

PROYECTO FAO GCP/031/URU/GFF

“Fortalecimiento de las capacidades para la gestión ambientalmente adecuada de plaguicidas incluyendo COPs”

Carta de Acuerdo

**Mejora en la producción y registro de una cepa
del agente de control biológico
Clonostachys rosea para el control del moho gris**

Informe Final

versión preliminar

Montevideo, diciembre de 2020

Resumen

Esta propuesta apuntó a fortalecer el desarrollo comercial y registro ante el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP) de un bioinsumo en base al agente de control biológico *Clonostachys rosea*. La propuesta comprendió como objetivos específicos (1) el desarrollo de una máquina cosechadora de esporas y su puesta en funcionamiento; (2) la identificación molecular del biocontrolador necesaria para el registro como producto comercial, en el que se comprobó que efectivamente corresponde a la especie *Clonostachys rosea*; (3) los análisis sobre pureza y concentración del formulado obtenido, realizados por un laboratorio externo independiente; (4) el prototipo de etiqueta comercial preparada también como parte del dossier para el registro oficial ante el MGAP; (5) el diseño del protocolo para realizar el ensayo de eficacia y (6) los análisis de toxicidad para mamíferos, requeridos para el registro del bioinsumo. Este último punto no pudo concretarse a la fecha y los resultados de los experimentos en curso en el laboratorio Biofucal (Buenos Aires) estarán prontos a finales de enero 2021. Por tanto, este informe final tiene carácter preliminar, y esos resultados se incluirán en una nueva versión.

Los avances en los requisitos necesarios para el registro se presentan también como anexos, en el formato requerido por la Dirección General de Servicios Agrícolas (DGSA) del MGAP.

Por otro lado, se mantuvieron contactos con productores para realizar pruebas piloto de control de *Botrytis* en cultivos hortícolas en otoño-invierno 2020, que se describen.

Introducción

En el Laboratorio de Producción Vegetal del Centro Regional Sur (CRS) de la Facultad de Agronomía (Progreso, Canelones) funcionan algunos proyectos que buscan generar conocimiento y experiencias en el área de control biológico de enfermedades de hortalizas. Un proyecto contó con financiamiento ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación) a través de una herramienta denominada Validación Técnica de Idea de Negocio. Esa propuesta, llevada adelante por un equipo emprendedor formado por dos estudiantes de Facultad de Agronomía y dos egresados de Facultad de Ciencias busca el desarrollo de un biocontrolador, basado en *Clonostachys rosea* y en la evaluación de su efectividad como insumo para el control del moho gris (*Botrytis cinerea*) en cultivos hortícolas, entre otros. El CRS les dio la posibilidad de trabajar en el área microbiológica, evaluar la formulación y realizar ensayos en plantas. Tanto las instalaciones como el equipo de trabajo residente se pusieron a disposición del proyecto brindando espacio, equipamiento y tiempo.

Botrytis cinerea es un hongo fitopatógeno que ataca diferentes cultivos causando pérdidas importantes en el rendimiento, y por tanto económicas, principalmente en horticultura, vid y especies forestales. Es un hongo saprófito y fitopatógeno con un amplio número de huéspedes, que provoca marchitamiento y senescencia de los tejidos, enfermedad conocida como moho gris (Coley-Smith et al., 1980; Elad et al., 2004). Actualmente, su control se hace a través de agroquímicos, pero muchos han disminuido su efectividad en los últimos años debido a la aparición de cepas resistentes, y su utilización conlleva riesgos ambientales. El control biológico se presenta como una alternativa importante dado que no permite la generación de cepas resistentes y tiene un menor impacto ambiental. Al ser utilizado dentro de prácticas de manejo integrado de cultivos permite la disminución de la aplicación de agroquímicos.

Clonostachys rosea es un hongo micoparásito a partir del cual se han generado controladores biológicos comerciales en distintas partes del mundo (Figura 1). En nuestro país existen pocas experiencias con la utilización de este hongo como controlador biológico y todas han sido a nivel experimental académico, en particular en el Laboratorio de Fitopatología, Departamento de Protección Vegetal (Facultad de Agronomía, Universidad de la República). *Clonostachys* es un hongo saprófito y micoparásitico que actúa aparentemente como un descomponedor secundario capaz de nutrirse de tejido necrosado vegetal, así como de otros hongos descomponedores del género. Presenta diversos mecanismos de acción como controlador como son la competencia, micoparasitismo y antibiosis. También indirectamente como inductor sistémico de la planta (Sutton and Peng, 1993; Zhang et al. 1996; Yu and Sutton, 1997; Morandi et al., 2000; Lahlali & Peng, 2014).

Mediante carta de acuerdo entre FAO y la Facultad de Agronomía, se planteó como objetivos viabilizar la producción de un bioinsumo en base a una cepa de *Clonostachys rosea*, y desarrollar los elementos para el registro ante el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP) como bioinsumo, descriptos en la resolución 688/2013.

La propuesta comprendió los siguientes objetivos específicos (productos):

Producto 1	Diseño de máquina para producción de bioinsumo Pruebas moleculares de la cepa a registrar
Producto 2	Descripción detallada del protocolo de producción industrial del controlador biológico. Calidad del producto: concentración de principio activo y contaminación por bacterias heterótrofas totales, evaluadas en un laboratorio externo.
Producto 3	Ensayos de toxicidad para mamíferos (laboratorio especializado) Prototipo de etiqueta
Producto 4	Relatoría técnica-científica para el registro Propuesta de ensayo de eficiencia agronómica

Los análisis de toxicidad para mamíferos requeridos para el registro del bioinsumo no han finalizado a la fecha de elaboración de este informe. Los resultados de los experimentos en curso en el laboratorio Bio Fucal (Buenos Aires) estarán prontos a finales de enero 2021. Por tanto, este informe final tiene carácter preliminar, y esos resultados se incluirán en una nueva versión.

Para el registro se requiere elaborar una relatoría técnico-científica (Resolución 688/213), que debe ser presentada como anexos a la solicitud de registro, con el siguiente detalle:

- Anexo I: Información sobre el ACBM
- Anexo II: Información sobre Producto Técnico y Producto Formulado
- Anexo III: Información toxicológica y ecotoxicológica
- Anexo IV: Requisitos para validación de eficiencia agronómica del PMF a desarrollar en condiciones nacionales e informe final
- Anexo V: Seguridad
- Anexo VI: Envases y embalajes propuestos para el producto formulado
- Anexo VII: Etiqueta

Los avances en la información necesaria para el registro a través de esta Carta de Acuerdo se presentan en el formato requerido por el MGAP en un archivo adjunto a de este documento.

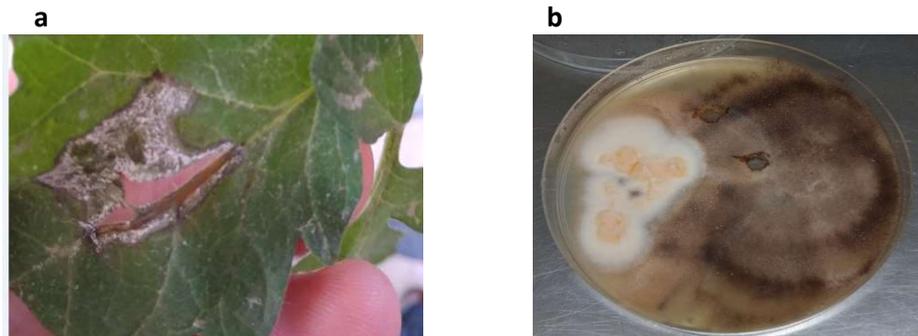


Figura 1. (a) Esporulación de *Clonostachys* sobre herida inoculada con *Botrytis*. **(b)** Cultivo dual de *Botrytis* vs *Clonostachys*, con crecimiento más rápido de *Botrytis* que luego es micoparasitada.

Producto 1.1: Mecanización del proceso productivo del formulado

Diseño de la máquina cosechadora de esporas

El diseño de la máquina fue acordado con la empresa Deinur S.A., a cargo de los Ingenieros Alfredo Baeza y Raúl Hidalgo. La empresa tiene experiencia en el mecanizado y automatismo de diversos procesos industriales. El diseño comprendió la planificación y elección de los materiales a utilizar en la fabricación, el ensamblado, los ajustes para su puesta en funcionamiento, evaluación de su productividad y otros aspectos operativos a considerar en la instalación de la máquina.

Los técnicos solicitaron una serie de pruebas sobre la formulación del producto que se llevaron a cabo en el laboratorio del CRS en Facultad de Agronomía, que se describen en el apartado siguiente de este informe. Una vez que se obtuvieron esos resultados se realizaron reuniones con el objetivo de intercambiar ideas y discutir aspectos claves para el diseño y armado de la máquina.

Se transcribe el diseño acordado y aspectos claves sobre el funcionamiento del equipo. Se espera que el diseño y puesta en funcionamiento operativo de una máquina en el marco de esta carta de acuerdo, pueda tener replicabilidad, y pueda ser utilizado en otras experiencias de producción de bioinsumos.



Figura 2. Laboratorio de producción vegetal del Centro Regional Sur.

El objetivo principal de la máquina es, a partir del crecimiento máximo de las esporas del biocontrolador mediante su cultivo en sustrato sólido (arroz), reducir el tamaño de las partículas de arroz por corte con cuchilla a alta velocidad. La reducción será hasta que el material conteniendo las esporas pueda pasar por una grilla con la medida deseada, de modo que se obtendrá una formulación en polvo.

Componentes, funcionamiento y productividad

El dispositivo es totalmente desarmable para poder limpiar y esterilizar mediante autoclavado todas las partes que toman contacto con el material a procesar. Las dimensiones máximas de cada pieza permiten que puedan ser introducidas en el autoclave y ser colocadas en su interior para esterilización. El ensamblado de las piezas (montaje y desmontaje de la máquina) es fácil y rápido, y las piezas se ajustarán entre ellas con juntas de silicona o anillos de teflón. El equipo cuenta con una mesa de trabajo propia de acero inoxidable. Dicha mesa brindará la comodidad para apoyar el material a procesar y el material procesado (Figura 3).

La capacidad productiva del equipo se estima en 1 kg de cultivo en medio sólido por hora. Trabaja con una potencia de 1 HP, con motor monofásico de 2900 rpm. El dispositivo cuenta con elemento de protección eléctrica para el caso de un bloqueo mecánico por sobrecarga que evite el recalentamiento del motor.

Los componentes operativos de la máquina se describen en la Figura 4. El elemento propulsor es el motor eléctrico. Por encima del motor va una platina (1) que tiene un buje central por donde pasa el eje del motor, para dar giro a la cuchilla de corte.

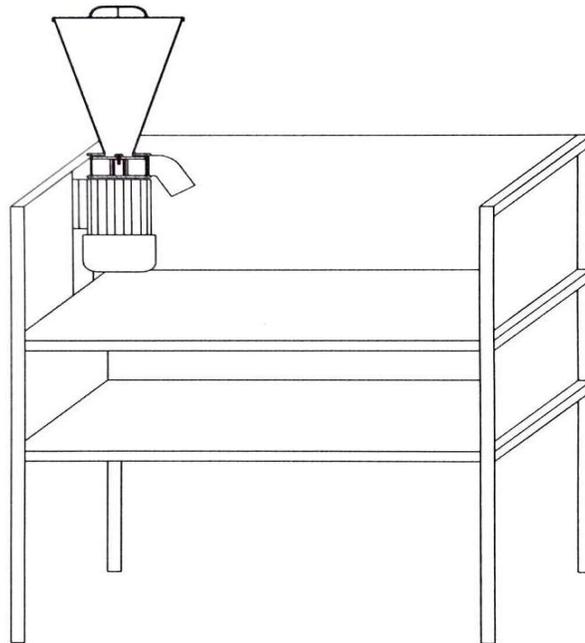


Figura 3. Diseño de la mesada de trabajo donde se incorporará la cosechadora de conidios, con dimensiones aproximadas de 1,20 m de largo x 0,60 m de ancho.

Esta platina tiene una canaleta donde encastra un cilindro (4) que da contención a la zona de trabajo. La cuchilla de corte (2) tiene filo horizontal y en las dos aristas verticales exteriores. Su diseño asegura una fuerte acción centrífuga, que proyecta el material hacia la periferia del tubo o cilindro (4), asegurando presión sobre la grilla (5) evitando que el material sea impulsado hacia la tolva (7).

El tornillo (3) es el que asegura la cuchilla al eje del motor, y que permite el desarmado fácil a la hora de ser lavado todo el conjunto. El cilindro (4) es la zona de trabajo y está contenido entre la platina inferior (1) y la platina de la tolva (7). A través de la platina de la tolva se realiza el ingreso del material a procesar. En la periferia del cilindro del área de trabajo se encuentra una ventana (9) donde allí se fija una grilla o malla. Esta grilla (5) está formada por un tejido de acero inoxidable, que permite el pasaje de las partículas de menor tamaño por sus orificios. La grilla es intercambiable, tanto para su limpieza y esterilización como para la sustitución por grillas con diferentes tramas o tamaños de orificios, si fuera necesario.

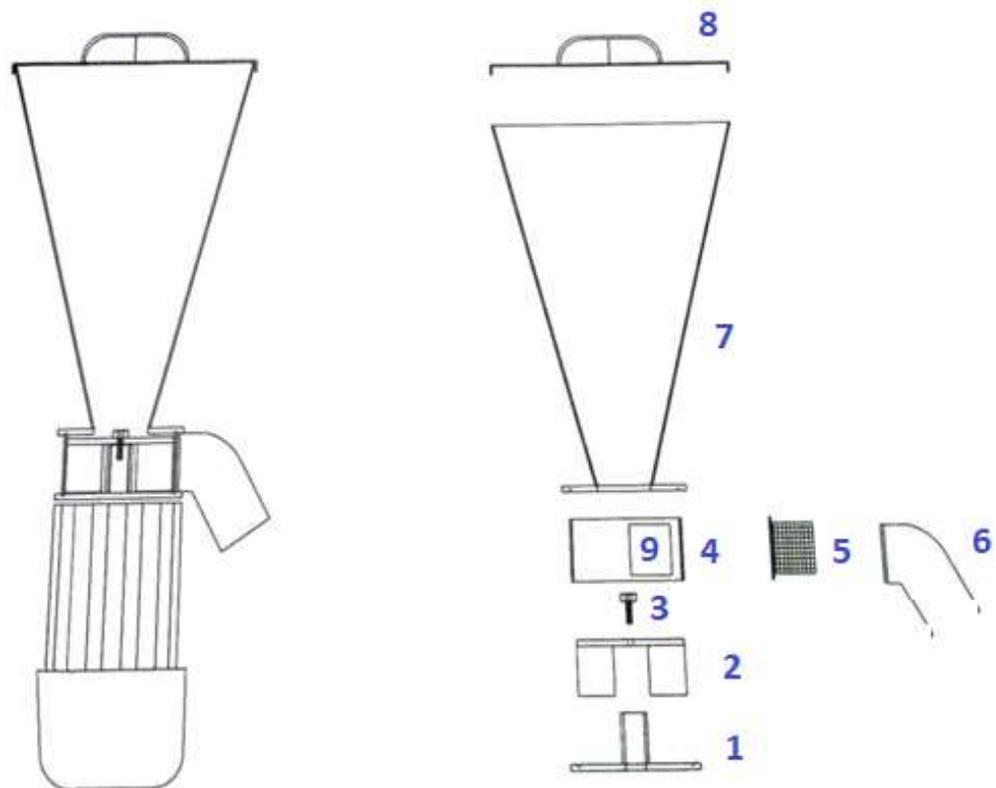


Figura 4. Croquis general de la cosechadora de conidios (izquierda), y detalle de sus componentes referenciados por número (derecha). Ver el texto para una descripción del detalle de los componentes y su función.

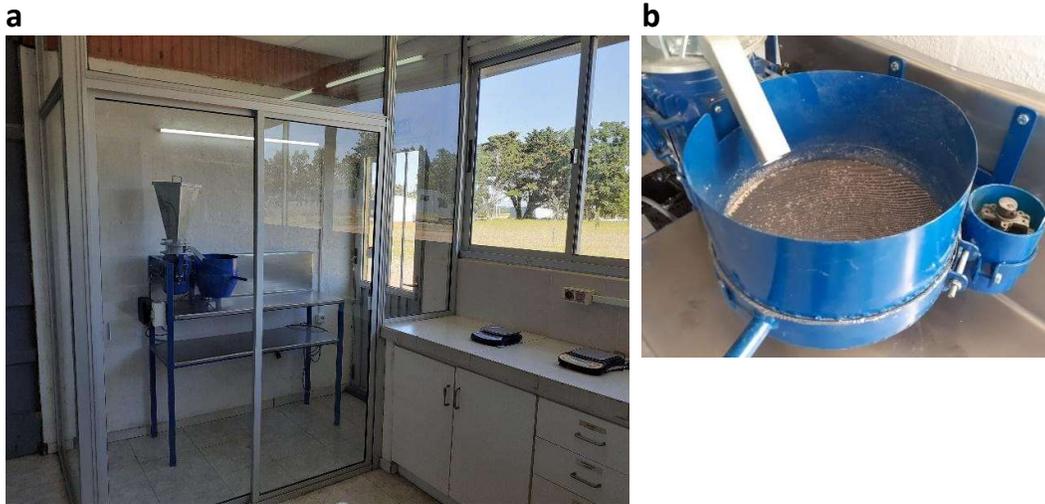


Figura 5. (a) Máquina cosechadora de esporas instalada en el laboratorio del Centro Regional Sur. **(b)** Incorporación de una tamizadora en la máquina que opera a posteriori del proceso de molienda.

Finalmente, el material que logra pasar la grilla se ve redirigido por la boquilla (6) que permite el embolsado del material cosechado. La tolva (7) permitirá la carga de material a procesar y cuenta con una tapa (8) que evita tanto el ingreso de material no deseado como la salida de las partículas finas durante la operación de la máquina. De todos modos, la máquina se instaló dentro de una mampara aislada del resto del laboratorio, para asegurar la pureza del producto.

Debido a la dificultad para obtener partículas del tamaño deseado en el primer tamiz en el cilindro de molienda, se agregó una tamizadora que permitió separar los procesos de molienda y de filtrado (Figura 5b). Esta separación permite lograr un producto en polvo con las partículas del tamaño adecuado, y volver a procesar aquellas partículas que no alcanzan el tamaño deseado (menor a los orificios de las boquillas de los equipos de asperjado sobre los cultivos). Esto permitirá un trabajo más fluido durante la operación de cosecha de conidios. Al igual que el resto de la máquina, la tamizadora es autoclavable.

Evaluación de formulaciones del bioinsumo previas a definir el diseño de la máquina

Para llegar al diseño de la máquina, se realizaron evaluaciones piloto acordadas en el intercambio con la empresa Deinur S.A. que permitieron tomar definiciones sobre las características de la máquina a construir.

En primer lugar, *Clonostachys rosea* se hizo crecer en paquetes de polipropileno conteniendo 200 g de arroz como sustrato, previamente autoclavado (Figura 6). La inoculación del sustrato se realizó con suspensiones de esporas, obtenidas a partir del rastrillado de colonias del controlador biológico crecidas en placas de Petri, en medio PDA (potato dextrose agar). La cepa utilizada fue ACC28.



Figura 6. (a) Bolsa de polipropileno con arroz como sustrato y *Clonostachys rosea* en crecimiento. **(b)** Bolsa ziploc con arroz como sustrato con *Clonostachys rosea* al final del período de crecimiento en cámara de crecimiento con condiciones ambientales controladas.

Los paquetes inoculados se incubaron por 14 días a 25°C, con un fotoperíodo de 12 h y una humedad relativa de 90 %, manteniendo un algodón en la entrada del paquete que permitiera el intercambio gaseoso y la acumulación de una humedad relativa mayor. Se removieron los paquetes una única vez en todo el período de crecimiento, y se observó un desarrollo de color rosado típico de *Clonostachys* en todos los paquetes.

Al final de la incubación, se tomaron tres paquetes y se mezclaron en una bolsa ziploc estéril para homogeneizar el producto (Figura 5b), con el objetivo de iniciar con una misma concentración de esporas por gramo de arroz los dos ensayos que se describen seguidamente.

Cosecha de conidios mediante tamizado. El primer ensayo fue la cosecha obtenida de la mezcla y fricción entre el arroz colonizado por el biocontrolador y el polvo. Se utilizaron 100 g de arroz completamente colonizado (14 días luego de inoculado), que se colocaron en una bolsa en mezcla con 100 g de almidón en polvo. En una futura formulación, el almidón cumplirá el rol de alimento para la instalación del biocontrolador sobre las hojas del cultivo, aun en ausencia de moho gris, compitiendo como antagonista con los patógenos del cultivo. Se mezcló el arroz con el polvo por dos minutos, manualmente, agitando y disgregando el arroz y el polvo dentro de la bolsa.

Después de homogeneizada, la mezcla se tamizó utilizando un colador de cocina común. Se observó que el grano de arroz remanente en el colador quedó prácticamente entero y con color rosado, lo cual indicaría la presencia de esporas remanentes en el

arroz, y que por tanto la cosecha de conidios mediante tamizado no tendría una alta eficiencia. Este procedimiento se realizó por triplicado.

Para cuantificar la concentración de esporas viables que quedaron en el formulado final luego de aplicar este método, se utilizó el recuento de colonias en placas de Petri en una dilución seriada. Para ello, se tomaron 10 gramos del polvo tamizado, y se colocaron en 90 mL de agua. Se hicieron 5 diluciones seriadas al décimo, y se plaquearon 0,1 mL de las últimas tres diluciones (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) (Figura 6a). Se observó que la dilución más informativa para el conteo fue 10^{-4} , por lo cual se utilizaron las tres repeticiones de esta placa para calcular la concentración de esporas viables. La concentración se estimó en 5×10^5 esporas por gramo de polvo formulado.

Cosecha de conidios mediante molienda. En segundo lugar, se probó la cosecha de conidios utilizando una licuadora como elemento de molienda del cultivo sólido en arroz como sustrato. Se utilizaron las mismas proporciones de arroz crecido, proveniente del pool común mezclado de 3 paquetes inicialmente de 200 g cada uno más almidón (100 g de cultivo en arroz + 100 g de almidón). También se realizaron triplicados para estas pruebas de cosecha de conidios. Se licuó el arroz y el almidón en seco por 1 minuto a la velocidad mínima en una licuadora Phillips doméstica. Al tratarse de material seco, se observó que se debía mover la licuadora cada diez segundos buscando que la totalidad del sólido entrara en contacto con las cuchillas de la licuadora. Luego de la molienda, se coló la mezcla de arroz y polvo con el mismo colador de cocina doméstico utilizado en la prueba anterior. Se observó que el arroz remanente en el colador fue de menor tamaño y de color blanco, por lo cual inferimos que este método logró una eficiencia mayor en la extracción de esporas que con el tamizado simple.

Se realizó el recuento en placas de Petri para cuantificar el número de esporas viables luego de obtener el formulado en polvo con este método. En la Figura 6b se observa que la concentración de colonias en placas fue mayor que con el método anterior (presentado en Figura 6a). En este caso, se estimó que la concentración de esporas alcanzada en el producto final fue de 5×10^6 esporas por gramo de polvo. Por tanto, la concentración de esporas en la formulación obtenida con esta metodología fue diez veces superior al método descrito anteriormente (se pudo mejorar en un orden la concentración del producto final).

En conclusión, en función de la concentración de esporas viables en el producto en polvo final, y a la disminución en los residuos desechados generados en el proceso, concluimos que la forma más eficiente para operar la máquina para la formulación de controladores biológicos sería a través de una moledora que rompiera el grano de arroz. Este método logra mayor desprendimiento y cosecha de esporas en el producto final. A su vez, la velocidad de giro debería ser relativamente baja para no romper las esporas en una proporción significativa.

Por otra parte, la molienda debería continuar con un paso de tamizado de las partículas, ya que por la acción de molienda de la máquina no se llega al tamaño de partícula necesario para una formulación en polvo a partir de la totalidad del material sólido de cultivo conteniendo el agente de control biológico.

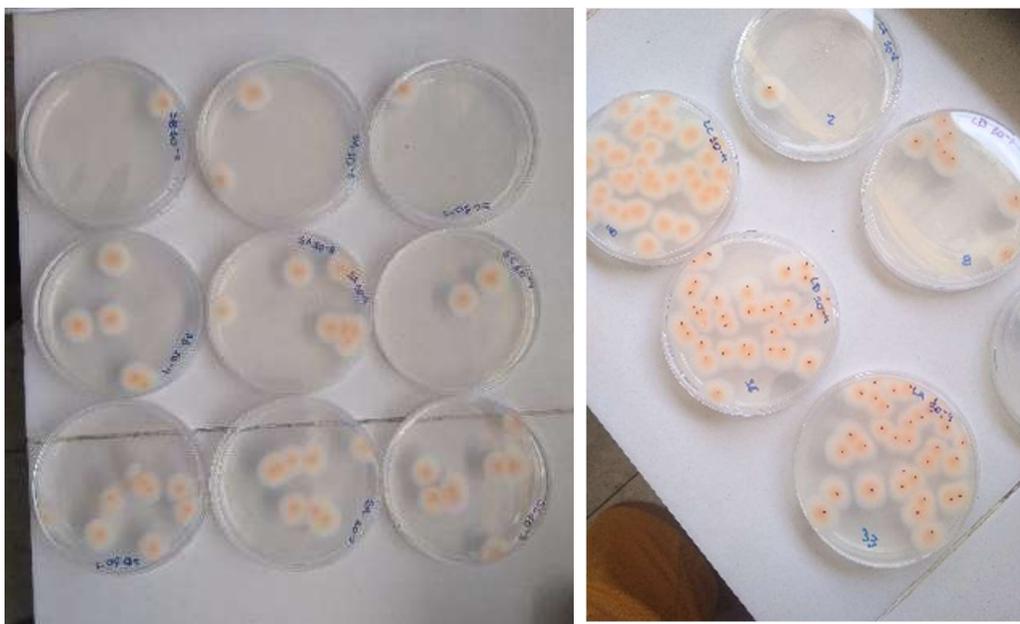


Figura 6 (a). Recuento de colonias en placas de Petri del formulado de *Clonostachys rosea* obtenido mediante el primer ensayo de tamizado, por triplicado, con diferentes diluciones seriadas (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}). **(b)** Colonias en placas de Petri del formulado obtenido mediante la prueba de molienda forzada del cultivo sólido, por triplicado, y con diferentes diluciones seriadas (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}).

Producto 1.2: Identificación molecular del agente de control biológico

El objetivo de esta parte del trabajo fue la identificación molecular del biocontrolador, a fin de cumplir con los requisitos establecidos para su registro como agente de control biológico ante la Dirección de Servicios Agrícolas del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP).

El ADN de *Clonostachys rosea* fue extraído por raspaje del micelio de una colonia pura luego de 10-14 días de crecimiento en placas de Petri con PDA (Oxoid, TM) como medio de cultivo, de acuerdo al protocolo de Lee and Taylor (1990). El ADN fue utilizado para amplificación por PCR de las regiones ITS1-ITS2 y la subunidad 5.8S del ADN ribosomal mediante los cebadores ITS4 e ITS5 (O'Donnell, 1997). Estas regiones genéticas son muy conservadas y las variantes que se observen tiene valor taxonómico evolutivo en la diferenciación de especies.

Extracción y amplificación del ADN fúngico

Para la extracción de ADN se realizó en primer lugar un macerado del micelio con un buffer de lisis, posteriormente agregado de K proteinasa, y se sometió a calentamiento (60 °C durante 30 minutos).

Las proteínas fueron precipitadas con el agregado de NaCl y CTAB 1/10. Luego la suspensión fue tratada con SEVAG (cloroformo + alcohol isoamílico) por 30 min a 0 °C. Finalmente, se realizó una centrifugación de 10 minutos a 9000 g y se recuperó el sobrenadante conteniendo ADN. Se utilizó la enzima RNAasa para la obtención de ADN únicamente. El ADN fue precipitado mediante la adición de isopropanol. Luego se realizó otra centrifugación, se retiró el sobrenadante y se dejó evaporar el isopropano. El pellet de ADN se resuspendió en agua para la reacción de PCR.

Los parámetros de ciclado de PCR utilizados para la amplificación de las regiones ITS fueron los siguientes: un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 minutos; 35 ciclos con una fase de desnaturalización de 1 min a 94 °C, una fase de hibridación de 45 seg a 50 °C, y de extensión durante 1 min a 72 °C); seguidos de un ciclo de extensión final de 5 min a 72 °C (Corallo, B., et al. 2019).

Los productos de amplificación de la PCR fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa 1,0% en buffer de corrida TBE con EZ vision®One (Amresco®) bajo transiluminador UV. Luego de esto, fueron purificados y secuenciados en ambas direcciones utilizando los mismos cebadores que para la amplificación, en un secuenciador automático ABI 3730XL mediante servicio de la empresa Macrogen Inc., (Korea).

Construcción de un árbol filogenético a partir de las secuencias obtenidas

En primera instancia, se utilizó el programa BLAST+ para alinear las secuencias obtenidas contra secuencias depositadas en la base de datos no redundante internacional NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA). Se utilizaron los cinco alineamientos de la base de datos con mayores valores de identidad como secuencias de referencia para realizar un árbol filogenético, que es la metodología más aceptada para la asignación de una determinación de especie a una cepa estudiada.

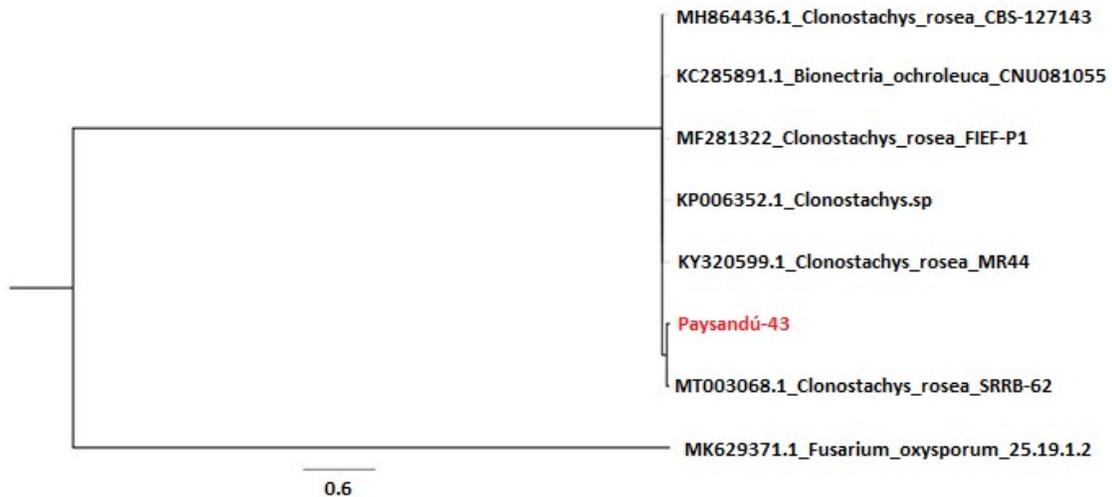


Figura 7. Árbol de distancias filogenéticas basado en la secuencia de la región ITS.

Asimismo, se descargó de la misma base de datos la secuencia correspondiente a ITS1-ITS2 de una cepa de *Fusarium oxysporum*. Esta especie también pertenece al orden *Hypocreales* pero no a la misma familia, por lo cual se utilizó como grupo externo del árbol filogenético a construir.

Las secuencias fueron alineadas utilizando el software Seaview (v. 4.6.3) (PRABI-Doua, Pôle Rhône-Alpes de Bioinformatique Site Doua, France). El alineamiento fue construido utilizando el algoritmo Muscle. El árbol filogenético fue construido utilizando el mismo software Seaview, con el algoritmo PhyML, con 100 bootstraps de repetición.

Resultados

El árbol filogenético obtenido se muestra en la Figura 7. La secuencia de la cepa de Uruguay, Paysandú 43 (indicada en rojo en la figura), se agrupó con secuencias de *Clonostachys rosea* de referencia de la NCBI. Varias de las secuencias obtenidas de la base de datos no tienen muy buena clasificación taxonómica en sus datos asociados. Sin embargo, todas pertenecen al género *Clonostachys*. La cepa de nuestro interés (Paysandú 43) se ubicó genéticamente muy cercana al aislamiento SRRB-62 de *Clonostachys rosea*. La información de las secuencias genéticas del aislamiento SRRB-62 fueron depositadas en enero 2020 por Aldossari, Toner, y Ishii (Minnesota, USA). Estos autores destacan la habilidad de ésta y otras cepas para utilizar nitratos (NO_3^-) y liberar nitrógeno gaseoso (N_2O), y por tanto destacan el potencial que tiene para bioremediación en suelos con contaminación de nitratos (Aldossari et al. 2019).

Por otro lado, contamos con la identificación morfológica de las estructuras reproductivas características de esta especie. *Clonostachys rosea* presenta conidios primarios verticiliados y conidios secundarios peniciliados (Schroers et al., 1999). Además el micelio presenta un color salmón característico en colonias afelpadas homogéneas. Estas características han sido corroboradas en la cepa de nuestro interés, por lo cual, en base a la información molecular y morfológica, concluimos que corresponde a una cepa de *Clonostachys rosea*.

Producto 2.1: Protocolo de producción mecanizado del formulado

Una vez concluida la construcción y el testaje operativo de la máquina, se instaló en el Laboratorio de Producción Vegetal del Centro Regional Sur para comenzar con las pruebas de adaptación del proceso productivo. La máquina se instaló rodeada de una mampara, con lo cual se protege la pureza del producto obtenido, a la vez que se evita la diseminación de sus esporas al laboratorio.

El mayor inconveniente y ajuste en la puesta a punto ha sido la variabilidad en el nivel de humedad del cultivo de *Clonostachys rosea* en arroz. En algunos lotes en los cuales el contenido de humedad resulta mayor que el contenido óptimo, el proceso de molienda no se produce correctamente y ocurre la formación de empastados en lugar de polvo. Este inconveniente se ha superado agregando un paso de secado del cultivo del hongo en arroz previo a su procesamiento en la máquina.

El protocolo de producción actual se presenta en Anexo 1. Se inicia con la multiplicación en placas de Petri de cultivos puros de *Clonostachys rosea*, con la cepa Pay-4-3 utilizada en este proyecto. A partir de cultivos en placas de Petri completamente desarrollados, se toman pequeños trozos de la colonia para inocular las bolsas de polipropileno conteniendo unos 200 g de arroz, previamente esterilizadas en autoclave. Las bolsas inoculadas se colocan en estufas de crecimiento a 25°C, 99% de humedad relativa y con un fotoperíodo de 12 horas (Figura 8).

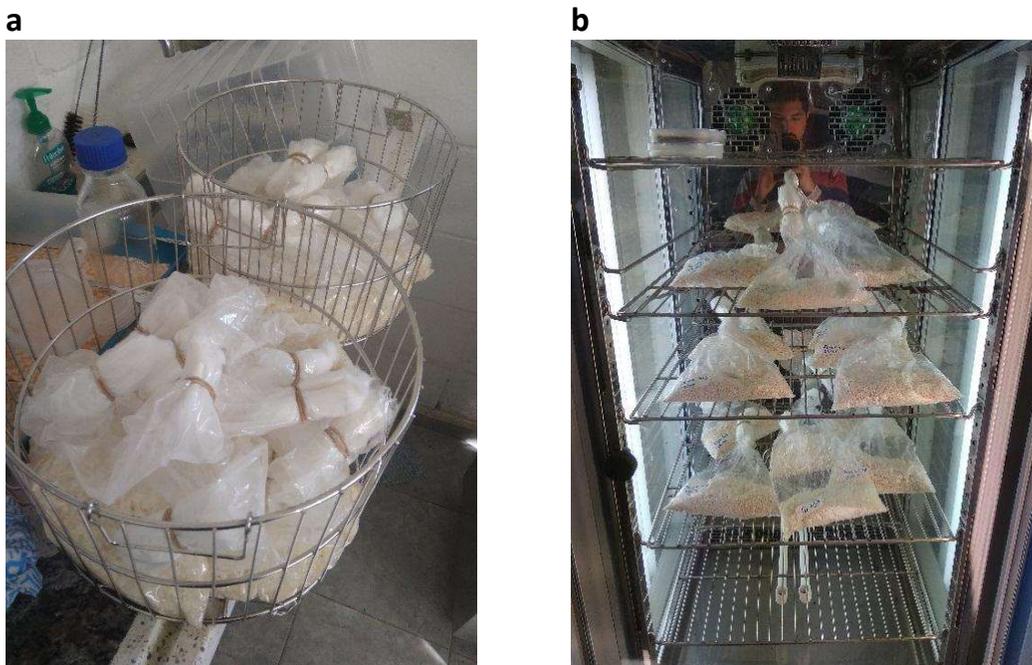


Figura 8. (a) Canastos del autoclave con paquetes de arroz luego de la esterilización por vapor a 124 °C. **(b)** Paquetes de arroz inoculado con un crecimiento de 14 días en estufas de crecimiento con temperatura, humedad relativa y fotoperíodo controlado. Desarrollo del color anaranjado típico de la esporulación del biocontrolador sobre el arroz.

El cultivo del hongo en arroz requiere un período de 15 días, con dos momentos de remoción manual de las bolsas para favorecer el crecimiento uniforme del hongo sobre el sustrato. Una vez completado el crecimiento, se realiza un paso de secado durante 30 minutos a 40 °C. Luego de esto, se disgrega el arroz con micelio y esporas del hongo y se mezcla con las cantidades ajustadas de polvos excipientes utilizados en el formulado. Esta mezcla disgregada es la que se introduce en la máquina que realiza la molienda y filtrado de esporas.

A través de la incorporación de la máquina al proceso productivo creemos que el cuello de botella actual en la producción corresponde al paso de crecimiento del ACB en arroz, y ya no al proceso de cosecha de conidios. La disponibilidad de la máquina aumenta nuestra capacidad de producción (Figura 9). A su vez, en la etapa de cosecha manual de conidios se mezclaba el cultivo del hongo en arroz con los excipientes de manera manual y luego se tamizaba. Esto generaba volúmenes importantes de un subproducto de arroz que no pasaba el filtro, con partículas de mayor tamaño. A partir de la incorporación de la máquina y a través del proceso de molienda, el subproducto que se genera es mínimo (Figura 10).

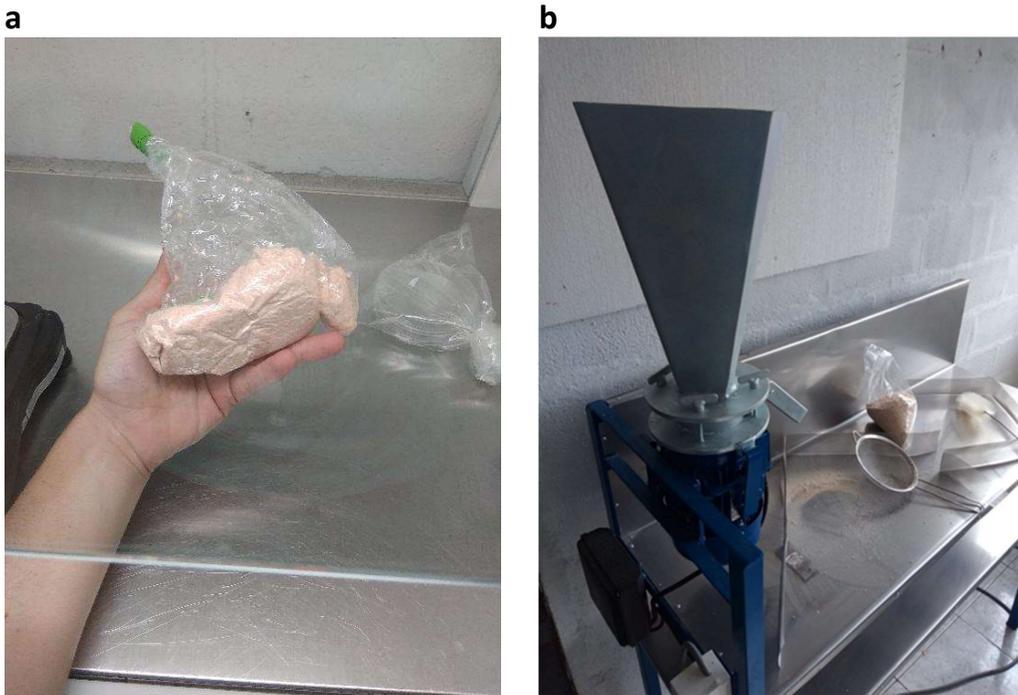


Figura 9. (a) Aspecto de un paquete del controlador biológico *Clonostachys rosea* luego de 14 días en cámara de crecimiento y previo a su cosecha. **(b)** Máquina cosechadora de conidios instalada a partir de este proyecto en el Laboratorio de Producción Vegetal del Centro regional Sur (CRS) de la Facultad de Agronomía.

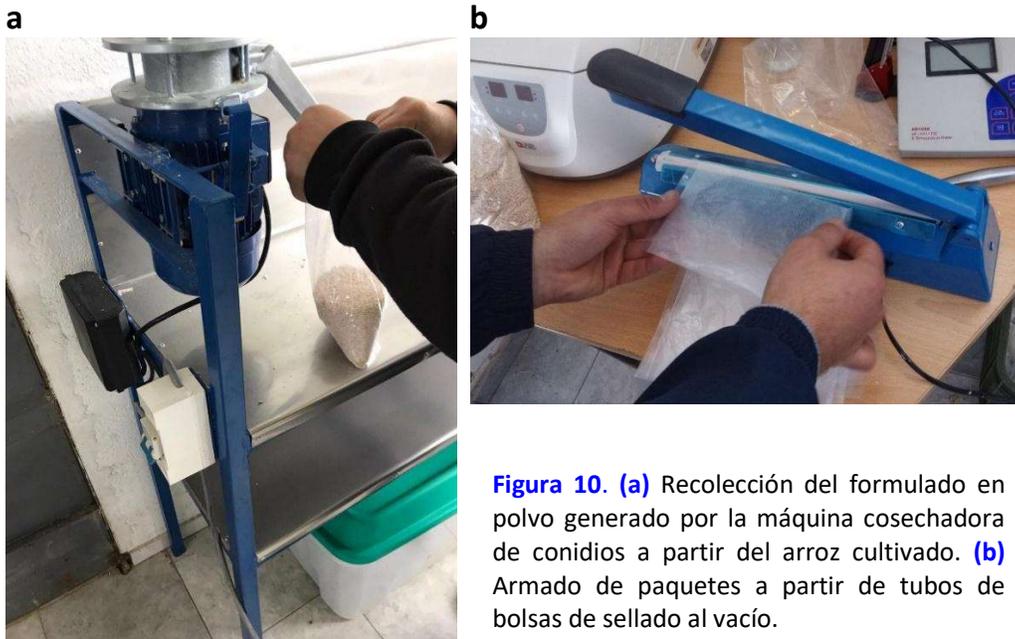


Figura 10. (a) Recolección del formulado en polvo generado por la máquina cosechadora de conidios a partir del arroz cultivado. **(b)** Armado de paquetes a partir de tubos de bolsas de sellado al vacío.

La evaluación del formulado en las condiciones de producción es un desafío, ya que no es algo fácil testear los resultados que tendrá en las condiciones ambientales variables de los cultivos. Alternativamente, hicimos evaluaciones en laboratorio mediante placas de Petri de formulado-agar. Cada formulado fue diluido en el volumen de agua recomendado para una aplicación en cultivos comerciales, y se solidificó utilizando agar. A partir de esto, se realizaron cultivos duales con *Clonostachys* y *Botrytis* tratando de dilucidar en cuál de los cultivos duales la interacción era más favorable al biocontrolador. A partir de estas pruebas decidimos añadir bicarbonato de sodio al formulado en cuestión y eliminar el resto de los nutrientes (almidón y leche en polvo).

El conjunto de estos ensayos y pasos de producción nos han permitido elaborar un protocolo de producción estandarizado (Anexo 1). El protocolo puede sufrir futuras modificaciones menores, pero creemos que en gran parte se encuentra definido. Lo que se busca con la definición de este protocolo es la obtención de un producto estable y estandarizado.

Producto 2.2: Ensayos de pureza y concentración del producto final

Los ensayos de pureza y concentración del agente de control biológico son parte de los requisitos para el registro ante el MGAP, establecidos en la resolución 688/2013 que describe los requerimientos para el registro.

Para cuantificar la concentración final del agente activo en la formulación se realizaron pruebas internas en el Laboratorio del Centro Regional Sur. En un principio, se controló la concentración de esporas generadas durante el paso de molienda del cultivo fresco en arroz. Una de las preocupaciones era si la molienda pudiera bajar la concentración de esporas viables en el formulado. Contrariamente, al recuperarse la totalidad del cultivo fresco en la molienda, sin generar subproductos, se logró aumentar la concentración final de esporas en comparación con el proceso de mezcla y tamizado sin molienda.

Al comprobar que los diferentes pasos fueron optimizados y que el formulado logrado era estable, se decidió continuar con los ensayos de pureza y concentración del formulado. El ensayo de pureza consiste en determinar cuantitativamente la presencia de microorganismos contaminantes. Las determinaciones comprenden el recuento de mesófilos aerobios viables y ausencia de *Escherichia coli* y coliformes, ya que esas son las evaluaciones oficiales realizadas para el registro ante el MGAP, porque son indicadores de los microorganismos potencialmente patógenos para humanos.

Para ello, se hicieron diluciones seriadas al décimo en agua a partir de 10 g del formulado comercial. De cada dilución se sembró en placa de Petri 1 ml incorporado en el medio de cultivo TSA (Trypticase Soy Agar). Las placas se incubaron por un período de tres días a 35,5°C en condiciones aerobias.

Estos ensayos se realizaron en primer lugar en el Laboratorio de Producción Vegetal del CRS (Facultad de Agronomía) por nuestro grupo de trabajo. Determinamos que el recuento de microorganismos contaminantes era mayor al límite indicado por el MGAP. Consecuentemente, se trabajó para determinar el origen de los contaminantes considerando cada uno de los componentes del formulado. Se evaluó el contenido de mesófilos en el arroz, en el talco y en el bicarbonato de sodio, y se concluyó que la mayor carga de mesófilos provenía del arroz. Este resultado nos llevó a aumentar la temperatura y el tiempo de esterilización del arroz en autoclave, previo a la inoculación del arroz para el cultivo del biocontrolador a escala comercial. A partir de esto logramos obtener niveles de mesófilos dentro de los límites determinados por el MGAP.

Para determinar la concentración de esporas viables de *Clonostachys rosea* en el formulado final se utilizó el recuento de hongos y levaduras en superficie sobre SDA (Sabouraud Dextrosa Agar) con el agregado de Cloranfenicol 2,5 % en placas de Petri. Se hicieron diluciones seriadas al décimo en agua estéril a partir de 10 g del formulado final, y se sembraron 100 µL por placa con rastrillo estéril de cada dilución. Las placas fueron incubadas por un período de tres a cinco días a 25 °C en condiciones aerobias.

Una vez que los resultados fueron satisfactorios en nuestras determinaciones, se envió un paquete con el formulado final a MicroLab (<http://microlab.com.uy/>),

Montevideo, como laboratorio de análisis microbiológico externo. Los ensayos fueron realizados conforme a la norma de USP 41 (61), la *United States Pharmacopeia* Capítulo 61, análisis microbiológico de productos no estériles: test microbianos cuantitativos. Se adjuntan los informes técnicos que contienen los resultados de estos ensayos (Anexo 2):

- La concentración de esporas de *Clonostachys* fue estimada en $2,7 \times 10^7$ ufc/g, muy superior a la concentración objetivo de 1×10^6 ufc/g en el formulado.
- La concentración de aerobios mesófilos fue estimada en 1×10^5 unidades formadoras de colonia (ufc) por gramo de formulado. Esta concentración está en el límite máximo aceptado para el registro (concentración $< 10^5$ ufc/g, por lo que se continuará trabajando en el protocolo de producción para reducir la presencia de contaminantes).
- El análisis determinó la ausencia de *Escherichia coli* y de coliformes.

En diciembre 2020 también se entregó una muestra del bioinsumo formulado al laboratorio oficial de la DGSA-MGAP, para comprobar la pureza y parámetros físicos del producto. A la fecha no hemos recibido los resultados del análisis.

Producto 3.1: Análisis de toxicidad para mamíferos

El elemento central del Producto 3 es el **análisis de toxicidad para mamíferos**, que junto con la adquisición de la máquina eran los dos destinos principales del apoyo económico recibido del proyecto GCP/031/URU/GFF. El análisis de toxicidad para mamíferos es requerido para el registro de ACB ante el MGAP. Comprende un ensayo de la “toxicidad oral aguda”, la “toxicidad dérmica agua” y “sensibilización” (Buehler test).

Inicialmente, se preveía realizar este análisis en el laboratorio de toxicología de Facultad de Química (Universidad de la República). Durante 2020, ese laboratorio estuvo cerrado durante semanas debido a las restricciones para la movilidad y el acceso a los edificios universitarios, y resultó imposible que el análisis se realizara en los tiempos previstos de ejecución. Por recomendación del personal técnico responsable de registros en el MGAP, el análisis se está realizando en el laboratorio Bio Fucal, Buenos Aires, ([http://www.fucal.com.ar/Division Ensayos del Laboratorio Bio Fucal.htm](http://www.fucal.com.ar/Division%20Ensayos%20del%20Laboratorio%20Bio%20Fucal.htm)). La figura 11 da cuenta del envío de la muestra, y en las páginas siguientes se presenta un formulario interno del laboratorio Bio Fucal con la descripción de las características de la muestra enviada.

Se espera incorporar los resultados del análisis toxicológico a una nueva versión de este informe final.

The figure displays two views of a FedEx International Air Waybill. The left view shows the front side with the following details:

- 1 From (please print):** Jose Avila, Sender's Name; 5090 9521, Company; MA.PU 2010, Address; MONTEVIDEO, URB/GUAY, City/Province; 1600, ZIP/Postal Code.
- 2 Your Internal Billing Reference Information:** (Optional) (Print 34 characters with leading zeros)
- 3 To (please print):** Alfredo Martinez, Recipient's Name; BIO FUCAL SA, Company; Las megalias 8to, del Viso, Address; Buenos Aires, City; Argentina, Country; 1669, ZIP/Postal Code; 30709120243, Recipient's ID number for Customs purposes.
- 4 Shipment Information:** Total Packages: 1; Total Weight: 8 lbs; Commodity Description: UN 3373, x CLO NASTOP; Value for Customs: 8.

The right view shows the back side of the form with the following details:

- 5 Broker Selection:** Broker's Name: Jose Luis Ligoli; City/Country: Argentina; Postal Code: 52541189; Phone: CEL 4560943099.
- 6 Service:** FedEx Int. First, FedEx Int. Priority, FedEx Int. Economy, FedEx Int. Priority Freight, FedEx Int. Economy Freight.
- 7 Packaging:** FedEx Letter/Envelope, FedEx Pak, Other Packaging.
- 8 Special Handling:** Does this shipment contain dangerous goods? (No/Yes), Tick here if goods are not in free circulation and goods (C.I. No/Yes), Cargo Aircraft Only, Dry Ice.
- 9 Payment:** TRANSPORTATION CHARGES PAID BY: Sender, Recipient, Third Party, Credit Card, Cash/Check. DUTIES AND TAXES PAID BY: Sender, Recipient, Third Party. Total Transportation Charges: 2125.
- 10 Required Signature:** Signature of Jose Avila, Date: 08/31/20.
- Tracking Number:** 8275 3730 6109 0423.
- Origin Station I.D.:** 306.

Figura 11. Copia del comprobante de envío de la muestra del formulado al laboratorio Bio Fucal en Buenos Aires.

**Formulario RGL 0029 del laboratorio de análisis de toxicidad Bio Fucal
(Buenos Aires, Argentina)**

Este documento se distribuye como copia no controlada. Debe confirmarse su vigencia antes de hacer uso de esta versión, por si ha sido modificada.

	Planilla de Registro	Código: RGL-0029
	IDENTIDAD DEL ELEMENTO DE PRUEBA CON FINES DE REGISTRO	Versión: 08
		Página 1 de 2

Estimado cliente para el correcto ingreso de los elementos de prueba, le solicitamos completar y adjuntar al envío del mismo el siguiente formulario, de lo contrario se verá demorado el ingreso, hasta cumplimentar la totalidad de los items solicitados.

Nombre de la Empresa (Exactamente igual como desea que salga en el reporte).
Centro Regional Sur, Facultad de Agronomía, Universidad de la República

Dirección de la Empresa (Exactamente igual como desea que salga en el reporte).
Camino Folle km 36, Progreso, Canelones, Uruguay

Datos del elemento de prueba/ muestra:

País de registro: (Consignar exactamente donde va a registrar el Uruguay (MGAP-DGSA)	Nombre del elemento de prueba a analizar (exactamente igual al que desea figure en el reporte final) Clonotrix agente de control biológico	Condiciones de almacenamiento: (debe consignarse también en el rotulo del elemento de prueba) <input type="checkbox"/> Temperatura ambiente <input type="checkbox"/> Refrigerada <input checked="" type="checkbox"/> Al abrigo de la luz <input type="checkbox"/> Otra (detallar)						
Principio activo en el elemento de prueba y su concentración: Esporas de <i>Clonostachys rosea</i> 1x10e7 ufc/g	N° de lote: (no completar si corresponde a un estudio 5batch)							
El ensayo fue cotizado y solicitado BPL: <input checked="" type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Principio activo denominación IUPAC: N° CAS:	Segundo Principio activo denominación IUPAC: ó N° CAS:						
Cantidad enviada descripción del envase: (ejemplo: 5 envases plásticos de 100 ml.) Dos paquetes con 200 gramos cada uno.	Caracterización física del elemento de prueba: Polvo mojado.	Si el producto es Grado Técnico: (marcar según corresponda) <input checked="" type="checkbox"/> Sólido <input type="checkbox"/> Líquido	Si el producto es Formulado: Tipo de formulación Armonizada. (ejemplo: SC) cosecha de esporas en vehiculos sólidos (talco, bicarbonato, harina de arroz)					
Si el cliente considera que el elemento de prueba no es homogéneo marcar aquí:	Disposición final del elemento de prueba: Una vez terminados los ensayos, si el cliente desea que el elemento de prueba sea devuelto marcar aquí: <input type="checkbox"/> Se devuelve al cliente (si no el elemento de prueba será descartado al finalizar los ensayos)							
Si el cliente provee el estándar marcar aquí: Fecha de venc.: / /								
Si el cliente provee el método analítico marcar aquí: <input type="checkbox"/>								
El elemento de prueba a analizar se categoriza como: (Marcar según corresponda) <input type="checkbox"/> Químico <input checked="" type="checkbox"/> Biológico <input type="checkbox"/> Otros	N° de lote, para estudio 5 batch (cuando corresponda)							
	<table border="1"> <tr><td>Batch 1</td></tr> <tr><td>Batch 2</td></tr> <tr><td>Batch 3</td></tr> <tr><td>Batch 4</td></tr> <tr><td>Batch 5</td></tr> </table>			Batch 1	Batch 2	Batch 3	Batch 4	Batch 5
Batch 1								
Batch 2								
Batch 3								
Batch 4								
Batch 5								



Planilla de Registro

Código:
RGL-0029

**IDENTIDAD DEL ELEMENTO DE
PRUEBA CON FINES DE REGISTRO**

Versión:
08

Página 2 de 2

Datos de estabilidad:

El cliente asegura que el elemento de prueba declarado se ha caracterizado para identidad, pureza y composición, como requiere el ítem 6.2 de las Buenas prácticas de laboratorio OCDE y supervisión de conformidad de ENV/MC/CHEM (98) 17 OCDE. La información para la caracterización y estabilidad se requiere también para los estándares.

ATENCIÓN: EN EL CASO DE TRATARSE DE ENSAYOS BPL, EL CLIENTE DEBERÁ ADJUNTAR LA HOJA DE SEGURIDAD DE LA MUESTRA SIN EXCEPCIÓN.

Indicar fecha de vencimiento del elemento de prueba : 22 02 / 2021

Observaciones: (en caso de que usted las considere necesarias)

Estudios solicitados:

Nombre del estudio o Número de presupuesto	Norma, metodología, técnica, especificaciones.
--	--

Toxicidad oral aguda	OECD 425
----------------------	----------

Toxicidad dérmica aguda	OECD 402
-------------------------	----------

Sensibilización	OECD 406
-----------------	----------

Otras especificaciones:

Una vez finalizado el análisis, se procederá según las instrucciones que figuran en el ítem Disposición final del elemento de prueba, de esta solicitud.

En caso de existir alguna discrepancia entre el rotulo del envase contenedor del elemento de prueba y solicitud de estudio, el cliente deberá precisar cuál es la información correcta. En caso de no obtener respuesta se considerarán validos lo datos consignados en la presente planilla.

De no poder aportar el cliente alguno de estos requerimientos técnicos, se adoptaran normas nacionales legales vigentes para la categorización del producto, bibliografía internacional al respecto, recursos técnicos propios y en general según el criterio de la Dirección.

Salvo que se especifique lo contrario Bio Fucal no es responsable por el muestreo ni por el rotulado de los elementos de prueba recibidos para su análisis.

Indicar en el ítem de Observaciones generales si el elemento de prueba debe tratarse de forma anónima.

Firma cliente :

Fecha / /

Aclaración o Sello:

Firma Bio Fucal:

Fecha / /

Aclaración:

Producto 3.2: Prototipo de etiqueta

El prototipo de etiqueta es otro de los requisitos solicitados para el registro ante el MGAP-DGSA (Anexo 7). El nombre comercial inicialmente propuesto para el formulado (Clonostop) fue cambiado a **Clonotrix**, debido a la alta similitud con un producto de otra empresa (Botrystop). La etiqueta debe contener la siguiente información:

- **Identificación del producto:** nombre comercial, clase de uso (aptitud), tipo de formulación, composición del producto, número de registro, número del lote o partida, fecha de fabricación y fecha de vencimiento, nombre del fabricante o formulador, país de origen, nombre y dirección de la firma registrante.
- **Instrucciones de almacenamiento**
- **Recomendaciones de uso:** las instrucciones de uso comprenden el cultivo (o sitio de aplicación), plaga objetivo, dosis recomendada y observaciones. Las observaciones comprenden los momentos de aplicación, espaciamiento entre aplicaciones si corresponde, compatibilidades, fitotoxicidad, tiempo de espera y de reingreso. Modo de preparación, modo de aplicación y otras recomendaciones.
- **Precauciones y advertencias:** clasificación toxicológica (franja con colores indicativos), peligrosidad frente a organismos no blanco, antidotos y primeros auxilios, precauciones durante la aplicación, deposición final del envase.

La etiqueta propuesta tiene uno de los formatos establecidos en el Decreto 294/004: formato en una única columna vertical con tres secciones principales:

- a) Identificación del producto
- b) Recomendaciones de uso
- c) Precauciones y Advertencias

Se ajustará la información que contiene la etiqueta en base a las observaciones y recomendaciones que la DGSA realice sobre la base del prototipo actual.

Texto de la etiqueta del formulado comercial

CLONOTRIX	(nombre comercial)
<i>Clonostachys rosea</i>	(ingrediente activo)
Agente biológico para el control de <i>Botrytis cinerea</i>	(breve especificación de su aplicación)

COMPOSICIÓN

Cada paquete contiene 200 g con una concentración de 1×10^6 ufc/g de *Clonostachys rosea* con excipientes naturales. Formulado en polvo mojable.

MODO DE APLICACIÓN

Cultivo	Enfermedad		Dosis	Momento de aplicación
	Nombre común	Nombre científico		
Tomate Frutilla Morrón Berenjena	Botritis Moho gris	Botrytis cinerea	200gr/100lts 2Kg/há	Aplicar de manera preventiva sobre hojas, flores y heridas de la planta una vez por semana . Si ya ha tenido problemas con Botrytis se puede aplicar en rastrojos y restos de poda
Momento(s) de aplicación: Comenzar los tratamientos preventivamente, cuando se den las condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad.				

COMPATIBILIDAD

Cyprodinil y fludioxonil

Quitosano y sales de cobre

Conservar hasta 18 °C en ambiente ventilado, protegido de luz solar directa.

Origen	Fecha de fabricación	Lote	Vencimiento

ADVERTENCIA Mantener fuera del alcance de niños y personas inexpertas. En caso de intoxicación llamar al CIAT. Tel.: (02) 1722. Concurrir al médico llevando la etiqueta, el folleto o envase. No transportar ni almacenar con alimentos, no lavar los equipos de aplicación en cursos de agua. Evitar la ingestión, inhalación, contacto con piel y ojos. No comer, beber o fumar durante la manipulación, preparación o aplicación del producto.

Clonotrix

Clonostachys rosea

ACB para el control de Botrytis cinerea. **ORGÁNICO**
 USO AGRÍCOLA. LEA ATENTAMENTE LA ETIQUETA ANTES DE UTILIZAR.

COMPOSICIÓN
 Cada paquete contiene 200 g con una concentración de 1×10^7 ufc/g de Clonostachys rosea con excipientes naturales. Formulado en polvo mojable.

CULTIVO	ENFERMEDAD		DOSIS	MOMENTO DE APLICACIÓN
	NOMBRE COMÚN	NOMBRE CIENTÍFICO		
Tomate Fruilla Morrón Eberenjena	Botritis Moho gris	Botrytis cinerea	200gr/100lts 2Kg/ha	Aplicar de manera preventiva sobre hojas, flores y heridas de la planta una vez por semana. Si ya ha tenido problemas con Botrytis se puede aplicar en rastrojos y restos de poda

COMPATIBILIDAD
 Cyprodinil y fludioxonil
 Quitosano y sales de cobre

CONSERVAR HASTA 25 °C EN AMBIENTE VENTILADO, PROTEGIDO DE LUZ SOLAR DIRECTA.

Nº REGISTRO

PAÍS DE ORIGEN

FECHA DE FABRICACIÓN

LOTE

VENCIMIENTO

ADVERTENCIA Mantener fuera del alcance de niños y personas inexpertas. En caso de intoxicación llamar al CIAT. Tel.: (02) 1722. Concurrir al médico llevando la etiqueta, el folleto o envase. No transportar ni almacenar con alimentos, no lavar los equipos de aplicación en cursos de agua. Evitar la ingestión, inhalación, contacto con piel y ojos. No comer, beber o fumar durante la manipulación, preparación o aplicación del producto.

NOMBRE DE EMPRESA
 Camino Folle
 km 35.500, s/n,
 Departamento de Canelones

ANII AGENCIA NACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA

Figura 12. Prototipo de etiqueta elaborado de acuerdo a los requerimientos de la DGSA-MGAP.

Producto 4.1: Protocolo para el ensayo de eficacia

El objetivo del ensayo de eficacia, requerido para el registro, es determinar la efectividad del producto Clonotrix, en base al agente de control biológico *Clonostachys rosea*, para el control de *Botrytis cinerea* en cultivos de tomate bajo invernáculo, utilizando la dosis y el modo de aplicación recomendado en el producto Clonotrix.

El ensayo se prevé realizar en otoño-invierno 2021, ya que es la época de cultivo en la que las condiciones ambientales son favorables al desarrollo de la enfermedad. El ensayo se realizará en un invernáculo del Centro Regional Sur (CRS), (Facultad de Agronomía, Universidad de la República), en Progreso, Departamento de Canelones.

Metodología propuesta

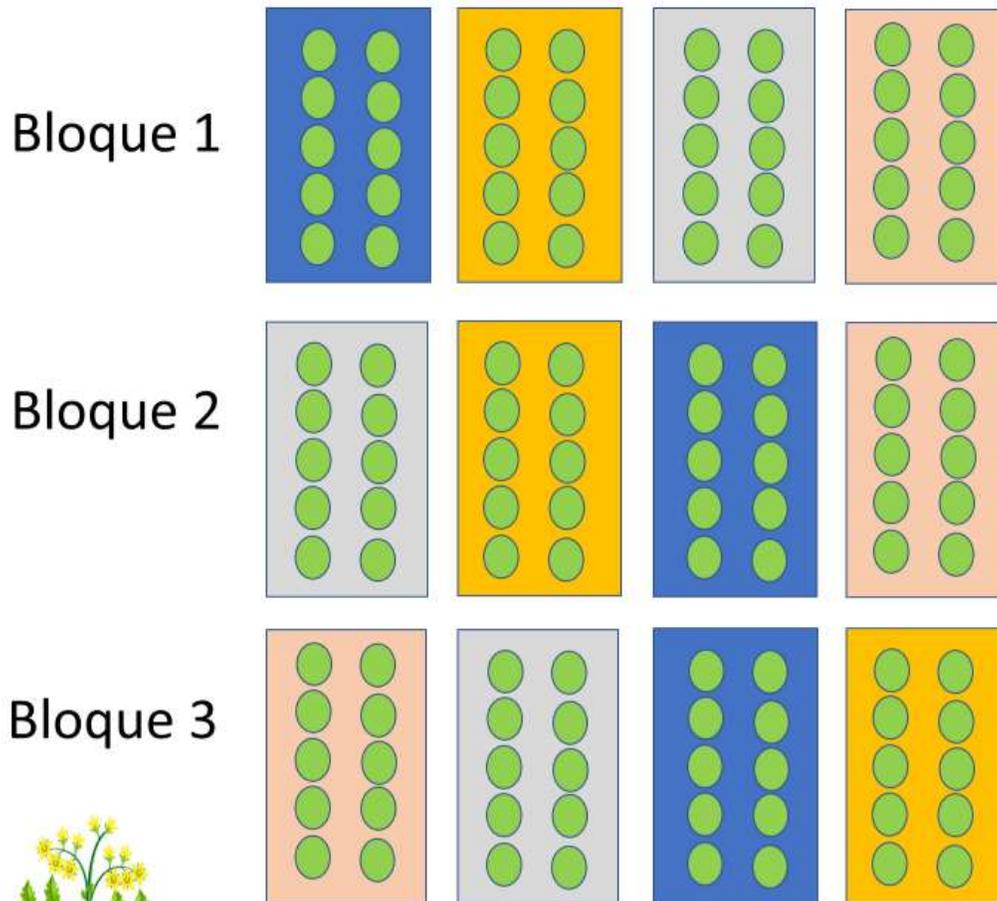
El agente de control biológico será aplicado mediante pulverización del formulado a evaluar, con la concentración indicada a nivel comercial. El diseño estadístico consistirá en cuatro tratamientos distribuidos en tres bloques al azar, con parcelas de diez plantas en donde se evaluará la interacción de *Botrytis cinerea* con el ACBM *Clonostachys rosea*. El ensayo constará de 120 plantas en total (4 trat x 3 bq x 10 pl/plot = 120 plantas).

Los tratamientos serán cuatro en total. El Tratamiento 1 será un tratamiento control, la pulverización se realizará solo con agua estéril. El Tratamiento 2 consistirá en la inoculación con el patógeno *Botrytis cinerea* (cepa Bt 181, colección del Laboratorio de Fitopatología, Facultad de Agronomía). En el Tratamiento 3 se evaluará la interacción de *Botrytis cinerea* con el ACBM *Clonostachys rosea*; el Tratamiento 4 consistirá en la aplicación sólo con el ACBM *Clonostachys rosea*. La Figura 13 presenta un esquema tentativo de la distribución de las parcelas experimentales en el invernáculo.

Se utilizarán plantas de tomate variedad Elpida en macetas de 15 cm de diámetro. La variedad Elpida es susceptible a *Botrytis cinerea* y se planta en otoño-invierno, época en la que las condiciones ambientales de temperatura y humedad relativa son prevalentes para *Botrytis cinerea*.

Los tratamientos experimentales se iniciarán aproximadamente a los 80 días desde la siembra. Se realizará una aplicación preventiva del ACBM a la floración del primer racimo, mediante pulverización a toda la parte aérea de la planta. Diez días después se realizará otra aplicación del ACBM, y 24 horas después se inoculará con la suspensión de esporas del patógeno. La segunda aplicación del ACBM va a estar dirigida únicamente a los racimos de flores, incluido el primer racimo que ya va a tener frutos cuajados al momento de la segunda aplicación. La inoculación del patógeno también será dirigida a los racimos, con una suspensión de esporas de concentración ajustada entre 10^5 y 10^6 ufc/mL (Silvera et al. 2010; Martínez, 2012), obtenidas a partir del cultivo en placas de Petri en medio PDA.

Bq1	Trat 1	Trat 3	Trat 4	Trat 2
Bq2	Trat 4	Trat 3	Trat 1	Trat 2
Bq3	Trat 2	Trat 4	Trat 1	Trat 3



Tratamiento 1	pulverización solo con agua estéril
Tratamiento 2	Inoculación con <i>Botrytis cinerea</i>
Tratamiento 3	Interacción de <i>B. cinerea</i> con el ACBM <i>Clonostachys rosea</i>
Tratamiento 4	Aplicación sólo con el ACBM <i>Clonostachys rosea</i> .

Figura 13. Esquema del diseño experimental instalado en el invernáculo con los cuatro tratamientos experimentales en tres bloques y diez plantas por parcela.

Después de cada pulverización, cada planta será cubierta durante 48 a 72 horas con una bolsa de plástico transparente con los objetivos de mantener un alto nivel de humedad relativa y de que no exista contaminación cruzada.

En el caso de que después de las primeras evaluaciones se observe que el tratamiento testigo inoculado con *Botrytis cinerea* no presente un nivel de infección importante, se repetirá la inoculación con *Botrytis* y la aplicación del ACBM 24 horas antes, aumentando la concentración de esporas del patógeno.

Evaluaciones a realizar

Las mediciones se iniciarán 48 horas después de la inoculación de *Botrytis cinerea*, y se repetirán periódicamente cada dos días hasta completar unas dos semanas desde la inoculación. Para medir correctamente se sacarán las bolsas de cada planta y se contará el número de flores total y el número de flores afectadas por el patógeno, evaluando de esta forma la incidencia de la enfermedad en flores. Las flores de tomate son uno de los órganos más sensibles frente a la *Botrytis*, y el daño tiene relevancia económica directa, ya que el ataque produce la caída de las flores infectadas e impide el cuajado y crecimiento posterior de esos frutos (Figura 14).

Se obtendrá un promedio de flores afectadas por planta para cada tratamiento como una aproximación del control y la eficacia del ACBM. Se calculará la media y la dispersión por tratamiento teniendo en cuenta los bloques. Para observar diferencias estadísticas entre tratamientos se realizará un Análisis de Varianza y un test de Tukey comparando las medias y dispersiones de cada tratamiento. En el caso de que la variable incidencia de *Botrytis* en las flores no se ajuste a una distribución normal, se realizará un análisis mediante modelos lineales generalizados (test de máxima verosimilitud).



Figura 14. Infección de moho gris causado por *Botrytis cinerea* sobre frutos de tomate en la zona de Salto en invierno (Foto: Bernal, 2011, revista INIA).

Equipo de Trabajo

Guillermo Galván

Ing. Agr. Ph.D., Profesor Titular Grado 5 DT
Centro Regional Sur (CRS), Departamento de Producción Vegetal
Facultad de Agronomía

Pablo González Rabelino

Ing. Agr. M.Sc. Profesor Adjunto Grado 3
Departamento de Protección Vegetal
Facultad de Agronomía

Matías Giménez

Licenciado en Ciencias Biológicas

José Ávila

Licenciado en Ciencias Biológicas

Gerónimo Giménez

Bachiller en Agronomía

Nicolás Silvera

Bachiller en Agronomía

Referencias bibliográficas

- Aldossari, N., Toner, B. and Ishii, S. 2019. Cold-Adapted Denitrifying Fungi for Nitrate Removal (summary). 2019 Amer Soc of Agronomy, Crop Sc Soc of America, Soil Sc Soc Amer. International Annual Meeting. San Antonio, Texas. Nr. 278-2.
- Agrios, G. N. (2008). Fitopatología. 2ª ed. México, UTEHA. 838 p.
- Anwar W., Sajid Ali, Kiran Nawaz, Sehrish Iftikhar, Muhammad Asim Javed, Abeer Hashem, Abdulaziz A. Alqarawi, Elsayed Fathi Abd_Allah & Adnan Akhter (2018) Entomopathogenic fungus *Clonostachys rosea* as a biocontrol agent against whitefly (*Bemisia tabaci*), *Biocontrol Science and Technology*, 28:8, 750-760.
- Bernal, R. (2009). *Botrytis cinerea*, moho gris: importante patógeno en diferentes cultivos bajo protección. *Revista INIA* 20:41-43.
- Chikanishi T, K Hasumi, T Harada, N Kawasaki, A Endo. 1997. Clonostachin, a novel peptaibol that inhibits platelet aggregation. *J Antibiot (Tokyo)*. 1997 50(2):105-110.
- Coley-Smith, J., K. Verhoeff, and W. Jarvis. (1980). *The biology of Botrytis*. Academic Press, London, UK. 318 p.
- Commonwealth Mycological Institute (CMI). (1974). Description of pathogenic fungi and bacteria. Surrey, Eastern. 1 p. (Ficha no. 431).

- Corallo, B., Simeto, S., Martínez, G., Gómez, D., Abreo, E., Altier, N., & Lupo, S. (2019). Entomopathogenic fungi naturally infecting the eucalypt bronze bug, *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae) in Uruguay. *Journal of Applied Entomology*. doi:10.1111/jen.12624
- Elad, Y., B. Williamson, P. Tudzynski, and N. Delen. (2004). *Botrytis: Biology, pathology and control*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands. 403 p.
- Espinosa de los Monteros, M.C. (2006). Estudio de la variabilidad genética y organización cromosómica en el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*. Tesis Doctoral. Puerto Real, Cádiz, España. Universidad de Cádiz. 206 p
- Gepp, V.; Vero, S.; Cassanello, M.E.; Romero, G.; Silvera, E.; González, P.; Rebellato, J.; Ferreira, Y.; Bentancur, O. (2012). Resistencia a fungicidas en *Botrytis cinerea* en el Uruguay. *Agrociencia Uruguay* 16(1): 97-107.
- Jarvis WR (1989) Managing diseases in greenhouse crops. *Plant Disease* 73: 190–194.
- Jensen, B., Knudsen, I. M. B. and Jensen, D. F. (2000). Biological seed treatment of cereals with fresh and long term stored formulations of *Clonostachys rosea*: Biocontrol efficacy against *Fusarium culmorum*. *Eur. J. Plant Pathol.* 106:233-242.
- Jensen, B., Knudsen, I. M. B. and Jensen, D. F. (2002). Survival of conidia of *Clonostachys rosea* coated on barley seeds and their biocontrol efficacy against seed-borne *Bipolaris sorokiniana*. *Biocontrol Sci. Technol.* 12:427-441.
- Jensen, B., Knudsen, I. M. B., Madsen, M., and Jensen, D. F. (2004). Biopriming of infected carrot seed with an antagonist, *Clonostachys rosea*, selected for control of seedborne *Alternaria* spp. *Phytopathology* 94: 551-560.
- Kosawang C, Karlsson M, Véléz H, Rasmussen PH, Collinge DB, Jensen B, Jensen DF. 2014. Zearalenone detoxification by zearalenone hydrolase is important for the antagonistic ability of *Clonostachys rosea* against mycotoxigenic *Fusarium graminearum*. *Fungal Biol.* 118(4):364-373.
- Lahlali R. and Peng, G. (2014). Suppression of clubroot by *Clonostachys rosea* via antibiosis and induced host resistance. *Plant Pathology* 63: 447-455.
- Lee, S.B. and Taylor, J.W. (1990) Isolation of DNA from Fungal Mycelia and Single Spores. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J., Eds., *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, San Diego, 282-287.
- Martínez, E. (2012). Correlación entre la evaluación “*in vitro*” e “*in vivo*” de la sensibilidad a fungicidas de *Botrytis cinerea*: anilopirimidinas. Tesis Ing. Agrónomo. Facultad de Agronomía, Universidad de la República. 62p.
- Morandi, M., J. Sutton, and L. Maffia. (2000). Effects of host and microbial factors on development of *Clonostachys rosea* and control of *Botrytis cinerea* in rose. *European Journal of Plant Pathology* 106:439-448.

- O'Donnell, K., and Cigelnik, E. 1997. Two Divergent Intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 7 (1): 103-116.
- Rodríguez, M.A., C. Rothen, T.E. Lo, G.M. Cabrera and A.M. Godeas (2015). Suppressive soil against *Sclerotinia sclerotiorum* as a source of potential biocontrol agents: selection and evaluation of *Clonostachys rosea* BAF1646. *Biocontrol Science and Technology*, 25:12, 1388-1409. DOI: 10.1080/09583157.2015.1052372
- Schroers H, Samuels G, Seifert K, & Garns W. (1999). Classification of the Mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium*-like fungi. *Mycologia*, 91(2), 365-385.
- Silvera-Pérez, A.E., R. M. Valdebenito-Sanhueza, V. Duarte, H. P. Santos and J. Felippeto. (2010). Controle do mofo cinzento com *Clonostachys rosea* na produção de mudas de fúcsia. *Tropical Plant Pathology* 35(3): 163-169.
- Sun ZB, Li SD, Ren Q, Xu JL, Lu X, Sun MH. 2020. Biology and applications of *Clonostachys rosea*. *J Appl Microbiol*. 2020 Sep;129(3):486-495.
- Sutton, J., D. Li, G. Peng, H. Yu, P. Zhang, and R. Valdevenito-Sanhueza. (1997). *Gliocladium roseum*, a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *Plant Disease* 81:316-328
- Sutton, J. and G. Peng. (1993). Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. *Phytopathology* 83:615-621.
- Toledo A.V., Virlab E., Humber R.A., Paradell S.L., López Lastra C.C. 2006. First record of *Clonostachys rosea* (Ascomycota: Hypocreales) as an entomopathogenic fungus of *Oncometopia tucumana* and *Sonesimia grossa* (Hemiptera: Cicadellidae) in Argentina. *Journal of Invertebrate Pathology* 92(1): 7-10.
- Xue, A. G., Ho, K. M., Butler, G., Vigier, B. J. and Babcock, C. (2006). Pathogenicity of *Fusarium* species causing head blight in barley. *Phytoprotection*, 87 (2), 55–61. <https://doi.org/10.7202/013973ar>
- Yu, H. and J. Sutton. (1997). Morphological development and interactions of *Gliocladium roseum* and *Botrytis cinerea* in raspberry. *Canadian Journal of Plant Pathology* 19:237-336.
- Zhang P., J. Sutton, W. Tan, and A. Hopkin. (1996). *Gliocladium roseum* reduces physiological changes associated with infection of black spruce seedlings by *Botrytis cinerea*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 18:7-13.

ANEXO 1

Protocolo de producción de *Clonostachys rosea* en arroz

Materiales

- Cepa de *Clonostachys rosea* pay-4-3 cultivada en medio de cultivo PDA (potato dextrose agar) en placas de Petri
- Arroz
- Agua
- Bolsas de polipropileno
- Tapones de algodón y gasa
- Bandas elásticas (gomitas)

Equipamiento

- Balanza
- Autoclave
- Cámara de flujo laminar
- Estufa germinadora
- Máquina cosechadora de conidios

Principio

Muchas especies de hongos tienen un buen crecimiento sobre matrices sólidas, logrando a partir de su crecimiento radial cubrir la superficie del sustrato y absorber sus nutrientes en condiciones aerobias de alta humedad relativa y luz.

Procedimiento

1. En primer lugar, el **arroz** debe ser **remojado** con un exceso de agua (1:2 arroz:agua) durante **30 min**. Este remojo contribuye a eliminar excesos de almidón y lograr condiciones óptimas para la esterilización del grano.
2. Luego colar el arroz, **dispensarlo** en alícuotas de **200 g** en **bolsas** de polipropileno y cerrarlas con tapón de algodón de unos 5 cm de diámetro, sujetados con bandas elásticas (gomitas).
3. A continuación las bolsas de arroz son sometidas a un **ciclo de esterilización** por vapor de **15 min a 124 °C**.
4. Luego de ser esterilizado, el arroz **se inocula** con una suspensión de esporas del biocontrolador en condiciones asépticas, en cabina de flujo laminar y con materiales y medios estériles. A partir de un cultivo del controlador en placa de Petri medio sólido se prepara una **suspensión** madre de esporas ajustada a tubo **Mc Farland N° 3**, se diluye 1/10, y de esta dilución se inocula **5 mL por bolsa**.
5. Finalmente, las bolsas son **incubadas** en cámara de condiciones controladas (germinadora) a **25°C** con fotoperíodo **12 h: 12 h luz:noche** y una humedad relativa mayor a 80% durante dos semanas, con una a dos remociones del arroz en ese intervalo.

Las remociones se deben realizar en cámara, sin abrir paquetes y tratando de disgregar grumos y exponer superficies para un crecimiento más homogéneo del arroz.

6. Al transcurrir los 14 días, el arroz con el crecimiento del biocontrolador obtiene una composición compacta con pigmentación anaranjada, en algunos casos variable dependiendo la exposición a la luz. Se debe observar esporulación para que el paquete se encuentre en condiciones de ser cosechado.

Cosecha del biocontrolador sobre arroz

7. Para la cosecha de las esporas a partir de los paquetes de arroz crecidos de *Clonostachys rosea* se deben mezclar los componentes en polvo de 5 paquetes junto con el arroz cultivado y disgregar y mezclar manualmente en bolsas en condiciones de esterilidad.
8. En caso de humedad excesiva, se agrega un paso de secado del cultivo en arroz del biocontrolador en estufa a 45 °C.
9. La mezcla de polvo con arroz se debe dejar caer de manera lenta y regular dentro de la tolva de la máquina cosechadora de conidios. Esta máquina muele el arroz y lo pasa por una grilla que filtra y permite pasar únicamente partículas del tamaño deseado, menor a la grilla utilizada como filtro.
10. Durante la cosecha de conidios se debe colocar de manera constante una bolsa en el **tubo de salida** de la máquina para disminuir el esparcimiento de polvo y la contaminación con esporas del ambiente en el que se lleva a cabo la cosecha de conidios.

Embalaje del formulado final

11. A partir de la obtención del formulado en polvo se fracciona en paquetes previamente generados y etiquetados, con un contenido de 200 g. Los paquetes se generan cortando 20 cm de tubo de nylon para selladora al vacío y sellando uno de sus extremos con una selladora de calor.
12. Estos paquetes se sellan y cierran al vacío para una mejor conservación del producto. Esto mejora la supervivencia de las esporas debido a la baja concentración de oxígeno dentro del paquete, lo cual impide la activación del metabolismo del microorganismo en cuestión. Estos paquetes permiten su almacenamiento sin la necesidad de su conservación en frío de manera constante.

ANEXO 2



INFORME DE ANÁLISIS

Nº 027140

Identificación del Cliente	
Nombre	GERONIMO GIMENEZ
Dirección	
Teléfonos	

Identificación de la Muestra			
Nº Análisis	2397/20	Fecha Recepción	24/07/2020 11:48
Identific. del cliente	Clonostachys rosea ACB máquina Lote piloto	Fecha Inicio Analisis	24/07/2020 00:00
Presentación	1 bolsa 100 g	Fecha Final Análisis	29/07/2020 00:00
		Fecha Emisión Informe	29/07/2020 00:00

Ensayos	Resultados	Unidades	Metodología
Recuento total de microorganismos aerobios	(estimado) $1,0 \times 10^6$	ufc/g	USP 43 <61>
Recuento total de hongos filamentosos y levaduras	$2,7 \times 10^7$	ufc/g	USP 43 <61>

Otros Comentarios
Muestreo realizado por el cliente.

Los resultados solo se refieren a los elementos sometidos a ensayo y a la muestra como se recibió cuando el laboratorio no ha sido responsable de la etapa del muestreo. Este informe NO puede ser reproducido, excepto que sea íntegramente, sin la autorización escrita de la Dirección Técnica del Laboratorio.

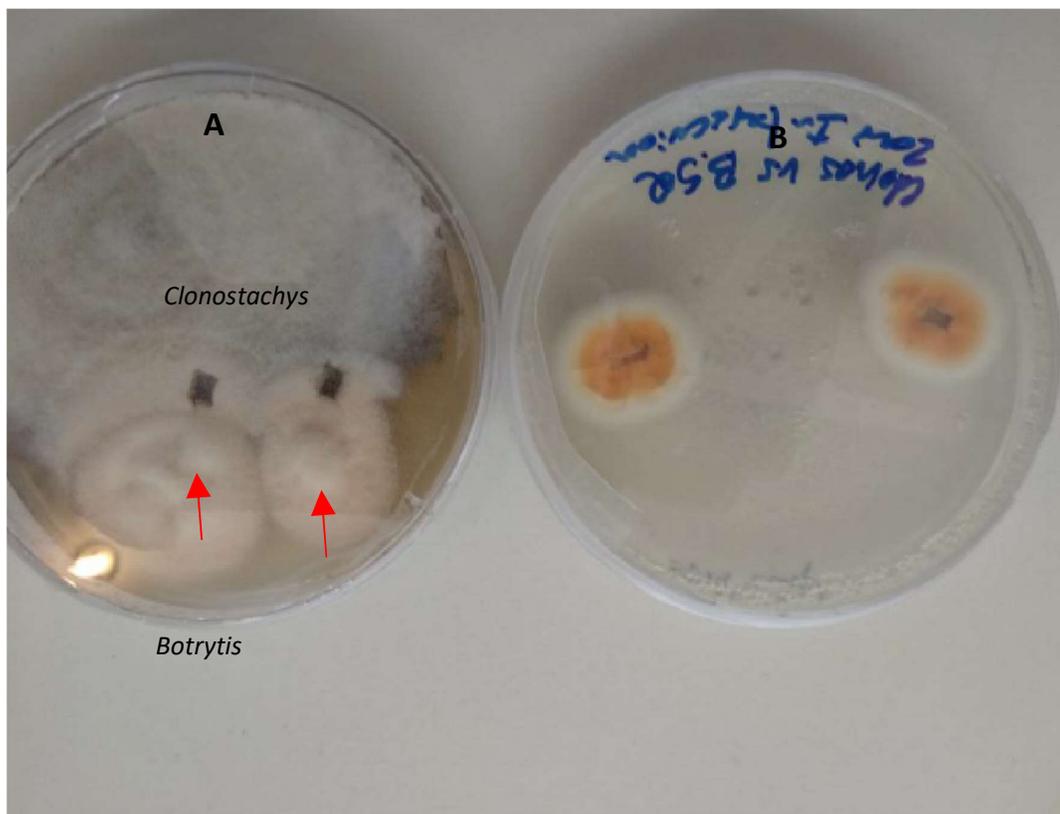
RODOLFO
JAVIER MENES
IRIARTE

Firmado digitalmente
por RODOLFO JAVIER
MENES IRIARTE.
Fecha: 2020.07.29
14:25:15 -03'00'

Dirección Técnica
Dr. Javier Menes

ANEXO 3

Evaluación del biocontrolador en cultivos duales in vitro



Se realizó una evaluación in vitro en cultivos duales de la interacción entre *Botrytis squamosa*, patógeno de la cebolla, y la cepa de *Clonostachys rosea*. (A) El crecimiento del biocontrolador en placas de Petri fue más lento que el crecimiento de *Botrytis*. Se tomaron trozos de cultivo de la zona de interacción entre el biocontrolador y el patógeno (indicados por las flechas rojas). (B) A partir de los trozos extraídos la zona de interacción, se observó solamente el crecimiento de *Clonostachys rosea*, por lo que se deduce que inhibe el crecimiento de *Botrytis*.

ANEXO 4

Aplicaciones piloto en cultivos comerciales

Durante este período se continuó avanzado sobre la validación en cultivos comerciales con productores de Salto, Bella Unión y Canelones, que han tenido problemas en temporadas anteriores con el moho gris causado por *Botrytis cinerea* en tomate y otros cultivos. En particular, en Salto y Bella Unión la principal época de cultivos hortícolas se realiza bajo invernáculos en otoño-invierno, por lo que el cultivo se realiza bajo condiciones predisponentes para la enfermedad (alta humedad relativa, baja luminosidad). Se valoró la receptividad de los productores para adoptar estrategias alternativas de control, y la buena disposición para probar este antagonista en particular en sus predios.



Monitoreo de cultivo de tomate al que se había aplicado nuestro producto Clonotrix, en predio de un productor asociado a la cooperativa de producción agroecológica Punto Verde (producción orgánica), en la zona de Salto.



Preparación del caldo con el biocontrolador para aplicación en frutilla en la zona de Salto.



Visita a un invernáculo de morrón en el que se evaluó el biocontrolador en la zona Norte (Bella Unión, departamento de Artigas).



Muestreo de hojas en el cultivo de morrón para evaluar la presencia y supervivencia de *Clonostachys rosea* en las condiciones de cultivo.



Reaislamientos in vitro del principio activo viable de nuestro controlador biológico a partir de muestras de tejidos de planta, tomadas de los invernáculos monitoreados en la zona de Salto y Bella Unión.