



Dirección General de Servicios Agrícolas Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca República Oriental del Uruguay

Av. Millán 4703, Montevideo. CP 12.900 . Teléfono: (598) -2304 3992

Web: http://www.mgap.gub.uy

INFORME TÉCNICO PARA REGISTRO DE SEMILLA PRE-INOCULADA

EMPRESA SOLICITANTE: CALISTER S.A.

PRODUCTO: SEMILLA PRE-INOCULADA PARA SOJA

EXP Nº: 366

Descripción del producto:

- Inoculante: Inoculante en soporte turba: NITRONAT de Calister S.A (Nº Registro 03 en MGAP- DGSSAA)
- Método slurry con Bioprotector As Stick Soja.
- Fungicida: Fludiox forte (Nº Registro 4178 en MGAP-DGSSAA).
 Principio Activo: Metalaxil CAS Nº 57837-19-1, Fluodioxonil CAS Nº 131341-86-1

La semilla se conservó a temperatura ambiente durante todo el periodo de evaluación a solicitud de la Empresa registrante.

Las evaluaciones de productos y sus aplicaciones para registro, se realizaron de acuerdo con los parámetros y metodologías definidas por la DGSSAA.

1. Determinación de rizobios viables sobre la semilla en función del tiempo.

El número de rizobios sobre la semilla se determinó a tiempo 0, 7,14, 21,28 y 43 días post inoculación por la técnica de recuento de viables en placa. Se tomaron 90 semillas de la muestra de pre-inoculado en frascos con 90 ml de solución fisiológica estéril y 360 μl de solución dispersante (Tween 80 2.5% p/v). Los frascos se agitaron durante 15 minutos en agitador de golpes. Se extrajo 1 ml y se diluyó en solución fisiológica estéril sucesivamente, hasta completar la dilución 10⁻⁵. Se sembró 0.1 ml de cada dilución por triplicado y por extensión en superficie con espátula de Drygalski sobre medio YEM. El medio YEM base contiene: K₂HPO₄, 0.5g; MgSO₄.7H₂O, 0.2g; NaCl, 0.1g; manitol, 10g; extracto de levadura, 0.5g; FeCl₃.6H₂O, una gota de solución al 10%; MnSO₄, una gota de solución al 10%; Rojo Congo, 5 ml.l⁻¹ de una solución 1/400; H₂O csp 1L, agar, 15g.l⁻¹; pH 6.8 . Las placas se mantuvieron

invertidas en estufa a 28 °C de 7 a 10 días, finalizado el período de incubación se contaron aquellas que presentaban entre 30 y 300 colonias verificando la proporcionalidad entre diluciones y promediando los resultados de las tres repeticiones

2. Identificación de los microorganismos: BOX PCR.

Metodología aplicada: La identificación de las cepas bacterianas presentes en la semilla inoculada se realizó por el método de tipificación molecular rep-PCR, amplificándose específicamente las secuencias BOX presentes en el genoma bacteriano (BOX-PCR) (Kaschuk et al., 2005). Este procedimiento genera un patrón de bandas característico de cada cepa en un gel de electroforesis de agarosa, permitiendo verificar que la cepa aislada se corresponda con la/s recomendada/s por el MGAP.

3. Validación de la nodulación. Número más probable (NMP) – diluciones e infección en plantas.

El método involucra la inoculación de diluciones crecientes de la suspensión obtenida a partir de semilla pre-inoculada. A partir de los resultados positivos o negativos se estima el número de células viables capaces de infectar un huésped específico en condiciones controladas. Se seleccionaron semillas de soja de tamaño uniforme y se desinfectaron superficialmente con alcohol 95% (3 minutos), hipoclorito de sodio al 1% (3 minutos) y seis lavados vigorosos con agua estéril. Se pregerminaron en placas conteniendo agar-agua al 0.8% durante 48 horas en estufa a 28°C. Las semillas pregerminadas se sembraron en frascos adaptados con 400 ml de solución nutritiva para crecimiento de plantas (Somasegaran y Hoben, 1985) y papel absorbente poroso como soporte (Hungría y Araujo, 1994). Dos días posteriores a la siembra se inocularon las plantas con 1 ml de cada dilución por triplicado. Las plantas se mantuvieron en condiciones controladas de fotoperíodo (14h luz) y temperatura entre 24°C/26°C (noche /día). La lectura definitiva se realizó a las 4 semanas post-siembra. La estimación del NMP se realizó a partir de la presencia o ausencia de nódulos en la serie de diluciones estudiadas (Hungría y Araujo, 1994).

4. Determinación de parámetros de nodulación y producción de biomasa aérea en condiciones controladas.

Siete, 14, 21, 28 y 43 días post inoculación, se evaluaron parámetros de nodulación del tratamiento pre-inoculado. Macetas con 700 g de arena lavada y neutralizada estéril, se sembraron con cinco semillas del tratamiento mencionado (luego raleadas a tres). En todos los

tiempos evaluados se incluyó un tratamiento con inoculación convencional (Inoc Conv) con inoculante turba , Fludiox forte y adherente formulado en base a metilcelulosa tratado en el momento de la siembra y un testigo (T) sin inocular. Se empleó un diseño completamente al azar con 4 repeticiones. Las plantas se regaron periódicamente con solución nutritiva libre de nitrógeno (Somasegaran y Hoben, 1985) y se mantuvieron en condiciones controladas de fotoperíodo (14h luz) y temperatura entre 24°C/26°C (noche /día). La cosecha se realizó 35 días después de la siembra. Se evaluó número y peso seco de nódulos. Los nódulos se secaron en estufa a 60°C hasta peso constante. El análisis de varianza se realizó por ANOVA-1 para determinar si existían diferencias entre las medias de los tratamientos. Se utilizó un test DGC de comparación de medias, para establecer cuales tratamientos se diferenciaban significativamente. Para el análisis estadístico de esta respuesta fenotípica se utilizó el programa InfoStat (2008).

RESULTADOS

1. Determinación de rizobios viables sobre la semilla en función del tiempo.

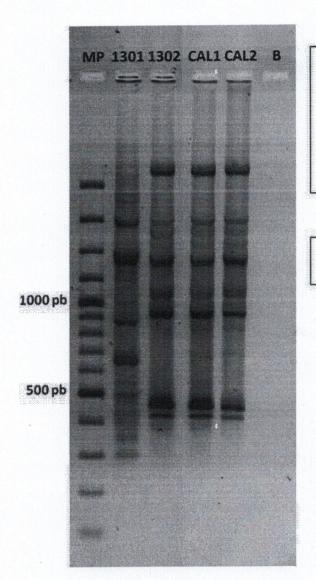
En la Tabla 1 se presentan los resultados de la densidad de rizobios (UFC) sobre la semilla de soja pre-inoculada en función del tiempo. Las semillas pre-inoculadas fueron almacenadas a temperatura ambiente a solicitud de la empresa registrante. Los resultados muestran que a los 43 días post-inoculación disminuye el número de bacterias por semilla por debajo del mínimo requerido (1x10⁵ UFC/semilla).

Recuento (UFC/sem)	Tiempo
4,2E+07	ТО
5,7E+06	T7
1,3E+06	T14
4,3E+05	T21
3,9E+05	T28
4,4E+04	T43

Tabla 1:UFC/semilla obtenidas por el método de recuento en placas por extensión en superficie

2. Identificación de los microorganismos.

El perfil genético de las colonias crecidas en M-79 obtenidas a partir de la semilla preinoculada coinciden con el patrón de bandas de las cepa recomendada por la DGSSAA para la fabricación de inoculantes para Soja: U1302 (Fig 1)



Referencias:

MP: marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas)

1301: cepa comercial U1301 1302: cepa comercial U1302

CAL1: muestra 1 semilla pre-inoculada CALISTER CAL2: muestra 2 semilla pre-inoculada CALISTER

B: blanco

Resultados:

CAL1 y CAL2 = U1302

Figura 1: Perfil genético (BOX-PCR) de colonias obtenidas a partir de semilla inoculada de la empresa Calister S.A crecidas en medio M-79.

3. Validación de la nodulación. Número más probable (NMP) – diluciones e infección en plantas.

En paralelo a los recuentos en placas y utilizando las mismas diluciones se realizó el test NMP a tiempo 7, 14, 21, 28 y 43 días. En la Tabla 2 se presentan los valores de NMP con diluciones decimales y 3 repeticiones, así como también los límites mínimo y máximo de intervalo de confianza (IC) a 95%.

	Resultado (UFC/semilla)			
Tiempo	IC mínimo	NMP	IC máximo	
T7	5,3E+06	1,4E+07	5,1E+07	
T14	1,6E+06	3,8E+06	1,7E+07	
T21	2,0E+05	4,1E+05	9,3E+05	
T28	2,0E+05	2,9E+05	6,0E+05	
T43	5,3E+04	1,5E+05	4,9E+05	

Tabla 2:NMP a diferentes tiempos post-inoculación.

3. Determinación de parámetros de nodulación en condiciones controladas.

La Tabla 3 presenta los datos de número y peso seco de nódulos 35 días posteriores a la siembra. Para el tratamiento de inoculación convencional, el cual fue sembrado en cada uno de los tiempos evaluados inmediatamente después de la inoculación se obtuvieron recuentos promedio de 3.8x10⁵ UFC/semilia.

En todos los tiempos evaluados los nódulos observados en los tratamientos de pre-inoculado (**preinoc**) e inoculación convencional (**inoc conv**), se localizaron en su mayoría sobre raíz principal. No se observaron diferencias significativas entre el tratamiento pre-inoculado y la inoculación convencional en cuanto a número y peso seco de nódulos hasta un tiempo de 28 días post-inoculación. A tiempo 43 días post-inoculación se observaron diferencias significativas entre el tratamiento pre-inoculado y la inoculación convencional en los dos parámetros evaluados. En todos los tiempos evaluados el tratamiento Testigo sin inocular no presentó nódulos en ninguna de las repeticiones.

Tratamiento	Tiempo (días)	Nº nódulos/maceta	Peso nódulos (g/maceta)
inoc conv		66.75 a	0.1183 a
preinoc	7	69.33 a	0.1304 a
testigo		s/n *	s/n *
inoc conv		64.75 a	0.0966 a
preinoc	14	46.75 a	0.1098 a
testigo		s/n *	s/n *
inoc conv		55,25 a	0.1483 a
preinoc	21	50.75 a	0.1279 a
testigo		s/n *	s/n *
inoc conv		61,66 a	0.1583 a
preinoc	28	53.40 a	0.1548 a
testigo		s/n *	s/n *
inoc conv		74.33 a	0.1972 a
preinoc	43	37.75 b	0.1236 b
testigo		s/n *	s/n *

Tabla 3: Efecto de la inoculación anticipada sobre parámetros de nodulación. Los resultados son medias de 4 repeticiones. s/n: sin nódulo. Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0.05)

ZAFRA 2012-2013.

Campo.

Es la etapa final del proceso de registro, tiene por objetivo verificar los efectos declarados por el fabricante.

El ensayo se instaló el 14 de Noviembre de 2012 en el Dpto. de Lavalleja en un suelo sin antecedentes del cultivo de soja sobre campo natural.

Se fiscalizó la instalación del ensayo.

La semilla para la siembra se mantuvo en custodia en el Lab. de Microbiología de Suelos de INIA "Las Brujas" hasta el momento de la siembra.



Se sembraron líneas de 250 metros de largo por 3 metros de ancho de cada uno de los tratamientos. Para los muestreos se marcaron 6 parcelas (repeticiones). Se incluyó un Testigo positivo (sin inocular con el agregado de N mineral) y Testigo negativo (sin inocular y sin agregado de N). El diseño incluyó los siguientes tratamientos:

- T4- Tratamiento pre-inoculado con turba NITRONAT + FLUDIOX FORTE (100 ml/100 kg de semilla) 27 días previos a la siembra
- T5- Tratamiento pre-inoculado con turba NITRONAT + FLUDIOX FORTE (100 ml/100 kg de semilla) 20 días previos a la siembra.
- T6- Testigo positivo: inoculación convencional con turba 24 hs previas a la siembra
- T: Testigo negativo (semilla sin inocular)
- N: Testigo sin inocular con el agregado de N.*

*El 8/01/2013 se agregaron 211 kg de N en forma de Urea

Se estudiaron los siguientes parámetros: Nodulación (peso y Nº de nódulos). Rendimiento (Kg/há).

Resultados:

A- Recuento de rizobios viables sobre semilla en los tratamientos evaluados al momento de la siembra

T4- Tratamiento pre-inoculado con turba 27 días previos a la siembra + FLUDIOX FORTE:

1.1X10⁵ UFC/semilla

T5-Tratamiento pre-inoculado con turba 20 días previos a la siembra + FLUDIOX FORTE: 3.8X10⁵ UFC/semilla.

T6-Testigo positivo (inoculación convencional con turba 24 hs previas a la siembra: 2.0x10⁵ UFC/semilla.

B- Evaluación de parámetros de nodulación: número y peso seco de nódulos.

Se muestrearon 5 plantas por parcela a los 40 días post-emergencia. Se realizó conteo de nódulos por planta y peso seco de los mismos.

El análisis de varianza se realizó por ANOVA-1 para determinar si existían diferencias entre las medias de los tratamientos. Se utilizó un test DGC de comparación de medias, para establecer cuales tratamientos se diferenciaban significativamente. Para el análisis estadístico de esta respuesta fenotípica se utilizó el programa InfoStat (2008).

Nº de nódulos/planta.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
nódulos/planta18		0,51	0,17	26,08

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=14,6263

Tratamiento	Medias	n	
T5	40,73	6	Α
T6	43,30	6	Α
T4	45,83	6	Α

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

tudiantil Versión Estudiantil Versión Estudiantil Versión Estudiantil Versión Estudiantil Versión Estudiani Títulorsión Estudiantil Versión E Versión Estudiantil Versión Estudiantil tudiantil 14,527 Estudiantil Version Estudiantil Estudiantii Versión Estudiantil tudiantil Versión Estudiant Versión Estud 50,18 Versión Estudiantil turianti vers Versión Estudiantil ión Estudiani Ve **E**on Estudiantil tur**jó**ntil Vers Ve**jó**n cstudi ión Estudian Versión Estudiantil Versi tur**e**ntil Version i Version Estudiantil ion Estudiai Versk ión Estudiai Versión Estudiantil Versk /ersión Est tudiantil Vers Versic T4 T6 Versión Estudiantil tudiantil Versión Estudiantil Tratamiento version Estudiantii Version E Versión Estudiantil Versión Estudianua

Grafico 1: Número de nódulos por planta en 6 repeticiones (5 plantas por parcela)

Peso seco de nódulos/planta.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
mg/planta	18	0,63	0,37	27,35

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=70,2993

Tratamiento	Medias	n	
T5	183,33	6	Α
T6	190,00	6	Α
T4	221,67	6	Α

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

tudiantil Versión Estudiantil Versión Estudiantil Versión Estudiantil Versión Estudiantil Versión Estudiant Título sión Estudiantil Versión E tudiantil 265,10 Estudiantil Versión Estudiantil Versión Estudiantil Krudlantil tudiantil Version Estudiant Versión Echidia 238,50 Versión studiantil tudiantii vers Ve**g**ón Estudia tu **a**nti Ve són Estudiantil Versión tur Entil Versión Estudian edianti Version Estudiantil studiantil Versio in Estudian Versión udiantii Versió studiantil ersión Est Versión Estudiantil tudiantil Version Estudian Versión T6antil tudiantii Versión Estudiantii Tratamiento version Estudiantil Versión E Versión Estudiantil Versión Estudianun

Grafico 2: Peso seco de nódulos por planta en 6 repeticiones (5 plantas por parce

En los tres tratamientos se observó nodulación adecuada, entre 30-50 nódulos por planta, en su mayoría ubicados en la parte superior de raíz primaria y de tamaño mediano a grande (4-6mm de diámetro). En todos los casos los nódulos presentaron una coloración interna rojiza. No se observaron diferencias significativas en número y peso seco de nódulos entre tratamientos.

C- Rendimiento.

Para evaluación de rendimiento se cosecharon 5 metros lineales de 2 líneas centrales. Los pesos fueron corregidos a 13% de humedad.

El análisis de varianza se realizó por ANOVA-1 para determinar si existían diferencias entre las medias de los tratamientos. Se utilizó test de Duncan de comparación de medias, para establecer cuales tratamientos se diferenciaban significativamente. Para el análisis estadístico de esta respuesta fenotípica se utilizó el programa InfoStat (2008).

Rendimiento (Kg/ha)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
kg/ha	30	0,69	0,55	14,96

Test:DGC Alfa=0,10 PCALT=375,5406

Medias	n			
1623,00	6	Α		
	6		В	
	6		В	
2353,67	6		В	
2843,33	6			С
	1623,00 2178,33 2273,33 2353,67	1623,00 6 2178,33 6 2273,33 6 2353,67 6	1623,00 6 A 2178,33 6 2273,33 6 2353,67 6 2843,33 6	1623,00 6 A 2178,33 6 B 2273,33 6 B 2353,67 6 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,10)

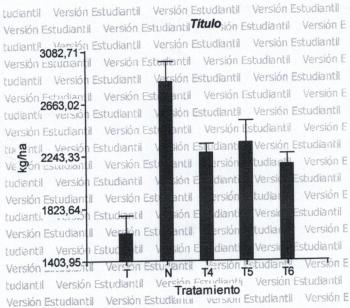


Grafico 3: Rendimiento en grano (Kg/ha) corregido a 13% de humedad en 6 repeticiones.

Para el parámetro rendimiento (kg/ha) no se observaron diferencias significativas al 0.10% entre los tratamientos inoculados (T4, T5 y T6). Los tratamientos inoculados se diferenciaron significativamente del testigo sin inocular y sin N (T) y del testigo con agregado de N (N). Se observaron incrementos en el rendimiento de hasta un 45% de los tratamientos pre-inoculados respecto al tratamiento sin inocular (T).

Según estos resultados se otorga registro provisorio con validez de un año para permitir la venta de semilla pre-inoculada con inoculante en base turba, con un retraso en la siembra luego de la inoculación de hasta 25 días, sin que se afecten los factores relacionados con la Fijación Biológica del Nitrógeno.

En este plazo se deberán instalar y evaluar nuevos ensayos a campo en suelos sin historia de soja. Cumplida esta etapa y si se obtienen resultados favorables se otorgará el registro definitivo.

Se otorga número de registro provisorio de producto: 111

DERIA AGRICOLOS AGRICOS AGRICO

Ma. del Carmer Mayans Lic. Bioquímica





Montevideo, 12 de agosto de 2014.-

VISTO: La solicitud de registro efectuada por la firma: CALISTER S.A para el producto: SEMILLA PRE-INOCULADA PARA SOJA. (Curada con FLUDIOX FORTE e inoculada con NITRONAT Soja)

CONSIDERANDO:

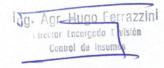
- Las evaluaciones realizadas por el Laboratorio de Microbiología de Suelos de INIA Las Brujas.
- II) Las evaluaciones a campo efectuadas por la División Control de Insumos.

ATENTO: A lo dispuesto en los Decretos 546/81 y 7/99

LA DIRECCIÓN GENERAL DE SERVICIOS AGRÍCOLAS RESUELVE

- Autorizar el registro DEFINITIVO del producto SEMILLA PRE-INOCULADA PARA SOJA presentado por la firma CALISTER S.A, el que quedará inscripto con el Nº 111.
- 2) El tiempo autorizado para la comercialización de este producto es de hasta 29 DIAS POST-INOCULACIÓN.
- 3) Dicha autorización tendrá un plazo de validez de 4 AÑOS, a partir de la fecha.
- 4) Extiéndase el certificado de registro.
- 5) Notifíquese a la firma interesada y entréguese el certificado de registro. Cumplido, pase a División Control de Insumos para su archivo.









Montevideo, 12 de agosto de 2014

CERTIFICADO DE REGISTRO PARA SEMILLA PRE-INOCULADA.

La División Control de Insumos de la Dirección General de Servicios Agrícolas del M.G.A.P. certifica que el producto Semilla pre-inoculada para Soja de la firma "CALISTER S.A" se habilita con Nº de registro 111. El tiempo autorizado para la comercialización de este producto es de hasta 29 días post-inoculación. Dicho registro tendrá 4 años de validez a partir de la fecha.

En cumplimiento de los Decretos 546/981 del 28/10/81, del 7/99 del 08/01/99 y en concordancia con la recomendación Nº 9/97 del SGT Nº 8 "Agricultura", MERCOSUR/GMC/RES Nº 28/98. La ficha técnica del producto se detalla a continuación:

NOMBRE DEL PRODUCTO:

SEMILLA CURADA Y PRE-INOCULADA CALISTER-SOJA.

NOMBRE DEL REGISTRANTE:

CALISTER S.A

NºREGISTRO DEL PRODUCTO:

111

INOCULANTE:

Soporte turba NITRONAT de Calister S.A. (№ Registro 03)

ADITIVO ADHESIVO:

Método slurry con Bioprotector As Stick Soja

FUNGICIDA:

Fludiox Forte (Nº Registro 4178)

TIEMPO DE PRE-INOCULADO:

29 DÍAS



Ing. Agr Hugo Ferrazzini

Director Encurgado División

Control de Insumos