

**Producto 01:** Mayor producción agrícola con menor emisión de óxido nitroso (ATN-RF-18786-RG).

Diagnóstico de inocuidad de los inoculantes actuales.

**Autores:** Nicolás Ayub, Gabriela Soto, Florencia del Papa, Antonio Lagares, Raúl Platero, Elena Fabiano, Oscar Ruiz, Vanina Maguire, Nubia Moreno, Maribel Parada, Juan Sanjuán

**Año:** 2023



Códigos JEL: Q16

ISBN:

FONTAGRO (Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria) es un mecanismo único de cooperación técnica entre países de América Latina, el Caribe y España, que promueve la competitividad y la seguridad alimentaria. Las opiniones expresadas en esta publicación son de los autores y no necesariamente reflejan el punto de vista del Banco Interamericano de Desarrollo (BID), del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), FONTAGRO, de sus Directorios Ejecutivos ni de los países que representan.

El presente documento ha sido preparado por Nicolás Ayub, Gabriela Soto, Florencia del Papa, Antonio Lagares, Raúl Platero, Elena Fabiano, Oscar Ruiz, Vanina Maguire, Nubia Moreno, Maribel Parada, Juan Sanjuán

Copyright © 2023 Banco Interamericano de Desarrollo. Esta obra se encuentra sujeta a una licencia Creative Commons IGO 3.0 Reconocimiento-NoComercial-SinObrasDerivadas (CC-IGO 3.0 BY-NC-ND) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/igo/legalcode>) y puede ser reproducida para cualquier uso no comercial otorgando el reconocimiento respectivo al BID. No se permiten obras derivadas. Cualquier disputa relacionada con el uso de las obras del BID que no pueda resolverse amistosamente se someterá a arbitraje de conformidad con las reglas de la CNUDMI (UNCITRAL). El uso del nombre del BID para cualquier fin distinto al reconocimiento respectivo y el uso del logotipo del BID no están autorizados por esta licencia CC-IGO y requieren de un acuerdo de licencia adicional. Note que el enlace URL incluye términos y condiciones adicionales de esta licencia.

Esta publicación puede solicitarse a:

**FONTAGRO**

Correo electrónico: [fontagro@fontagro.org](mailto:fontagro@fontagro.org)

[www.fontagro.org](http://www.fontagro.org)



# Tabla de Contenidos

<b>Abstract .....</b>	<b>4</b>
<b>Resumen EJECUTIVO .....</b>	<b>5</b>
<b>Palabras Clave: .....</b>	<b>5</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>6</b>
<b>Información de Relevancia con una discusión técnica.....</b>	<b>7</b>
<b>Objetivos .....</b>	<b>8</b>
<b>Resultados .....</b>	<b>8</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>9</b>
<b>Conclusiones y recomendaciones.....</b>	<b>9</b>
<b>Referencias Bibliográficas .....</b>	<b>10</b>
<b>Instituciones participantes.....</b>	<b>11</b>



## ABSTRACT

La agricultura produce un 60% de la emisión de óxido nitroso (N<sub>2</sub>O), uno de los tres principales gases de efecto invernadero responsables del calentamiento global. Paradójicamente, la agricultura es muy sensible al cambio climático, generando la necesidad de impulsar políticas de innovación tecnológica climáticamente inteligentes. En el presente proyecto de cooperación técnica multilateral se extenderán los beneficios tradicionales proporcionados por los inoculantes y se incorporarán nuevas características de reconocido valor ambiental (reducción de la emisión de N<sub>2</sub>O) y alto impacto económico (desarrollo de tolerancia a herbicidas y a estrés abiótico) mediante *non-GMO technologies*. Estas innovaciones tecnológicas permitirán incrementar la producción agropecuaria y reducir las emisiones de N<sub>2</sub>O en América latina y el Caribe, contribuyendo a la sustentabilidad de la agricultura y a la consolidación de la región como líder en el mercado mundial de inoculantes.

Agriculture produces 60% of nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) emissions, one of the three main greenhouse gases responsible for global warming. Paradoxically, agriculture is highly sensitive to climate change, generating the need to promote climate-smart technological innovation policies. In this present project of multilateral technical cooperation, the traditional benefits provided by inoculants will be extended, and new environmentally valuable characteristics (reduction of N<sub>2</sub>O emissions) and high economic impact (development of herbicide tolerance and abiotic stress) will be incorporated through non-GMO technologies. These technological innovations will allow increasing agricultural production and reducing N<sub>2</sub>O emissions in Latin America and the Caribbean, contributing to the sustainability of agriculture and the consolidation of the region as a leader in the global inoculant market.

La información que se presenta a continuación es acumulativa y hace referencia al año 1 y 2 del proyecto.



## RESUMEN EJECUTIVO

El óxido nitroso es un gas de efecto invernadero liberado a la atmósfera principalmente por bacterias que se encuentran en los suelos destinados a la agricultura. Dentro de estas bacterias, se destacan los inoculantes, que son microorganismos utilizados para promover el crecimiento vegetal. Como primer paso hacia la reducción drástica de la producción de óxido nitroso en la agricultura, nuestro equipo secuenció y analizó los genomas de los inoculantes modernos. Dentro de estos inoculantes, se observó que los utilizados en alfalfa y soja tienen el mayor potencial de impacto ambiental debido a la presencia de todos los genes necesarios para la producción de óxido nitroso. Además, se observó que los inoculantes utilizados en cultivos extensivos de gran importancia en la región, como el trigo, el arroz y el maíz, no contienen la dotación genética completa para producir óxido nitroso en forma individual, pero poseen genes capaces de llevar a cabo uno o más pasos del proceso de producción de óxido nitroso. Por lo tanto, la utilización de estos inoculantes representa un riesgo ambiental moderado. En base a los resultados obtenidos, se priorizará el mejoramiento genético de los inoculantes de alfalfa y soja para reducir la emisión de óxido nitroso.

**PALABRAS CLAVE:** OXIDO NITROSO, INOCULANTES, SOJA, ALFALFA, ARROZ, TRIGO, MAIZ



## INTRODUCCIÓN

Los inoculantes agrícolas, en su variedad de formas y aplicaciones, representan un segmento importante de la tecnología agrícola moderna. En un mundo donde la demanda de alimentos está en constante aumento y la presión sobre los recursos naturales es cada vez mayor, los agricultores buscan constantemente formas de mejorar la productividad de sus cultivos mientras minimizan el impacto ambiental. Los inoculantes agrícolas ofrecen una solución prometedora, al aprovechar las relaciones simbióticas entre las plantas y los microorganismos beneficiosos para promover el crecimiento de los cultivos, mejorar la salud del suelo y reducir la necesidad de fertilizantes químicos. Los microorganismos presentes en los inoculantes agrícolas juegan roles clave en el ciclo de nutrientes y la salud del suelo. Por ejemplo, las bacterias fijadoras de nitrógeno, como cepas de los géneros *Sinorhizobium* y *Bradyrhizobium*, son capaces de convertir el nitrógeno atmosférico en formas que las plantas pueden utilizar, lo que reduce la necesidad de fertilizantes nitrogenados y ayuda a mantener la fertilidad del suelo. Los hongos micorrícicos, por otro lado, forman asociaciones simbióticas con las raíces de las plantas, mejorando la absorción de nutrientes, especialmente fósforo, y aumentando la resistencia a enfermedades y condiciones adversas del suelo. La aplicación de inoculantes agrícolas puede realizarse de varias formas, según el tipo de producto y las condiciones específicas de cultivo. Los inoculantes de fijación de nitrógeno, por ejemplo, se aplican típicamente a las semillas antes de la siembra, mientras que otros pueden ser aplicados al suelo o al follaje de las plantas. La correcta aplicación y manejo de los inoculantes son cruciales para garantizar su efectividad y maximizar los beneficios para los cultivos y el medio ambiente. Uno de los principales beneficios de los inoculantes agrícolas es su capacidad para mejorar la eficiencia del uso de nutrientes, lo que puede traducirse en mayores rendimientos y menores costos de producción para los agricultores. Además, al reducir la necesidad de fertilizantes químicos, los inoculantes agrícolas pueden ayudar a mitigar la contaminación del agua y el suelo, así como a reducir las emisiones de gases de efecto invernadero asociadas con la producción de fertilizantes sintéticos. Sin embargo, a pesar de sus numerosos beneficios, los inoculantes agrícolas también enfrentan varios desafíos que deben abordarse para su adopción generalizada y efectiva. Por ejemplo, la viabilidad y estabilidad de los microorganismos en los inoculantes pueden variar según las condiciones de almacenamiento y aplicación, lo que puede afectar su eficacia en el campo. Además, la adaptación de los inoculantes a diferentes condiciones de suelo y cultivo puede ser un desafío, especialmente en sistemas agrícolas altamente heterogéneos. La investigación y el desarrollo continuos son fundamentales para superar estos desafíos y desbloquear todo el potencial de los inoculantes agrícolas. Se necesitan más estudios para comprender mejor los mecanismos subyacentes de acción de los microorganismos en los inoculantes y para identificar cepas más eficaces y adaptadas a diferentes condiciones agrícolas. Además, se requiere una mayor inversión en tecnologías de formulación y aplicación para garantizar la viabilidad y estabilidad de los inoculantes a lo largo de su ciclo de vida. La información que se presenta a continuación es acumulativa y hace referencia al año 1 y 2 del proyecto, siempre que esto aplique al documento que se presenta.

## INFORMACIÓN DE RELEVANCIA CON UNA DISCUSIÓN TÉCNICA

La mayoría de los inoculantes actualmente en uso fueron seleccionados en un período que abarcó desde las décadas de 1960 hasta los años 1990, es decir, antes de que el cambio climático global se convirtiera en una preocupación prioritaria. En aquel entonces, el enfoque principal del proceso de domesticación de estos inoculantes estaba centrado en identificar cepas con la máxima capacidad para aumentar la productividad y mejorar la calidad nutricional de los cultivos, con el fin de maximizar la rentabilidad del sector agropecuario. Sin embargo, con la creciente evidencia científica sobre el impacto negativo del cambio climático global en la producción agropecuaria, surge la necesidad imperiosa de evaluar el impacto ambiental de estos inoculantes.

El óxido nitroso ( $N_2O$ ) se destaca como uno de los principales gases de efecto invernadero responsables del cambio climático, y su producción antropogénica proviene principalmente de los microbios presentes en los suelos agrícolas. Esta producción de  $N_2O$  se lleva a cabo mayormente a través de un proceso de desnitrificación incompleta, en el cual los compuestos nitrogenados son reducidos secuencialmente por complejos enzimáticos como la nitrato reductasa (NAR), la nitrito reductasa (NIR) y la óxido nítrico reductasa (NOR) (Fig. 1). Por otro lado, la degradación del  $N_2O$  ocurre gracias a la actividad del complejo NOS (óxido nitroso reductasa), que convierte este compuesto en nitrógeno gaseoso ( $N_2$ ) (Fig. 1).

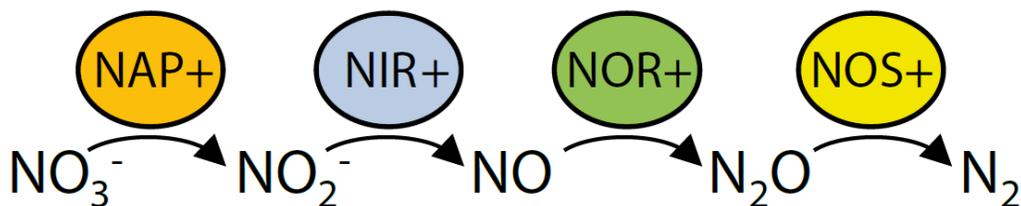


Fig. 1. Proceso de desnitrificación completo por el cual los complejos enzimáticos nitrato reductasa (NAP), nitrito reductasa (NIR), óxido nítrico reductasa (NOR) y óxido nitroso reductasa (NOS) reducen secuencialmente el nitrato hasta liberar nitrógeno gaseoso. Uno de los subproductos de este proceso es el óxido nitroso ( $N_2O$ ), un poderoso gas de efecto invernadero.

Se ha descrito previamente que la presencia de estos genes es un factor crítico para explicar la emisión de  $N_2O$  en la agricultura (Akiyama et al. 2016; Brambilla et al. 2018). En el marco de este proyecto, hemos llevado a cabo un análisis de la presencia de genes codificantes para los complejos enzimáticos de producción (NAP, NIR y NOR) y degradación (NOS) de  $N_2O$  en una amplia gama de inoculantes utilizados de manera extensiva en América Latina y el Caribe. Este estudio tiene como objetivo principal diagnosticar el potencial impacto ambiental de estos inoculantes. La información obtenida a partir de este análisis servirá como base fundamental para el diseño de futuras estrategias de mejoramiento genético tanto en los inoculantes actuales como en nuevos aislamientos que puedan tener potencialidades beneficiosas para el medio ambiente.



## OBJETIVOS

El objetivo principal del proyecto es desarrollar inoculantes para cultivos extensivos de América Latina y el Caribe capaces de disminuir la emisión de  $N_2O$  y de mejorar la productividad regional. El objetivo específico de este producto de conocimiento, denominado “Diagnóstico de inocuidad de los inoculantes actuales”, es analizar la presencia de los cluster NAP, NIR, NOR y NOS en los inoculantes modernos para comprender su inocuidad ambiental y eventualmente planificar estrategias de mejoramiento genético que permitan reducir la emisión de  $N_2O$ .

## RESULTADOS

Para comenzar se realizó una secuenciación liviana de los genomas de los inoculantes. Para esto se utilizó el Kit de Purificación de ADN Genómico Wizard (#A1120, Promega, USA). El secuenciamiento de los genomas se realizó en la Unidad de Genómica, Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular, CICVyA, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Buenos Aires, Argentina (<https://inta.gob.ar>) y en Macrogen (Korea). Se obtuvieron un total de entre 6 – 20 millones de lecturas pareadas de 32 o 151 pares de bases utilizando la tecnología Illumina Hiseq1500, lo que resultó en un promedio de cobertura genómica de mayor a 40 veces. Las lecturas de secuenciación se mapearon contra los replicones cromosómicos y plasmidicos de cepas de referencia que poseían la ruta de desnitrificación completa utilizando el software Geneious (Biomatters <http://www.geneious.com>). El análisis se desarrolló utilizando los siguientes parámetros: Mapeador: Geneious, Sensibilidad: Baja Sensibilidad / Más Rápido, Ajuste Fino: Ninguno (mapeo rápido de lecturas), Calidad de mapeo mínima: 30 y Mapear múltiples mejores coincidencias: Aleatoriamente. Los clusters de desnitrificación y los genes *housekeeping* utilizados como control fueron ensamblados de *ново* utilizando lecturas positivas de cada cepa que coincidían con las cepas de referencia. Este análisis informático nos permitió distinguir dos tipos de poblaciones bacterianas según su potencial impacto ambiental (potencial emisión de  $N_2O$ ), las cuales se describen a continuación: (1) La primera población, que incluye a las cepas *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079, *Bradyrhizobium japonicum* E109, *Sinorhizobium meliloti* B399 y *Sinorhizobium meliloti* B401, poseen todos los genes de producción de  $N_2O$  (NAP, NIR y NOR) pero perdieron los genes de degradación de este gas de efecto invernadero (NOS). (2) La segunda población, que incluye a las cepas *Bradyrhizobium diazoefficiens* SEMIA 5080, *Bradyrhizobium canariense* SEMIA 928, *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 5019, *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587, *Bradyrhizobium yuanmingense* P10 130, *Azospirillum brasilense* Az39 *Azospirillum brasilense* CNPSo 2083, *Azospirillum brasilense* CNPSo 2084 *Pseudomonas ogarae* FR1, *Pseudomonas fluorescens* Pf-5, *Paenibacillus* sp. 79, *Mesorhizobium* sp. GMSS17 y *Cupriavidus* sp. UYPR2.512 poseen algunos genes de producción de  $N_2O$  (NAP, NIR y/o NOR) o todos los genes de desnitrificación (NAP, NIR, NOR y NOS).



En la actualidad se continúan secuenciando genomas de inoculantes con alta eficiencia de fijación de nitrógeno en campo, dentro del cual se destaca la nueva cepa *Mesorhizobium* sp. RIZ17 aislada por el grupo del Dr. Oscar Ruiz y utilizada para promover el crecimiento de *Lotus corniculatus* en cultivos puros o consorciados con arroz. El análisis preliminar genómico muestra que la cepa RIZ17 posee los genes codificantes para el complejo óxido nitroso reductasa, y, por lo tanto, serían capaces de degradar el N<sub>2</sub>O. Este hallazgo constituye un hito científico, ya que, hasta el momento, la descripción clásica de la literatura de las cepas del género *Mesorhizobium* fueron descritas como bacterias que no contenían genes de desnitrificación (Monza et al. 2016). Estos resultados, a confirmar próximamente con una secuenciación genómica más profunda, sugieren que esta especie forrajera puede ser particularmente amigable con el medio ambiente.

## DISCUSIÓN

Los resultados de los análisis bioinformáticos nos permitieron comprender que no todos los inoculantes tienen el mismo potencial de impacto ambiental. Particularmente, encontramos un grupo de inoculantes, utilizados extensivamente para fijar nitrógeno en asociación con leguminosas, que poseen un genotipo compatible con alta emisión de óxido nitroso. En consecuencia, este grupo se consolida como el primer blanco de mejoramiento genético para nuestro equipo. Por otro lado, encontramos otro grupo de inoculantes con menor potencial de impacto ambiental y aplicables a una gran diversidad de cultivos. Aunque este grupo probablemente no represente una prioridad de mejoramiento ambiental, la presencia de genes de producción de N<sub>2</sub>O en sus genomas sugiere que los mismos pueden ser mejorados genéticamente para reducir su impacto ambiental. Dado que los inoculantes estudiados se aplican a una amplia diversidad de especies vegetales, incluyendo alfalfa, soja, arroz, maíz, trigo, tomate, *Digitaria eriantha*, *Desmodium incanum*, *Parapiptadenia rigida* y *Mimosa pudica*, el mejoramiento genético microbiano tendría un gran potencial en la lucha contra el cambio climático. Más allá del análisis de la genética de desnitrificación, la secuenciación de genomas de bacterias promotoras del crecimiento vegetal, como por ejemplo *Bradyrhizobium yuanmingense* P10 130 y *Cupriavidus* sp. UYPR2.512, constituye un avance en la comprensión de los mecanismos moleculares de interacción planta-microbio.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En conclusión, las bacterias utilizadas para fijar nitrógeno en alfalfa y soja son los inoculantes con mayor probabilidad de producción de N<sub>2</sub>O. Por lo tanto, se recomienda focalizar los esfuerzos en mejorar estos inoculantes para reducir la emisión antropogénica de N<sub>2</sub>O.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akiyama H, Hoshino YT, Itakura M, Shimomura Y, Wang Y, Yamamoto A, Tago K, Nakajima Y, Minamisawa K, Hayatsu M. Mitigation of soil N<sub>2</sub>O emission by inoculation with a mixed culture of indigenous *Bradyrhizobium diazoefficiens*. *Sci Rep*. 2016 Sep 16;6:32869. doi: 10.1038/srep32869.

Brambilla S, Frare R, Soto G, Jozefkowicz C, Ayub N. Absence of the Nitrous Oxide Reductase Gene Cluster in Commercial Alfalfa Inoculants Is Probably Due to the Extensive Loss of Genes During Rhizobial Domestication. *Microb Ecol*. 2018 Aug;76(2):299-302. doi: 10.1007/s00248-018-1145-9.

Monza J, Irisarri P, Díaz P, Delgado MJ, Mesa S, Bedmar EJ. Denitrification ability of rhizobial strains isolated from *Lotus* sp. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2006 Apr-May;89(3-4):479-84. doi: 10.1007/s10482-005-9046-6.



## INSTITUCIONES PARTICIPANTES



Secretaría Técnica Administrativa



Con el apoyo de:



[www.fontagro.org](http://www.fontagro.org)

Correo electrónico: [fontagro@fontagro.org](mailto:fontagro@fontagro.org)