

Producto 03: Mayor producción agrícola con menor emisión de óxido nitroso (ATN-RF-18786-RG).
Emisión de N_2O en mutantes 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 | 7 |
| Resultados | 8 |
| Discusión..... | 9 |
| Conclusiones y recomendaciones..... | 9 |
| Referencias Bibliográficas | 10 |
| Instituciones participantes..... | 11 |



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.

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

En este producto del proyecto mejoramos la genética de inoculantes utilizados en cultivos extensivos en la región. En particular trabajamos en la genética de inoculantes de alfalfa y soja desarrollando mutantes del proceso de desnitrificación y otras mutantes asociadas a procesos de respiración aeróbica y anaeróbica encontrando que estas mutantes son capaces de reducir la emisión de óxido nitroso en el cultivo de alfalfa (99%) y de soja (21%). Teniendo en cuenta estos resultados se puede prever que estas mutantes desarrolladas en conjunto con las mutantes que se encuentran en desarrollo podrán reducir drásticamente la emisión de óxido nitroso en cultivos extensivos de la región.

PALABRAS CLAVE: OXIDO NITROSO, ALFALFA, SOJA, NITRATE REDUCTASE, MUTANTES



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

Los inoculantes utilizados para promover el crecimiento vegetal de la alfalfa y la soja son bacterias fijadoras de nitrógeno que conservaron su capacidad de producir óxido nitroso pero perdieron la habilidad de degradarlo (Brambilla et al. 2018). En consecuencia, estas bacterias representan un desafío en la inocuidad ambiental del sistema agropecuario. Para enfrentar este desafío nuestro equipo de trabajo desarrolló mutantes derivadas de estos inoculantes que tienen afectada su capacidad de reducir el nitrato a nitrito, el cual es el primer paso en el proceso de desnitrificación para la producción de óxido nitroso. Lo esperado es que estas mutantes tengan una drástica reducción de la producción de óxido nitroso. A pesar de esto, es necesario una demostración empírica que las mutaciones realizadas en el complejo nitrato reductasa tienen el efecto esperado. Para esto es necesario analizar el óxido nitroso emitido por las mutantes. Dado que se trata de un proceso secuencial en donde primero se identifican las bacterias que tienen este potencial de contaminación, luego se realizan las mutaciones y finalmente se analiza los fenotipos de emisión de óxido nitroso, actualmente no hemos caracterizado este patrón de emisión en todas las mutantes producidas en este proyecto. Sin embargo, tenemos las primeras caracterizaciones de cepas mutantes en NAP derivadas del inoculante *Sinorhizobium meliloti* B399 utilizado para promover el crecimiento de la alfalfa.

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 “Emisión de N_2O en mutantes de desnitrificación”, es evaluar el patrón de emisión de óxido nitroso en mutantes con alteración de la actividad nitrato reductasa.

RESULTADOS

Cuando se comparó la emisión de óxido nitroso de la cepa salvaje B399 en comparación con las cepas mutantes, aquí llamadas inta 1 a inta 6, en condiciones de microcosmos se observó que la mutación en genes NAP reduce dos órdenes la producción de este gas de efecto invernadero (Cuadro 1). Estos resultados validan la estrategia desarrollada, y, por otro lado, ofrecen nuevos prototipos de inoculantes climáticamente inteligentes.

| Strain | mg N ₂ O kg soil ⁻¹ |
|--------|--|
| INTA1 | 0.03 ± 0.02 |
| INTA2 | 0.06 ± 0.03 |
| INTA3 | 0.05 ± 0.01 |
| INTA4 | 0.06 ± 0.02 |
| INTA5 | 0.08 ± 0.01 |
| INTA6 | 0.04 ± 0.03 |
| 1021 | 0.93 ± 0.11 |
| B399 | 9.27 ± 1.86 |

Cuadro 1. Producción de N₂O en rizobios de alfalfa. Las mutantes INTA1-6 reducen drásticamente la emisión de N₂O en comparación con el inoculante B399 y la cepa modelo 1021 (panel superior).

Por otra parte, cuando se comparó la emisión de óxido nitroso de la cepa E109 utilizada para inocular soja con respecto a su mutante tolerante glifosato GR5 se observó que esta última presentaba una significativa reducción de la emisión de óxido nitroso (Figura 1).

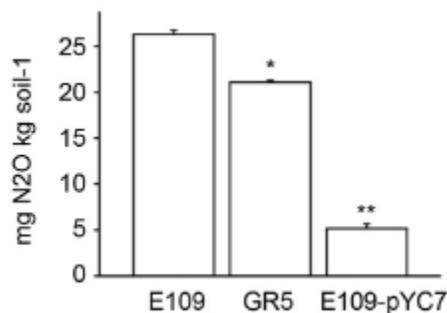


Figura 1. Producción de N₂O en rizobios de soja. El inoculante GR5 reduce la emisión de N₂O con respecto a su par salvaje E109. Como control adicional se complementó la cepa salvaje E109 con un cósmido (pYC7) conteniendo el *cluster* NOS de reducción de N₂O.



DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en cuanto a la mutación de genes de nitrato reductasa y su impacto en la emisión de óxido nitroso nos impulsa a seguir utilizando esta estrategia de ingeniería genética y a continuar evaluando el fenotipo de nuevas mutantes obtenidas recientemente mediante esta metodología. Por otra parte, el efecto indirecto de la tolerancia a glifosato sobre la emisión de óxido nitroso probablemente se deba a un incremento de la velocidad de crecimiento y condiciones aeróbicas y una reducción del crecimiento y condiciones anaeróbicas propias de la desnitrificación. En estudios anexos a este proyecto se observó que este fenotipo se debe a un incremento de la actividad citrato sintasa dado por la mutación en el gen *nifH* (S90A) que revierte el efecto bacteriostático producido por el glifosato.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La conclusión más importante de esta actividad es que la estrategia de interrumpir la función de la nitrato reductasa para controlar la emisión de óxido nitroso funciona en inoculantes. Otra conclusión no menor de este trabajo es que la alteración de la relación entre el crecimiento aeróbico y anaeróbico por mutaciones no relacionada directamente con el proceso de desnitrificación también pueden conducir a fenotipos de baja emisión de óxido nitroso. La recomendación es entonces continuar con la estrategia de mutagénesis de la nitrato reductasa sin descartar el potencial tecnológico y ambiental de otras mutaciones para la reducción de la emisión de óxido nitroso en la agricultura.



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