



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

Producto 02: Mejoramiento genético del proceso de desnitrificación.

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 © 2024 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

www.fontagro.org



Tabla de Contenidos

Abstract	4
Resumen EJECUTIVO	5
Palabras Clave:	5
Introducción	6
Información de Relevancia con una discusión técnica.....	7
Objetivos	8
Resultados	8
Discusión.....	10
Conclusiones y recomendaciones.....	10
Referencias Bibliográficas	111
Instituciones participantes.....	12



ABSTRACT

La agricultura produce un 60% de la emisión de óxido nitroso (N₂O), 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 N₂O) 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 N₂O 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.

La agriculture produces 60% of nitrous oxide (N₂O) 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 N₂O 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 N₂O 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

Los inoculantes son bacterias capaces de promover el crecimiento vegetal pero también de emitir óxido nítrico un poderoso gas de efecto invernadero. En este proyecto mejoramos la genética de los inoculantes de alfalfa y soja mediante la mutación de genes de desnitrificación responsables de la producción de óxido nítrico. Este nuevo paquete tecnológico incluye tanto mutantes naturales como mutantes desarrolladas por edición de base utilizando el sistema CRISPR/Cas9. Hasta donde sabemos es la primera vez que se editan inoculantes comerciales para mejorar su genética, lo cual abre una nueva puerta para el mejoramiento continuo y rápido de los inoculantes modernos.

PALABRAS CLAVE: OXIDO NITROSO, NITRATO REDUCTASA, CRISPR/CAS9, INOCULANTES



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

Estudios previos de nuestro equipo demostraron que los inoculantes de alfalfa conservaron los genes relacionados con la producción de óxido nitroso (NAP, NIR y NOR) pero perdieron los genes responsables de la degradación de este gas de efecto invernadero (NOS) durante el proceso de domesticación (Brambilla et al. 2018) (Fig. 1).

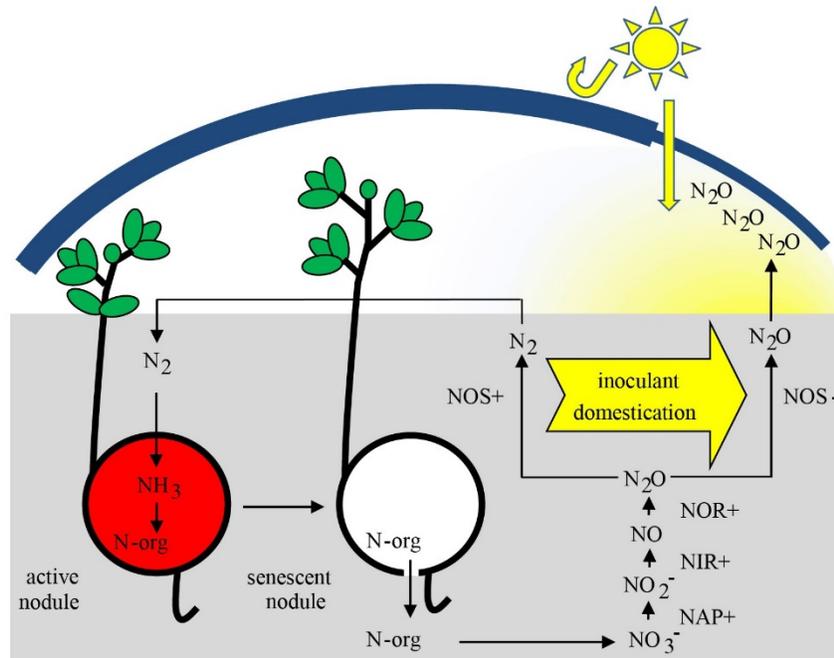


Figura 1. Ejemplo de caracterización de los genes de desnitrificación en un inoculante comercial (*Sinorhizobium meliloti* B399). En contraste con lo observado en la cepa modelo *Sinorhizobium meliloti* 1021, el inoculante comercial B399 conservó los genes de desnitrificación (NAP, NIR y NOR) pero perdió los genes de desnitrificación (NOS) debido a una delección genómica de 15-kb.

Durante este proyecto, la secuenciación y el análisis de genomas de inoculantes utilizados en cultivos de importancia regional mostró que este fenómeno es común a los distintos inoculantes de alfalfa (*Sinorhizobium*) y soja (*Bradyrhizobium*) utilizados en América Latina y el Caribe. Con esta información decidimos priorizar el desarrollo de mutantes derivadas de estos inoculantes para fortalecer la lucha contra el cambio climático global. Específicamente, comenzamos el mejoramiento de las cepas *Sinorhizobium meliloti* B399, *Bradyrhizobium japonicum* E109 y *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079. Utilizamos dos tecnologías diferentes para producir mutantes. La primera, propuesta originalmente en el proyecto, se trata de la selección de mutantes espontáneas de genes NAP. La segunda, no propuesta originalmente sino incorporada muy recientemente por nuestro equipo, se trata de la producción de mutantes dirigidas contra gen NAP vía edición génica utilizando vectores tradicionales y doble recombinación homóloga, y, por otro lado, el sistema CRISPR/Cas9 de edición de base.

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 “Mejoramiento genético del proceso de desnitrificación”, es producir mutantes del clúster NAP con alteración de la actividad nitrato reductasa, el paso limitante para la producción de N_2O en estos inoculantes. Específicamente, se buscaron mutantes del gen *napC* para *S. meliloti* B399, y del gen *napA* para *S. meliloti* B399, *B. japonicum* E109 y *B. japonicum* SEMIA 5079.

RESULTADOS

Se obtuvieron 8, 4 y 2 mutantes de los genes *napA* y *napC* derivadas de las cepas *S. meliloti* B399, *B. japonicum* SEMIA 5079 y *B. japonicum* E109 que mostraron deficiencia en actividad nitrato reductasa en ensayos de Griess cuando se las comparo con sus pares salvajes (Fig. 2).

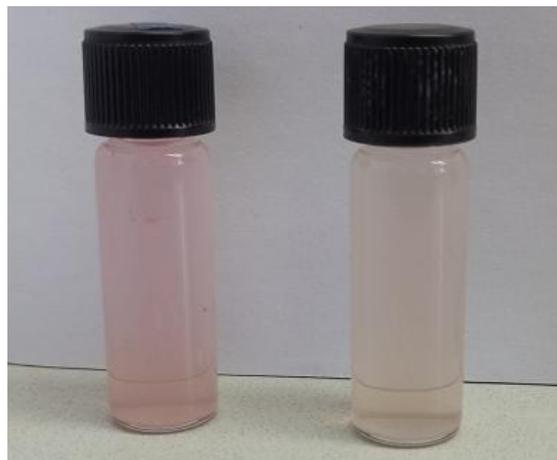


Figura 2. Ensayo de Griess representativo en donde la cepa salvaje E109 (izquierda) muestra actividad nitrato reductasa mientras que su mutante derivada (E18) no lo hace.

De estas mutantes, 12 fueron secuenciadas, confirmando la presencia de pequeños indels y sustituciones nucleotídicas simples en los genes *napA* y *napC* que explican los fenotipos de deficiencia de actividad nitrato reductasa (Fig.3).

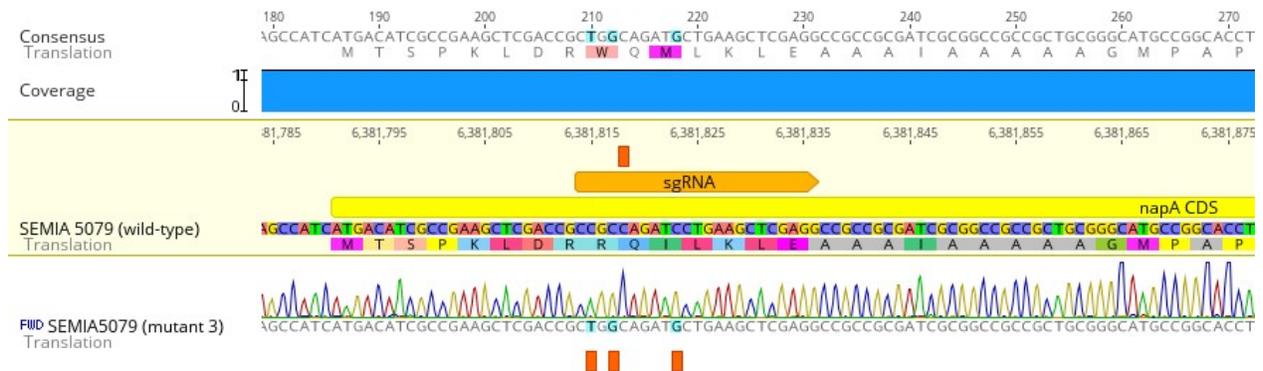


Figura 3. Ensayo de secuenciación del gen *napA* en la cepa mutante 3 derivada de la cepa salvaje SEMIA5079 en donde se observa que en la región de la guía (sgRNA) el sistema de CRISPR/Cas9 produjo tres sustituciones nucleotídicas que dieron origen a dos cambios aminoacídicos.

De esta forma, en la actualidad, se disponen de mutantes derivadas de las cepas *S. meliloti* B399, *B. japonicum* E109 y *B. japonicum* SEMIA 5079 con una potencial disminución drástica de las emisiones de N₂O.



DISCUSIÓN

Los tres sistemas de producción de mutantes utilizados fueron eficientes en la generación de mutantes NAP en inoculantes modernos. La selección de mutantes espontáneas y la producción de mutantes dirigidas por doble recombinación homóloga fueron sistemas de evolución más lentos que la edición génica vía CRISPR/Cas9, lo cual era lo esperado. Sin embargo, no se descarta el uso de mutantes espontáneas debido a que en algunos países los organismos producidos por edición génica siguen siendo considerados organismos genéticamente modificados aunque los mismos no contengan ningún material exógeno, como es el caso de nuestros inoculantes editados.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La primera conclusión es que es posible obtener mutantes para el complejo nitrato reductasa de los inoculantes con genotipo de alta emisión de N_2O . La segunda conclusión es que es posible editar genomas de bacterias elite o inoculantes, lo cual abre un mundo de posibilidades que incluyen pero también exceden la lucha contra el cambio climático. La recomendación es acelerar el proceso de mejoramiento genético de inoculantes utilizando CRISPR/Cas9.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.



INSTITUCIONES PARTICIPANTES



Secretaría Técnica Administrativa



Con el apoyo de:



www.fontagro.org

Correo electrónico: fontagro@fontagro.org