

# 8

## Biología molecular de la soja

- **8a.** Biotecnología, sostenibilidad y mejoramiento genético
- **8b.** Manejo fitosanitario de la soja con el bioestimulante PSP1, inductor de la defensa vegetal



# Biotechnología, sostenibilidad y mejoramiento genético

Pardo, E.M.\*; C. M. L. Rocha\*; M. G. García\*; L. S. Pérez Borroto\*; L. Toum\*; P. Filippone\* y A. P. Castagnaro\*.

\*ITANOA (CONICET-EEAOC). E-mail: mpardo@eeaoc.org.ar

## Biotechnología y desarrollo sostenible: El futuro que nos acechaba ya está aquí

En un contexto mundial de cambio climático y aumento poblacional preocupante, la ciencia y el desarrollo tecnológico deberán aportar la ayuda necesaria para mitigar la creciente necesidad de alimentos y energía renovable. Este escenario plantea grandes desafíos para la producción agrícola en las próximas décadas. La ONU estimó que para el año 2030 se necesitarán mil millones de toneladas más de cereales por año (UNDP, 2015). Esta cifra es preocupante si se piensa en lograr estos incrementos mediante la utilización de las estrategias empleadas hasta el momento, es decir, expandir la superficie cultivada avanzando sobre ecosistemas naturales e intensificando el uso de fertilizantes y otros productos agroquímicos sintéticos, ya que conduciría indefectiblemente a profundizar el daño a la salud humana y ambiental. En este sentido, la satisfacción

de la demanda de alimentos y de energía renovable exige que haya un mejoramiento tecnológico bajo la forma de nuevas variedades o cultivares mejor adaptados a los nuevos escenarios ambientales, con mayor potencial de rendimiento (Ray *et al.*, 2013), y el desarrollo de nuevas tecnologías de cultivo basadas en el uso de biofertilizantes, bioinsumos y/o el control biológico para el manejo fitosanitario. La mayor parte del incremento futuro en la productividad de los cultivos deberá lograrse mediante incrementos en los rendimientos y disminución de los costos económicos y ambientales de producción (Xu *et al.*, 2014). Estas medidas son consideradas esenciales para contribuir con la seguridad alimentaria, el desarrollo sostenible y la lucha contra la pobreza (Lokko *et al.*, 2018).

En las últimas décadas la biotecnología ha logrado avances tecnológicos significativos en la agricultura, sobre todo mediante la aplicación de herramientas

que provienen de la biología molecular, la genómica y la bioinformática. La combinación de la información fenotípica con la genómica puede proveer a los mejoradores el conocimiento que necesitan para identificar caracteres agrónomicamente importantes y producir más rápidamente cultivares superiores y mejor adaptados a los nuevos escenarios ambientales (Varshney *et al.*, 2014). Por ejemplo, el desarrollo de mapeo genético de ligamiento, mapeo por asociación y selección genómica han producido un impacto relevante en los últimos tiempos en cuanto al desarrollo de nuevas variedades de especies cultivadas (Jannink *et al.*, 2016).

Se espera que en los próximos años las tecnologías modernas de secuenciación, o “NGS” (del inglés “Next Generation Sequencing”), permitan desarrollar estudios genómicos comparativos en los cultivos más importantes e identificar genes, regiones genómicas y/o marcadores moleculares (MM) de interés agronómico (Varshney *et al.*,

2014). Cada vez existen más bases de datos públicas con MM y secuencias a disposición de los programas de mejoramiento genético de cultivos, que sumadas al abaratamiento de los costos de las ómicas (genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica) ofrecen la oportunidad de incrementar el conocimiento y aumentar enormemente la diversidad de alelos disponibles a través de la exploración de los bancos de germoplasma (McCouch, 2016).

En soja, el uso de MM ha sido muy frecuente y exitoso en los programas de mejoramiento genético. Sin embargo, para lograr nuevos avances que produzcan un salto cualitativo sobre las capacidades desarrolladas hasta ahora, es necesario combinar la genómica, transcriptómica y fenómica como nueva estrategia de intervención para la producción de conocimiento y derivación en desarrollo biotecnológico, y en este sentido, el Programa de Mejoramiento Genético de la Soja (PMGS) de la EEAOC ofrece el marco ideal para avanzar con un abordaje integral y transversal de esta naturaleza que permitirá el desarrollo de genotipos con características agronómicas mejoradas más eficientemente.

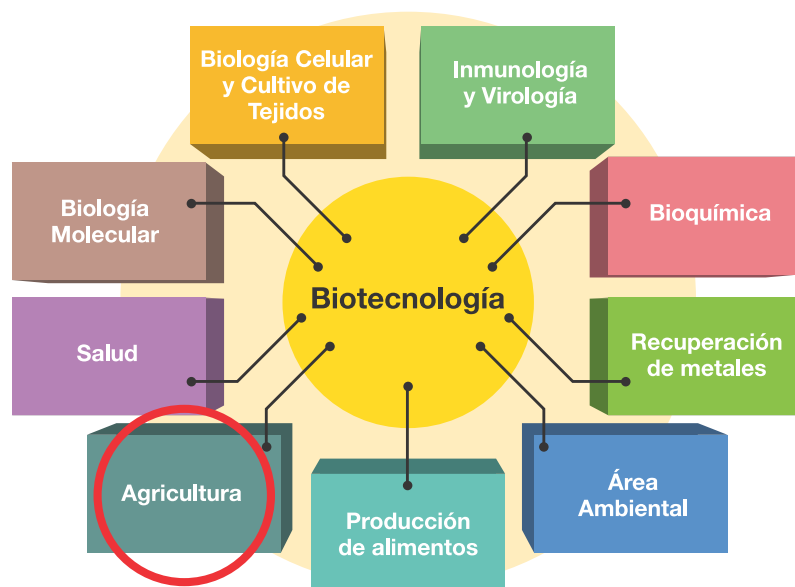
Sin embargo, hay que resaltar que dicho proceso se debe dar en un marco que contemple la seguridad y la soberanía alimentaria, el cuidado de los recursos ambientales y la rentabilidad económica. Estos puntos constituyen los pilares del desarrollo sostenible y un proceso que contemple estos conceptos resultará, sin dudas, en una sociedad más justa y equitativa.

## ■ Biotecnología y mejoramiento genético

Para contextualizar debemos decir que “cualquier aplicación tecnológica que utiliza sistemas biológicos, organismos vivos (plantas, animales o microorganismos), o algunos de sus derivados para crear o modificar productos o procesos para usos específicos con el propósito de obtener un beneficio” constituye lo que llamamos biotecnología (Lacerda & Sant’ana, 2016). La biotecnología es una herramienta que ha impactado en prácticamente todas las actividades y disciplinas. Nos acompaña desde los comienzos de la humanidad, desde que fabricamos pan o cerveza utilizando los recursos biológicos en nuestro provecho. También en el ámbito agronómico, desde hace miles de años de manera empírica, o con las tecnologías más avanzadas de hoy en día, buscamos generar diversidad

genética y seleccionar caracteres deseables para nuestros cultivos, para lo cual la biotecnología realiza grandes aportes.

Entre las herramientas biotecnológicas más avanzadas y modernas disponibles actualmente podemos nombrar, por ejemplo, la biología molecular y la ingeniería genética, que nos han permitido conocer en profundidad el ADN, proteínas y metabolitos de las plantas, y utilizarlos en nuestro provecho. Por caso, el ser humano ha logrado producir plantas transgénicas y modificar el ADN de muchos cultivos (Mishra & Zhao, 2018). También, es capaz de conocer con precisión la ubicación de los genes de interés agronómico, y a través de la construcción de mapas genéticos de los cultivos más importantes se desarrollaron herramientas como los marcadores moleculares que permiten llevar adelante estrategias de selección de caracteres deseados,



La biotecnología ha impactado y se nutre de numerosas actividades y disciplinas. En la agricultura actual juega un rol cada vez más preponderante con el objetivo de responder a las demandas sociales, ambientales y económicas.

cruzamientos específicos, introgresión de genes de importancia, etc. (Vidal *et al.*, 2012). La Selección Asistida por Marcadores Moleculares es una herramienta que está siendo implementada en todos los programas de mejoramiento genético de cultivos. Otra herramienta poderosa es la fenómica, que podemos definir como fisiología vegetal de alto caudal, y ha aumentado nuestra capacidad para caracterizar en profundidad las respuestas de los cultivos al ambiente y avanzar en el aumento de los rendimientos al seleccionar genotipos o variedades mejor adaptadas a cada ambiente en particular (Furkban & Tester, 2011).

El desarrollo de estrategias más amigables con el ambiente y complementarias a las tradicionalmente utilizadas en el manejo sanitario a través de la producción de bioinsumos es otro ejemplo de un desarrollo biotecnológico. El manejo convencional de enfermedades y plagas mediante el uso de agroquímicos de síntesis, derivados de fuentes no renovables como la energía fósil, puede ser complementado, o en parte reemplazado, por “bioinsumos de uso agropecuario” formulados en base a principios activos de origen natural, que poseen baja toxicidad, son prácticamente inocuos para la salud humana y animal, no producen daño en el ambiente y tienen costos de producción relativamente bajos.

Bajo este contexto mundial y regional, con el objetivo de contribuir a mejorar la productividad y la sostenibilidad del cultivo, la Sección Biotecnología de la EEAOC

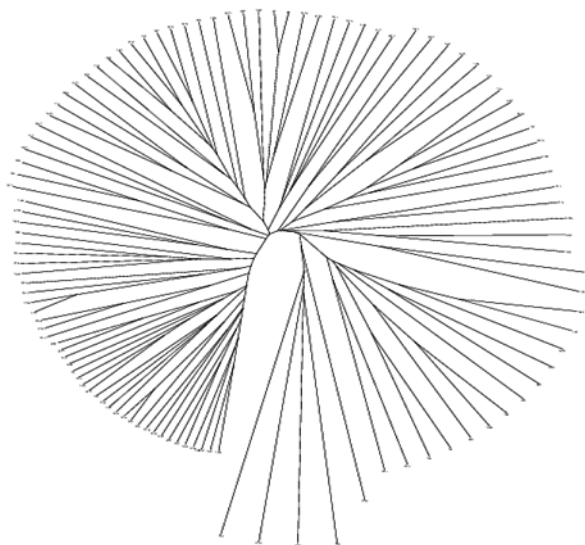
apoya al Programa Granos de la EEAOC a través del desarrollo y optimización de herramientas biotecnológicas en dos grandes áreas: el mejoramiento genético y el desarrollo de bioinsumos. En relación al mejoramiento genético, asiste al Programa de Mejoramiento Genético de la Soja (PMGS) a través de la utilización de diversas herramientas o aproximaciones, con el objetivo de obtener variedades o genotipos de soja con tolerancia/resistencia genética a estrés biótico y/o abiótico. La utilización de marcadores moleculares para acompañar al proceso de producción de variedades del PMGS es implementada con éxito, lo que permite acelerar el proceso tradicional y obtener genotipos propios y adaptados a nuestra región agro-ecológica. En cuanto a los bioinsumos, orientamos nuestros esfuerzos al desarrollo de inductores de la defensa vegetal (de origen natural) y a los promotores del crecimiento de amplio espectro que puedan ser utilizados en una amplia diversidad de cultivos; pero esto

será contado en otro artículo.

Aquí se describen resumidamente algunos ejemplos de las aproximaciones biotecnológicas implementadas en el PMGS de la EEAOC.

#### ► Estimación de la diversidad genética

Se realizó la caracterización de la diversidad genética del Banco de Germoplasma (BG) del PMGS utilizando marcadores moleculares. Esta información es sumamente importante ya que permite tomar decisiones a la hora de definir cruzamientos específicos cada año, y también garantizar la pureza e identidad genética de los materiales producidos. La Figura 1 representa la diversidad genética de 112 genotipos del BG del PMGS. Esta gráfica se denomina fenograma (o dendrograma) y representa en un arreglo radial las relaciones de parentesco de las variedades de soja que integran el banco de germoplasma de la EEAOC. Los genotipos más cercanos (parecidos)



**Figura 1.** Fenograma representativo de la diversidad genética del banco de germoplasma de soja del PMGS.

genéticamente se conectan entre sí; a partir del centro de la imagen puede observarse cómo se van arreglando grandes grupos y diferenciando otros. La figura es ilustrativa y no se colocaron los nombres de los genotipos por motivos confidenciales.

► **Apilamiento de genes de resistencia a enfermedades**

En otra aproximación, se utilizaron MM ligados a genes o QTLs (del inglés Quantitative Traits Locus, aquellas variables que son producto de la acción conjunta de varios genes y que actúan en simultáneo para expresar características de tipo cuantitativo) responsables de la resistencia a tres enfermedades de gran importancia en nuestra región, la Mancha de Ojo de Rana (MOR), el Síndrome de la Muerte Súbita (SMS) y el Cancro del Tallo de la Soja (CTS), para identificar genotipos del BG portadores de los genes de resistencia. Con este conocimiento se diseñaron estrategias para cruzar variedades seleccionadas con el objetivo de obtener un nuevo genotipo de soja que lleve apilados los MM y, por lo tanto, resistencia a las tres enfermedades. Este desarrollo se encuentra avanzado y ya se han obtenido varias líneas experimentales portadoras los MM descritos. La Figura 2 esquematiza y resume el proceso por el cual la resistencia a MOR presente en tres genotipos distintos ( $Rcs3$ ,  $Rcs_{Pekin}$  y  $Rcs_{MtRed}$ ) se apila en un solo genotipo con las tres fuentes de resistencia, lo que le otorgaría una resistencia a mayor diversidad del patógeno.

► **Identificación de genes de tolerancia a la sequía**

Otra de las aproximaciones tiene que ver con la utilización de las tecnologías más

modernas de secuenciación de última generación o NGS. Hemos utilizado una tecnología denominada HiSeq Illumina 3000 para secuenciar el transcriptoma completo, o sea el conjunto de genes que se están expresando en un tiempo dado, de dos genotipos de soja para comparar la respuesta a la sequía entre estas variedades. Por experimentos previos se determinó que uno de estos genotipos de soja es tolerante a la sequía y que el otro es susceptible (Pardo *et al.*, 2015); por lo tanto, esto nos permitió

identificar mediante herramientas de análisis estadísticos y bioinformáticos los genes que se expresan de manera diferencial ante la sequía e inferir cuáles de ellos estarían relacionados con la respuesta de tolerancia a la sequía. La Figura 3 muestra un HeatMap (o mapa de calor) que representa el patrón de expresión de aproximadamente 45.000 genes en los genotipos estudiados. Los colores representan el valor de la expresión de los genes, donde rojo corresponde a genes que se suprimen (no se expresan), y

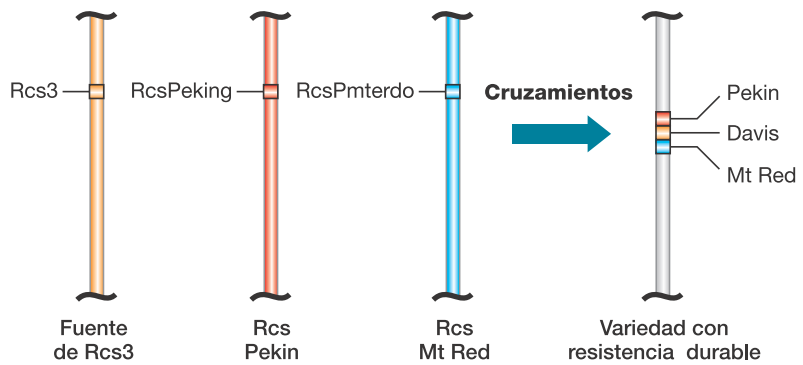


Figura 2. Esquema teórico del proceso para apilar tres fuentes de resistencia a Mancha de Ojo de Rana (MOR),  $Rcs3$ ,  $Rcs_{Pekin}$  y  $Rcs_{MtRed}$  en un solo genotipo.

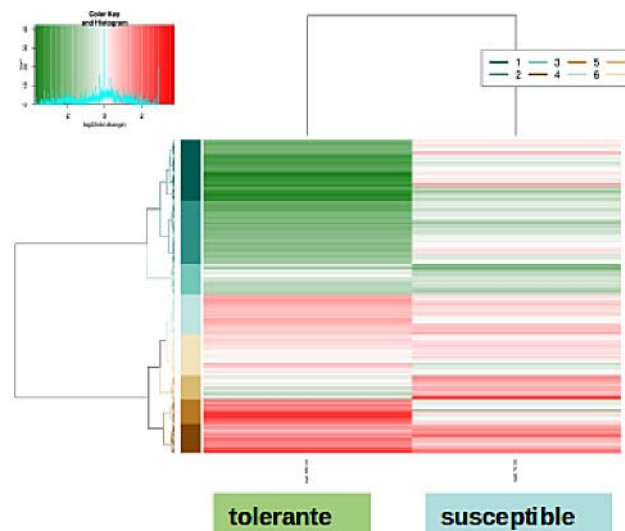


Figura 3. HeatMap o mapa de calor que representa el conjunto de los genes de dos genotipos de soja que se expresan diferencialmente ante el estrés hídrico.

verde a aquellos que se sobre-expresan como respuesta a la sequía. Como puede verse, el patrón de expresión es distinto entre un genotipo tolerante a la sequía y otro susceptible.

A partir del análisis masivo de la expresión génica como respuesta a la sequía, se seleccionaron algunos genes, se identificaron y se aislaron (clonaron). Para poder confirmar su función se utilizaron estos genes para transformar genéticamente a *Arabidopsis thaliana*, planta que se utiliza como modelo de experimentación, y se evaluaron las líneas transgénicas cuando se sometieron a estrés hídrico. De esta manera pudimos comprobar que algunos de estos genes efectivamente otorgan protección contra la sequía. Actualmente, se están completando algunos experimentos para confirmar

con certeza estos resultados. Un hallazgo como este puede permitir desarrollar una tecnología basada en estas secuencias para introducir tolerancia a la sequía o aumentarla en genotipos de interés comercial. La Figura 4 muestra diferentes líneas transgénicas de la planta modelo *A. thaliana*, transformadas con genes de soja identificados por nuestro grupo, y en algunas de ellas se ve una clara protección contra la sequía (líneas 35.3 y 38.3).

### Conclusión

La biotecnología puede proveer a las ciencias agrarias soluciones novedosas y proponer alternativas para el desarrollo de tecnologías superadoras que se adaptan a las necesidades de nuestra sociedad y del desarrollo sostenible; un desarrollo que contemple la

seguridad y soberanía alimentaria, minimice el impacto ambiental y asegure el crecimiento económico tanto en áreas urbanas como rurales.

La EEAOC es pionera en el NOA en cuanto al desarrollo tecnológico para brindar soluciones a nuestros productores e industria agrícola, y ha aumentado fuertemente durante los últimos años la inversión en investigación y desarrollo, a través de programas basados en aproximaciones biotecnológicas que han demostrado excelentes resultados no solo en soja, sino también en otros cultivos (Enrique *et al.*, 2011; Chalfoun *et al.*, 2015; Noguera *et al.*, 2015). La biotecnología complementa y fortalece las capacidades sobresalientes de la EEAOC para innovar y brindar soluciones al sistema productivo de Tucumán y la región.

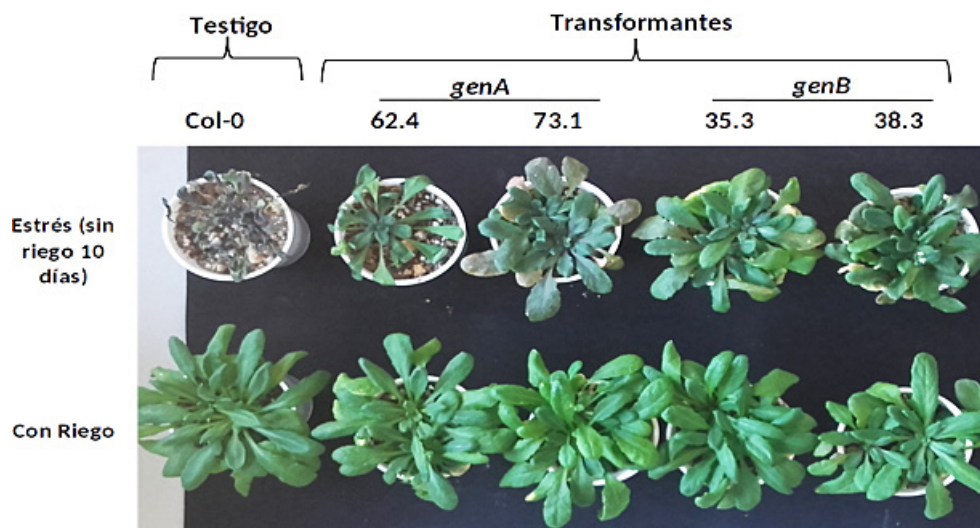


Figura 3. Pruebas de concepto. Evaluación de líneas transgénicas de *A. thaliana* evaluadas bajo estrés hídrico.

## Bibliografía citada

**Chalfoun, N. R.; S. B. Durman; F. Budeguer; M. D. P. Caro; R. P. Bertani; P. Di Peto; S. A. Steinglein; P. Filippone; E. R. Moretti; J. C. Díaz Ricci; B. Welin; & A. P. Castagnaro. 2018.** Development of PSP1, a Biostimulant Based on the Elicitor AsES for Disease Management in Monocot and Dicot Crops. *Front. Plant Sci.* 9: 1–22.

**Enrique, R.; F. Siciliano; M. A. Favaro; N. Gerhardt; R. Roeschlin; L. Rigano; L. Sendín; A. Castagnaro; A. Vojnov & M. R. Marano. 2011.** Novel demonstration of RNAi in citrus reveals importance of citrus callose synthase in defence against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Plant Biotechnol. J.* 9: 394–407.

**Furbank, R. T. & M. Tester. 2011.** Phenomics-technologies to relieve the phenotyping bottleneck. *Trends Plant Sci* 16: 635–644.

**Jannink, J. L.; A. J. Lorenz & H. Iwata. 2010.** Genomic selection in plant breeding: from theory to practice. *Brief. Funct. Genomics* 9: 166–177.

**Lacerda, M. V. & L. P. Sant 'ana. 2016.** Biotechnology: the role of science and technology upon society. *Unisantia Sci. Technol.* 6: 63–65.

**Lokko, Y.; M. Heijde; K. Schebesta; P. Scholtés; M. Van Montagu & M. Giacca. 2018.** Biotechnology and the bioeconomy—Towards inclusive and sustainable industrial development. *N. Biotechnol.* 40: 5–10.

**McCouch, S. 2016.** Feeding the Future. *CBInsights* 68.

**Mishra, R. & K. Zhao. 2018.** Genome editing technologies and their applications in crop improvement. *Plant Biotechnol. Rep.* 12: 57–68.

**Noguera, A.; R. Enrique; M. F. Perera; S. Ostengo; J. Racedo; D. Costilla; s. Zossi; M. I. Cuenya; M. P. Filippone; B. Welin & A. P. Castagnaro. 2015.** Genetic characterization and field evaluation to recover parental phenotype in transgenic sugarcane: a step toward commercial release. *Mol. Breed.* 35.

**Pardo, E. M.; G. R. Vellicce; L. Aguirrezabal; G. Pereyra-Irujo; C. M. L. Rocha; M. G. García; S. Prieto Angueira; B. Welin; J. Sánchez; F. Ledesma & A. P. Castagnaro. 2015.** Drought Tolerance Screening Under Controlled Conditions Predicts Ranking of Water-Limited Yield of Field-Grown Soybean Genotypes. *J. Agron. Crop Sci.* 201: 95–104.

**Ray, D. K.; N. D. Mueller; P. C. West & J. A. Foley. 2013.** Yield trends are insufficient to double global crop production by 2050. *PLoS One* 8, e66428

**United Nations General Assembly. 2015.** Transforming our world: The 2030 agenda for sustainable development. <https://sustainabledevelopment.un.org/content/documents/7891Transforming%20Our%20World.pdf> 1–5. doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2

**Varshney, R. K.; R. Terauchi & S. R. McCouch. 2014.** Harvesting the promising fruits of genomics: applying genome sequencing technologies to crop breeding. *PLoS Biol* 12, e1001883.

**Vidal, R. O.; L. C. do Nascimento; J. M. C. Mondego; G. A. G. Pereira & M. F. Carazzolle. 2012.** Identification of SNPs in RNA-seq data of two cultivars of glycine max (soybean) differing in drought resistance. *Genet. Mol. Biol.* 35: 331–334.

**Xu, S.; D. Zhu & Q. Zhang. 2014.** Predicting hybrid performance in rice using genomic best linear unbiased prediction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111: 12456–12461.







# Manejo fitosanitario de la soja con el bioestimulante PSP1, inductor de la defensa vegetal

Chalfoun, N. R.\*; M. L. Toulet\*; P. Di Peto\*; C. F. Grellet-Bournonville\*; V. de Lisi\*\*; S. Reznikov\*\*; V. González\*\*; J. R. Sánchez\*\*\*, F. Ledesma\*\*\*, M. R. Devani\*\*\*; A. I. Mamani\*, M. P. Filippone\*, J. González-Montaner\*\*\*\*; R. E. Moretti\*\*\*\*\*; A. P. Castagnaro\* y B. Welin\*

\*Sección Biotecnología, \*\*Sección Fitopatología, \*\*\*Sección Granos, \*\*\*\*Asociación Argentina de Consorcios Regionales de Experimentación Agrícola (AACREA), \*\*\*\*\*ANNUIT S.A.

## Contexto mundial: el mundo de los bioestimulantes en soja

La expansión de las áreas de producción de soja en combinación con el manejo sin labranza para mejorar la conservación del suelo han tenido un fuerte impacto en los ecosistemas agrícolas causando un cambio sustancial en la prevalencia, frecuencia e intensidad de las enfermedades de soja en Argentina (Ploper *et al.*, 2006). Actualmente, debido a la falta de variedades con resistencia genética contra la mayoría de las enfermedades de fin de ciclo, la principal estrategia de control fitosanitario consiste en la aplicación de fungicidas foliares en los estadios reproductivos del cultivo.

Si bien los fungicidas sintéticos han contribuido significativamente al aumento considerable de la producción agrícola mundial en las últimas décadas, el uso excesivo de estos productos químicos ha planteado preocupaciones no solo por el impacto negativo en

la salud humana y animal y en el medioambiente, sino también por el drástico aumento en los costos de producción, principalmente en el cultivo de la soja (Lenssen, 2013). En consecuencia, existe una demanda creciente, tanto de la sociedad como de los productores, de obtener estrategias alternativas que sean más baratas y más amigables con el medioambiente.

El uso de bioinsumos capaces de activar la respuesta de defensa de las plantas representa una estrategia prometedora para el manejo de enfermedades de los cultivos que podría complementar y/o reemplazar los productos químicos en un futuro cercano.

La incorporación de bioinsumos en los sistemas agrícolas constituye un medio económicamente atractivo y ecológicamente aceptable para reducir el uso de agroquímicos de origen sintético, mejorar la cantidad y calidad de los recursos propios de sistema agroecológico en el que se desarrolla el cultivo, sumar eficacia al manejo

convencional y contribuir al saneamiento ambiental.

Los bioinsumos que inducen o estimulan la defensa vegetal, recientemente aceptados en el grupo de los productos “Bioestimulantes” (Yahkin *et al.*, 2017), se definen como aquellos productos de origen biológico formulados en base a moléculas inductoras de la inmunidad vegetal (“elicitors”) que hacen que las plantas incrementen el nivel de sus propias defensas contra los organismos que les causan daño. En general se sabe que estas moléculas inductoras de la defensa activan una serie de respuestas que impiden o retardan el ataque de los patógenos.

Muchos estudios han demostrado el uso exitoso de diferentes inductores contra enfermedades causadas por virus, bacterias, oomicetes y hongos en una amplia variedad de cultivos intensivos y extensivos (Lyon *et al.*, 1995; Aziz *et al.*, 2006; Renard-Merlier *et al.*, 2007; French-Monard *et al.*, 2010). Además de generar protección contra patógenos, los

bioestimulantes pueden actuar sobre las respuestas fisiológicas de las plantas. Así, por ejemplo, muchos de ellos pueden producir un aumento en el rendimiento y la calidad del cultivo. Sin embargo solo unos cuantos han sido registrados y desarrollados como productos comerciales. En soja se ha ensayado una gama de productos con capacidad para inducir resistencia a enfermedades (INA, BTH o ASM, sacarina, silicio mineral, fertilizantes que contienen fosfitos, oligosacáridos de quitina,  $\beta$ -1,6-1,3 heptaglucanos de hongos, ácidos húmicos y el producto comercial Regalia); sin embargo se dispone de escasos informes agronómicos realizados con algunos de estos compuestos en condiciones de campo.

En este trabajo describimos un nuevo bioestimulante con tecnología PSP ("Plant Stimulation and Protection") destinado al manejo fitosanitario de la soja, que proviene de un desarrollo tecnológico conjunto, iniciado en el año 2012, entre la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC) y el sector privado.

### ■ El bioestimulante PSP1: ¿qué es?

**P**SP1 es el primer bioproducto argentino para el manejo fitosanitario que se basa en la inducción de la defensa de las plantas. El principio activo está constituido por una proteína de origen microbiano que activa los mecanismos que las plantas tienen naturalmente para defenderse frente al ataque de un amplio rango de patógenos. Este efecto inductor se traduce a campo en un incremento del rendimiento en diferentes cultivos, tanto de especies

dicotiledóneas como frutilla y soja, y monocotiledóneas como caña de azúcar, trigo y cebada.

### ■ Un poco de historia del desarrollo de PSP1

**E**ste proyecto se inició a partir del estudio de la interacción entre la frutilla con el patógeno *Colletotrichum* spp., que integra el complejo fúngico causante de la antracnosis, enfermedad endémica en la región frutillera del noroeste argentino (Salazar *et al.*, 2007; Salazar *et al.*, 2013).

A partir de tejido foliar de frutilla con síntomas de antracnosis se aisló y caracterizó un patógeno perteneciente a la especie *Acremonium strictum*. Para anular su potencial patogénico se obtuvieron extractos derivados del hongo, que cuando eran aplicados al follaje de plantas de frutilla de diferentes variedades les conferían protección frente a la antracnosis (Chalfoun *et al.*, 2011). A partir del sobrenadante de cultivos líquidos del aislado fúngico se purificó y caracterizó una proteína (serín-proteasa de la familia de las subtilisinas) denominada AsES (del inglés *Acremonium strictum* Elicitor Subtilisin) con actividad inductora de la defensa vegetal (Chalfoun *et al.*, 2013). Estos conocimientos fueron patentados por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y la Universidad Nacional de Tucumán (UNT) (Castagnaro *et al.*, 2012). El desarrollo de una tecnología se concretó en la EEAOC en el marco de un convenio de vinculación tecnológica con la empresa biotecnológica nacional ANNUIT SA. En forma conjunta se propuso el desarrollo de una línea

de bioinsumos agropecuarios con tecnología PSP, cuyo primer producto es el PSP1. En primera instancia se definió un prototipo comercial del producto enriquecido en proteínas excretadas por el hongo durante su crecimiento, se desarrolló un proceso de producción a escala semi-industrial y se optimizó una metodología de control de calidad de los lotes de producción (Chalfoun *et al.*, 2018a). El efecto de protección contra enfermedades fue comprobado en frutilla y soja, caña de azúcar, trigo y cebada. Finalmente el efecto obtenido con el bioinsumo PSP1 en condiciones de invernadero se validó a campo en más de 100 ensayos realizados durante varios años y localidades en diferentes regiones agroecológicas de la región pampeana y del NOA.

Recientemente este producto fue registrado ante organismos nacionales (SENASA N° 92243) en la categoría de acondicionador biológico con el nombre ISDV ("Inductores de los Sistemas de Defensa Vegetal"). Este hecho permitirá su inminente liberación al mercado nacional como el primer bioproducto de uso agropecuario inductor de la defensa vegetal que pueda aplicarse a la mayor cantidad de cultivos intensivos y extensivos de interés comercial. La generación de esta tecnología es un claro ejemplo de transferencia exitosa que alcanzó un desarrollo innovador en la industria nacional a partir del conocimiento científico básico surgido del ámbito académico nacional. El producto fue completamente desarrollado en Argentina; sin embargo, por sus propiedades tiene una proyección de comercialización a escala internacional que requirió la extensión de la patente en



Figura 1. Desarrollo del bioinsumo PSP1

alrededor de 20 países de los cinco continentes, entre los que se destacan Estados Unidos, Canadá, Nueva Zelanda, Australia, Rusia, Chile, México, Perú, Brasil y varios países miembros de la Unión Europea (Figura 1).

El desarrollo del bioinsumo PSP1 marca, junto con desarrollos parecidos, un cambio de paradigma o ciencia revolucionaria en la producción agrícola con una principal intención de aumentar o mejorar la productividad de los cultivos en armonía con el ecosistema en su totalidad.

### ¿Cómo funciona el PSP1?

#### Prueba de concepto en soja

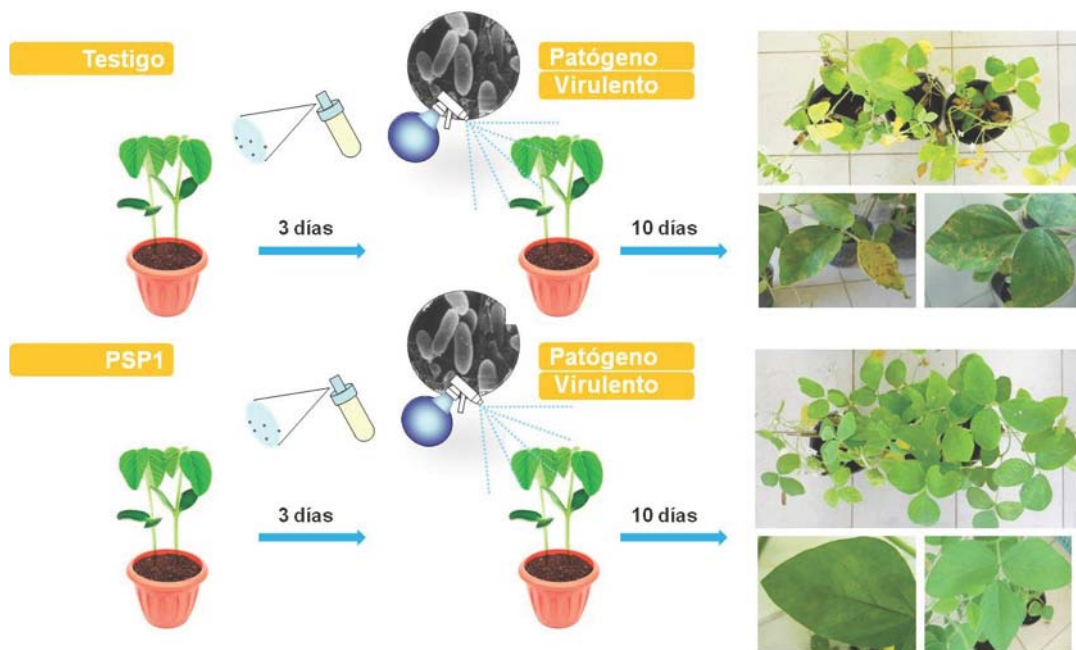
En nuestro laboratorio se desarrollaron sistemas de infección en diferentes especies vegetales que reproducen la sintomatología

causada por diversas clases de patógenos bajo condiciones controladas. Estos ensayos fitopatológicos indicaron que la aplicación del bioproducto PSP1 les otorga a las plantas un nivel incrementado de resistencia frente a enfermedades causadas por aislados virulentos de hongos (antracnosis y moho gris en frutilla, fusariosis en trigo) y bacterias (estría roja en caña de azúcar, marchitez bacteriana en tomate).

El particular interés en desarrollar un protocolo que incluyera las recomendaciones de uso (concentración y tiempo de aplicación) del PSP1 en el manejo del cultivo de la soja nos llevó a ensayar el comportamiento del bioproducto frente a la mancha anillada de la soja en condiciones controladas. Esta es una enfermedad endémica en el NOA causada por el patógeno

*Corynespora cassiicola*, cuyos síntomas en hojas son fácilmente reproducibles bajo condiciones controladas. Una vez ajustadas las condiciones de infección del patógeno *C. cassiicola* en plantas de soja crecidas en invernadero, el efecto de protección de PSP1 se puso en evidencia mediante un ensayo de doble tratamiento, que consistió en un tratamiento primario por aspersión foliar de las plantas con el bioproducto PSP1, seguido por una inoculación desafío realizada a diferentes tiempos con un aislado virulento del patógeno (Figura 2). El tratamiento con una solución diluida del producto tres días previos a la infección fue capaz de reducir en un 70% la incidencia y severidad de la mancha anillada en relación al testigo positivo de infección (tratamiento primario con agua). Este diseño experimental además se usó para comprobar

### Protección contra la mancha anillada de la soja en condiciones controladas



**Figura 2.** Protección contra la mancha anillada de la soja en condiciones controladas, utilizando un tratamiento con el bioproducto PSP1.

que este producto es compatible con productos fitosanitarios como fungicidas, insecticidas y herbicidas usados en la producción de soja en Argentina (Chalfoun *et al.*, 2018b).

#### ■ Del laboratorio al campo

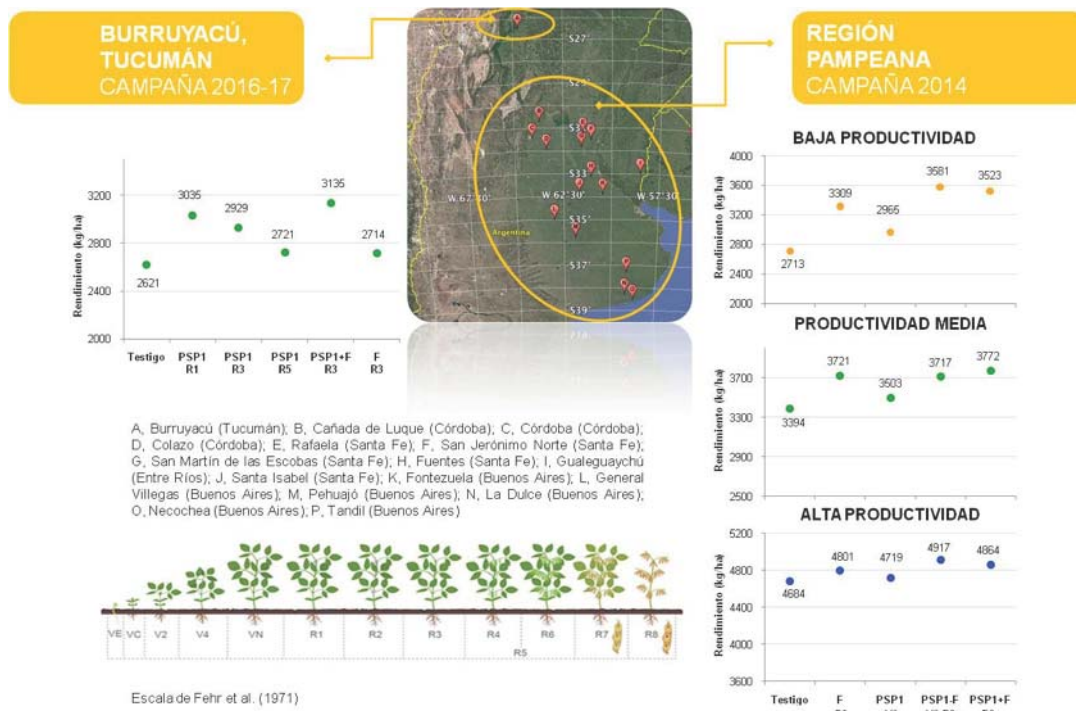
La efectividad del producto se validó mediante ensayos a campo que se vienen realizando durante varias campañas consecutivas de la soja (desde el año 2012 a la actualidad) en diferentes regiones agroecológicas con distintas prácticas de manejo del cultivo. En forma general, el producto demostró ser útil para manejar eficientemente las enfermedades de fin de ciclo de la soja e incrementar el rendimiento del cultivo (en un 7,2 % promedio). En la Figura 3 se muestran los rendimientos obtenidos en un ensayo realizado en la localidad

de La Cruz, departamento Burruyacú (Tucumán) durante la campaña 2016/2017 y aquellos rendimientos obtenidos en un ensayo múltiple realizado en 15 localidades de la región pampeana (Santa Fe, Córdoba, Entre Ríos, Buenos Aires) durante la campaña 2014/2015, los cuales fueron agrupados de acuerdo a su productividad. En otros cultivos como trigo y cebada la aplicación de PSP1 produjo aumentos de rindes promedio del 15% y el 12%, respectivamente.

En líneas generales, los rendimientos alcanzados por la aplicación de PSP1 en estadios reproductivos tempranos (R3) fueron similares y en algunos casos mayores a los alcanzados con fungicidas empleados en el manejo convencional del cultivo. Es importante destacar que la aplicación de una mezcla del PSP1 y del fungicida potencia el

efecto de cada producto aplicado por separado, tanto a nivel de protección contra enfermedades como del incremento de los rindes.

Las características que describen el modo de uso del bioproducto PSP1 son: **(I)** La aplicación se hace por aspersión en el follaje de las plantas en estadios fenológicos reproductivos tempranos y generalmente se puede predecir según la presión de enfermedades. **(II)** Tiene efecto a dosis muy bajas (Chalfoun *et al.*, 2018a). **(III)** Produce un efectosistémico, es decir que la aplicación del bioproducto a una única hoja de la planta induce el mismo nivel de protección contra patógenos que el rociado de la planta entera (Chalfoun *et al.*, 2013). **(IV)** Es químicamente compatible con los agroquímicos utilizados en el manejo convencional del cultivo de la soja (Chalfoun *et al.*, 2018b).



**Figura 3.** Ensayos a campo en diferentes ambientes de producción de soja de la Argentina, durante las campañas 2014/2015 y 2016/2017. Abreviaciones: F: fungicida en R3; PSP1: bioinsumo en V6 (región pampeana) o en R3 (Burruyacú); PSP1-F: bioinsumo en V6 y fungicida en R3; PSP1+F: mezcla de ambos en R3.

### Resumiendo las propiedades del PSP1

Las principales características del bioestimulante PSP1 son:

- PSP1 es un bioinsumo destinado al manejo fitosanitario de cultivos que se basa en la inducción de la defensa vegetal. Se aplica al follaje de las plantas y funciona como “vacuna vegetal”, es decir que activa los sistemas de defensa de las plantas protegiéndolas contra los patógenos que causan enfermedades.
- Como consecuencia indirecta de un fortalecimiento del sistema inmune, la aplicación a campo produce un incremento del rendimiento de los cultivos en condiciones que favorecen el desarrollo de enfermedades.

- El bioinsumo es un producto de origen natural que está presente en los agroecosistemas, por lo que es 100% biodegradable, es prácticamente inocuo para la salud humana y animal y no produce daño en el medioambiente ni contra los organismos no blanco.

- No posee actividad antimicrobiana, por lo que no genera resistencia en los microorganismos patógenos y no atenta contra la biodiversidad.

- Es efectivo a baja concentración y tiene escasos costos de producción.

- El efecto de protección contra enfermedades fue comprobado en un amplio número de especies vegetales (soja, trigo, cebada, frutilla y caña de azúcar) y se observó un incremento de

la productividad en cultivos hortícolas (frutilla), cultivos de granos tanto leguminosas (soja) como cereales (trigo, cebada) y otros cultivos de interés agroindustrial (caña de azúcar).

### Competitividad, equidad y sustentabilidad: otros desarrollos

La competitividad de esta tecnología está determinada por las ventajas que derivan del reemplazo total o parcial de los agroquímicos de síntesis que provienen de fuentes no renovables como las materias primas fósiles (petróleo, gas y carbón). Este bioproducto está dirigido a un mercado relativamente nuevo que está actualmente en crecimiento. Si bien ya se obtuvieron productos que presentan

el mismo modo de acción como inductores de defensa, estos son extremadamente costosos (hasta 100 euros por litro) y son comercializados casi exclusivamente en los mercados de EE.UU. y la Unión Europea. En este caso se prevé que este producto pueda estar al alcance de pequeños, medianos y grandes productores del sector agropecuario. Su comercialización en el extranjero contribuirá con el ingreso de divisas y con la venta de un producto con alto valor agregado obtenido con trabajo argentino.

Otro de los desarrollos con tecnología PSP conducido por la EEAOC y que se encuentra en una etapa más preliminar consiste en combinar uno o más compuestos activos en extractos vegetales

que, además de tener un efecto directo contra patógenos, tengan la capacidad de inducir la defensa de las plantas e incrementar su rendimiento. Estos resultados fueron patentados en el año 2008 en Argentina, y en el año 2009 en Brasil y México. El resultado satisfactorio de varios años de investigación aplicada en limoneros, caña de azúcar, soja y frutilla bajo condiciones controladas, y el bienvenido aporte del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica de la Nación para la adquisición del equipamiento necesario para montar una planta piloto (Proyecto EMPRETECNO), permitirá escalar la producción de este nuevo bioproducto de tal forma que se pueda seguir con la etapa de evaluaciones a campo en vistas de avanzar con los

estudios que permitan el registro del mismo.

El desarrollo de este tipo de bioinsumos marca un cambio de paradigma en la agronomía, con una perspectiva más holística que no solo se concentra en la productividad, sino también en la sostenibilidad ambiental, económica y social de la producción y en el legado a las generaciones futuras.

#### ■ Agradecimientos

**E**n memoria de nuestro querido colega y amigo Ing. M. Sc. Miguel Morandini. Se agradece a la Lic. Paula Claps, Lic. Paula Insaurralde y a la Dra. Gabriela Michavila por su contribución en el desarrollo de la parte experimental y ensayos a campo.



## Bibliografía citada

**Aziz, A.; P. Trostel-Aziz; L. Dhuicq; P. Jeandet; M. Couderchet and G. Vernet. 2006.** Chitosan oligomers and copper sulfate induce grapevine defense reactions and resistance to gray mold and downy mildew. *Phytopathology* 96, 1188-1194.

**Castagnaro, A. P.; J. C. Díaz-Ricci; N. R. Chalfoun; J. Racedo and S. M. Salazar. 2012.** *Polypeptide that induces defense against biotic stress in plants, nucleotide sequence that codes for same, microorganism, compositions and methods.* PCT/ES2012/070173. WO2012123614 (A1). Approved in AR, EP, US, RU, PE, NZ, MX, CO, CA, and AU. [En línea] Disponible en: [https://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?FT=D&date=20120920&DB=&locale=en\\_EP&CC=WO&NR=2012123614A1&KC=A1&ND=5](https://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?FT=D&date=20120920&DB=&locale=en_EP&CC=WO&NR=2012123614A1&KC=A1&ND=5).

**Chalfoun, N. R.; A. P. Castagnaro and J. C. Díaz-Ricci. 2011.** Induced resistance activated by a culture filtrate derived from an avirulent pathogen as a mechanism of biological control of anthracnose in strawberry. *Biol. Control* 58, 319-329.

**Chalfoun, N. R.; C. F. Grellet-Bournonville; M. G. Martínez-Zamora; A. Díaz-Perales; A. P. Castagnaro and J. C. Díaz-Ricci. 2013.** Purification and characterization of AsES protein a subtilisin secreted by *Acremonium strictum* is a novel plant defense elicitor.

*J. Biol. Chem.* 288, 14098-14113.

**Chalfoun, N. R.; S. B. Durman; F. Budeguer; M. de P. Caro; R. P. Bertani; P. Di Peto; S. A. Stenglein; M. P. Filippone; E. R. Moretti; J. C. Díaz Ricci; B. Welin and A. P. Castagnaro. 2018a.** Development of PSP1, a Biostimulant Based on the Elicitor AsES for Disease Management in Monocot and Dicot Crops. *Front. Plant Sci.* 9: 844.

**Chalfoun, N. R.; S. B. Durman; J. González-Montaner; S. Reznikov; V. De Lisi; V. González; E. R. Moretti; M. R. Devani; L. D. Ploper; A. P. Castagnaro and B. Welin. 2018b.** Elicitor-Based Biostimulant PSP1 Protects Soybean Against Late Season Diseases in Field Trials. *Front. Plant Sci.* 9: 763.

**French-Monar, R. D.; F. A. Rodrigues; G. H. Korndörfer and L. E. Datnoff. 2010.** Silicon suppresses Phytophthora blight development on bell pepper. *J. Phytopathol.* 158: 554-560.

**Lenssen, A. 2013.** Biofield and fungicide seed treatment influences on soybean productivity, seed quality and weed community. *Agric. J.* 8: 138-143.

**Lyon, G. D.; T. Reglinski and A. C. Newton. 1995.** Novel disease control compounds: The potential to 'immunize' plants against infection. *Plant Pathol.* 44: 407-427.

**Ploper, L. D.; V. González; M. R. Galvez; M. A. Zamorano and C. G. Díaz. 2006.** "Enfermedades del cultivo de soja en el Noroeste Argentino y su manejo". En *Producción de Soja en el Noroeste Argentino* M. Devani, F. Ledesma, J. Lenis & L.D. Ploper (Eds.) Tucumán, Argentina: EEAOC-Aceitera General Deheza: 129-161.

**Renard-Merlier, D.; B. Randoux; E. Nowak; F. Farcy; R. Durand and P. Reignault. 2007.** Iodur 40, salicylic acid, heptanoyl salicylic acid and trehalose exhibit different efficacies and defence targets during a wheat/powdery mildew interaction. *Phytochemistry* 68: 1156-1164.

**Salazar, S. M.; A. P. Castagnaro; M. Arias; N. R. Chalfoun; U. Tonello and J. C. Díaz-Ricci. 2007.** Induction of a defense response in strawberry mediated by an avirulent strain of *Colletotrichum*. *Eur. J. Plant Pathol.* 117: 109-122.

**Salazar, S. M.; C. F. Grellet; N. R. Chalfoun; A. P. Castagnaro and J. C. Díaz-Ricci. 2013.** Avirulent strain of *Colletotrichum* induces a systemic resistance in strawberry. *Eur. J. Plant Pathol.* 135: 877-888.

**Yakhin, O. I.; A. A. Lubyantsev; I. A. Yakhin and P. H. Brown. 2017.** Biostimulants in Plant Science: A Global Perspective. *Front. Plant Sci.* 7: 1-32.