

Teóricos

Día 1

9:00- 10:00 Presentación del curso y de los estudiantes.

10:00-12:00 Las enfermedades de las plantas, su importancia y control. Definiciones de enfermedad. Ciclo de la enfermedad. Patogénesis. Desarrollo de la enfermedad en los cultivos. Enfermedades monocíclicas y policíclicas. Control de enfermedades de plantas. Tipos de Control y diferentes estrategias. Evolución del concepto de Control. Desde las aplicaciones indiscriminadas de fungicidas a la Producción Integrada

Día 2

09:00-11:00 Problemática del Control Químico. Necesidad de metodologías alternativas y complementarias al uso de fungicidas.

11:00-12:00 Control biológico. Principales definiciones y conceptos.

Día 3

9:00-11:00 Agentes microbianos de control biológico (ACB): Hongos, bacterias y virus Control biológico mediante el uso de sustancias de origen natural. Características ideales de un agente microbiano de biocontrol.

11.00-12.00 La bio-promoción del crecimiento vegetal como forma de enfrentar a los patógenos de plantas. Microorganismos promotores del crecimiento vegetal. Ejemplos y aplicaciones.

Día 4

09:00-10:00 Aislamiento y selección de agentes de control biológico. Estrategias y técnicas utilizadas.

Aislamiento de antagonistas. Aislamiento de suelo. Aislamientos de rizosfera y rizoplano.

Aislamiento de flora epifítica y endofítica. Selección de los antagonistas. Selección *in vitro*, *in vivo* y combinada.

10:00-11:00 Estadística aplicada al control biológico. Diseño estadístico de los experimentos. Análisis de incidencia y severidad

11:00-13:00 Mecanismos de acción de los agentes de control biológico. Mecanismos directos e indirectos. Amensalismo, reducción de la virulencia del patógeno, parasitismo, competencia, inducción de resistencia. Ejemplos

Día 5

09:00-11:00 La resistencia inducida en las plantas. Inducción de resistencia por agentes de biocontrol

11:00-12:00 Identificación y caracterización de los ACB. Importancia de la correcta identificación y caracterización de los ACB. Técnicas de identificación y caracterización de microorganismos aislados.

12:00-13:00 Identificación molecular de levaduras biocontroladoras

Día 6

09:00-11:00 Métodos para potenciar la acción de los ACB.

11:00-13:00 Producción de ACB

Día 7

9:00-11:00 Formulación de productos de biocontrol

11.00-12.00 Aplicación de agentes de biocontrol

12.00-13.00 Control biológico postcosecha

Día 8

9:00-11:00 Controles necesarios en formulaciones para biocontrol

11:00-13:00 Uso de bacteriófagos como agentes de biocontrol

Día 9

9:00-11:00 Experiencias exitosas de desarrollo de metodologías de CB en Latinoamérica

Día 10

9:00-12:00 Registro de agentes de biocontrol: Experiencias en Uruguay, Argentina y Brasil MS WB

17:30-18:30 Evaluación y cierre del curso

Práctico

Los estudiantes se dividirán en 5 grupos. Durante el desarrollo del curso cada grupo aplicará diferentes técnicas para el desarrollo de métodos de control biológico para un patosistema específico. Cada grupo estará dirigido por un docente que los guiará en el trabajo. El primer día se entregará a cada grupo de alumnos una situación problema diferente (una enfermedad que afecta determinado cultivo). Durante el curso cada grupo buscará y seleccionará posibles antagonistas, determinará los mecanismos por los que ejerce su acción, identificará y realizará ensayos preliminares de biocontrol. Se entregará material de lectura que incluirá descripción del patógeno a controlar y ciclo de la enfermedad causada por dicho patógeno. Cada grupo trabajará sobre una situación problema particular pero todos los grupos manejarán todas las técnicas descritas en el curso práctico. Cada clase práctica contará con una introducción explicativa al comienzo de la misma y los estudiantes contarán con protocolos a seguir para cada actividad. El último día cada grupo expondrá la situación problema, el encare y la resolución de la misma, así como las perspectivas de cada trabajo. El programa práctico cuenta además con algunas clases cuyas actividades no están relacionadas a la resolución de la situación problema. Se trata de actividades grupales que serán discutidas en conjunto.

Se plantearán 5 situaciones problema:

Situación Problema 1.- Control biológico del tumbado de la lechuga ocasionado por *Sclerotinia sclerotiorum*.

Situación Problema 2.- Control biológico de la podredumbre azul del manzano ocasionada por *Penicillium expansum*.

Situación Problema 3.- Control biológico del marchitamiento vascular del tomate ocasionado por *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

Situación Problema 4.- Control Biológico de la fusariosis de espiga en trigo ocasionada por *Fusarium graminearum*.

Situación Problema 5.- Control Biológico del cancro bacteriano del tomate causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Día 1

a) Entrega de las situaciones problema y discusión del trabajo a realizar

b) Aislamiento de la flora epifítica y endofítica del vegetal a proteger en busca de potenciales Agentes de Control Biológico. Aislamiento selectivo y no selectivo, aislamiento diferencial.

Día 2

a) Caracterización macro y microscópica, de aislamientos obtenidos. Reaislamiento en medio no selectivo.

b) Preparación de extractos de plantas y propóleos para ensayos de actividad antimicrobiana

Día 3

a) Ensayos de selección de antagonistas. Selección *in vitro* y sobre material vegetal.

b) Ensayos de Actividad antimicrobiana. Presentación de técnicas para detectar actividad antimicrobiana de sustancias naturales *in vitro*: ensayos de difusión, ensayos de dilución (concentración inhibitoria mínima y CE50) Se estudiará actividad antimicrobiana contra los patógenos de cada problema. Se utilizarán diferentes propóleos y extractos de plantas

Día 4

a) Ensayos para búsqueda de bacteriófagos a partir de diferentes muestras para control de bacterias fitopatógenas. Cada grupo recibirá una bacteria y una muestra para realizar el ensayo.

b) Búsqueda de micovirus en diferentes cepas del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*. Cada grupo recibirá una cepa para realizar el ensayo.

Día 5

a) Lectura de ensayos de actividad antimicrobiana sembrados en la tercer clase

b) Análisis de los resultados de los ensayos de selección realizados en la tercer clase. Selección de potenciales biocontroladores. Pruebas de Identificación fenotípica de los microorganismos seleccionados

c) Lectura del ensayo de búsqueda de bacteriófagos

Día 6

a) Lectura de pruebas de identificación sembradas la clase anterior y realización de pruebas complementarias de identificación.

b) Caracterización de antagonistas seleccionados y determinación de mecanismos de biocontrol. Ensayos para detectar producción de antimicrobianos solubles y volátiles (cultivos duales), producción de enzimas (quitinasas, glucanasas), producción de sideróforos, producción de biofilms, producción de HCN, producción de hormonas vegetales..

Día 7

a) Lectura de ensayos complementarios de identificación

b) Métodos de identificación molecular. Discusión de pasos a seguir. Extracción de ADN y amplificación de la región génica seleccionada para identificación dependiendo del microorganismo seleccionado. (No se realizará secuenciación)

Día 8

a) Identificación de levaduras mediante ensayos estándares de RFLP (con 3 enzimas de restricción) de la región ITS1-ITS2 utilizando la base de datos Yeast ID. (Sólo en el caso de levaduras se realizará este ensayo para corroborar identificación ya que la mencionada base de datos permite identificar mediante patrones de RFLP de la región amplificada). Si los grupos no han seleccionado levaduras se realizará el ensayo con aislamientos de otro grupo o proporcionados por los docentes

b) Ensayos de control microbiológico de un formulado comercial para biocontrol

Día 9

a) Lectura de pruebas de caracterización de antagonistas.

b) Lectura del patrón de RFLP obtenido la clase anterior. Búsqueda en la base de datos e identificación de las levaduras analizadas.

c) Discusión la metodología utilizada y de los resultados obtenidos. Planteamiento de perspectivas. Redacción del informe y preparación de la presentación con los resultados de los trabajos prácticos.

Día 10

Presentación de trabajos por parte de los estudiantes. Evaluación y cierre del curso