los Docentes Responsables del curso deberá elevar un informe sobre las actividades realizadas, donde conste la nómina de estudiantes inscriptos y aprobados.

ARTICULO 4.- Determinar que, a través de la Facultad, se otorgarán las correspondientes certificaciones de asistencia y/o aprobación para los participantes que den cumplimiento a las obligaciones académicas del Curso.

ARTICULO 5.- Regístrese, comuníquese. Tomen conocimiento las Áreas de competencia. Cumplido, archívese.

DADA EN LA SALA DE SESIONES DEL CONSEJO DIRECTIVO DE ESTA FACULTAD EN REUNIÓN ORDINARIA VIRTUAL, A LOS SIETE DIAS DEL MES DE OCTUBRE DEL AÑO DOS MIL VEINTIUNO.

RESOLUCION Nro. **193**



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



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