

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

- INFORME TECNICO FINAL -

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

FONTAGRO



Códigos JEL: Q16

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 © 2026 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 / Resumen **4**

Antecedentes **6**

Objetivos **8**

Metodología **9**

Resultados **12**

Indicadores Técnicos **67**

Hallazgos Destacados **69**

Historias en el campo **69**

Discusión **71**

Conclusiones **73**

Recomendaciones **74**

Referencias Bibliográficas **74**

Instituciones participantes **78**

Abstract

The project “Higher agricultural production with lower nitrous oxide emissions” (ATN-RF-18786-RG) addressed a central challenge for agriculture in Latin America and the Caribbean: increasing crop productivity while reducing the environmental impact associated with nitrous oxide (N_2O), one of the most relevant greenhouse gases linked to agricultural soils. The project focused on agricultural inoculants, a strategic bioinput technology for the region, with the goal of improving both their environmental performance and their agronomic efficiency. During the project, commercial and regional inoculants were genomically and functionally characterized to identify their potential contribution to N_2O production and degradation. This diagnostic analysis allowed the prioritization of soybean and alfalfa inoculants as key targets for environmental improvement, based on the presence of denitrification genes associated with N_2O production and the absence or limitation of genes involved in N_2O reduction. Building on this information, the project developed spontaneous and gene-edited mutants affecting key components of the denitrification pathway, particularly nitrate reductase activity. These improved strains showed drastic reductions in N_2O emissions, reaching reductions of approximately 99% in alfalfa-associated rhizobia and 90% in soybean-associated rhizobia. A central achievement of the project was demonstrating that environmental improvement did not necessarily compromise agronomic performance. Several low-emission strains maintained or improved their plant growth-promoting activity, including productivity, nodulation, nitrogen content, and soil nitrogen retention. In parallel, the project expanded the use of known inoculants to new crops and applications, incorporated new microbial candidates for forage legumes, cereals, soybean, tomato, and regional crops, and developed strains with improved tolerance to glyphosate and oxidative stress. These advances contributed to the generation of a new technological platform for climate-smart inoculants. The project also produced strong scientific, institutional, and technological outputs. Twenty peer-reviewed scientific publications were generated, prototypes were presented to academic, productive, and institutional stakeholders in Latin America and Europe, and communication activities included technical meetings, training sessions, webinars, social media dissemination, and regional capacity-building events. In addition, the project generated key technical evidence supporting the regulatory evaluation of gene-edited inoculants as non-GMO products in Argentina, creating a relevant precedent for future bioinput development in the region. Overall, the project strengthened regional capacities in microbial biotechnology, gene editing, sustainable agriculture, and technology transfer, positioning Latin America and the Caribbean as a leading region for the development of next-generation agricultural inoculants.

Keywords: agricultural inoculants; bioinputs; CRISPR/Cas9; gene editing; glyphosate; nitrous oxide; plant growth promotion; sustainability.

Resumen

El proyecto “Mayor producción agrícola con menor emisión de óxido nitroso” (ATN-RF-18786-RG) abordó un desafío central para la agricultura de América Latina y el Caribe: aumentar la productividad de los cultivos y, al mismo tiempo, reducir el impacto ambiental asociado a la emisión de óxido nitroso (N_2O), uno de los principales gases de efecto invernadero vinculados a los suelos agrícolas. El proyecto se focalizó en los inoculantes agrícolas, una tecnología estratégica de bioinsumos para la región, con el objetivo de mejorar tanto su desempeño ambiental como su eficacia agronómica. Durante la ejecución del proyecto se caracterizaron genómica y funcionalmente inoculantes comerciales y regionales para identificar su potencial contribución a la producción y degradación de N_2O. Este diagnóstico permitió priorizar los inoculantes de soja y alfalfa como blancos principales de mejoramiento ambiental, debido a la presencia de genes de desnitrificación asociados a la producción de N_2O y a la ausencia o limitación de genes vinculados con su reducción. A partir de esta información, se desarrollaron mutantes espontáneas y mutantes editadas genéticamente en componentes clave de la vía de desnitrificación, particularmente asociados a la actividad nitrato reductasa. Las cepas mejoradas mostraron reducciones drásticas en la emisión de N_2O, alcanzando disminuciones aproximadas del 99% en rizobios asociados a alfalfa y del 90% en rizobios asociados a soja. Un logro central del proyecto fue demostrar que la mejora ambiental no necesariamente compromete el desempeño agronómico. Varias cepas de baja emisión mantuvieron o mejoraron su actividad promotora del crecimiento vegetal, incluyendo productividad, nodulación, contenido de nitrógeno vegetal y retención de nitrógeno en suelo. En paralelo, el proyecto amplió el uso de inoculantes conocidos hacia nuevos cultivos y aplicaciones, incorporó nuevos candidatos microbianos para leguminosas forrajeras, cereales, soja, tomate y cultivos regionales, y desarrolló cepas con mayor tolerancia a glifosato y estrés oxidativo. Estos avances contribuyeron a consolidar una nueva plataforma tecnológica de inoculantes climáticamente inteligentes. El proyecto también generó resultados científicos, institucionales y tecnológicos de alto impacto. Se produjeron veinte publicaciones científicas con referato, se presentaron prototipos ante actores académicos, productivos e institucionales de América Latina y Europa, y se desarrollaron actividades de comunicación que incluyeron reuniones técnicas, capacitaciones, seminarios, webinars, redes sociales y eventos regionales de formación. Además, el proyecto generó evidencia técnica clave para respaldar la evaluación regulatoria de inoculantes editados como productos no transgénicos en Argentina, estableciendo un precedente relevante para el desarrollo futuro de bioinsumos en la región. En conjunto, el proyecto fortaleció capacidades regionales en biotecnología microbiana, edición génica, agricultura sustentable y transferencia tecnológica, posicionando a América Latina y el Caribe como una región líder en el desarrollo de inoculantes agrícolas de nueva generación.

Palabras clave: bioinsumos; CRISPR/Cas9; edición génica; glifosato; inoculantes agrícolas; óxido nitroso; promoción del crecimiento vegetal; sostenibilidad.

Antecedentes

La agricultura de América Latina y el Caribe enfrenta el desafío de sostener e incrementar la productividad de sus sistemas agropecuarios, reduciendo al mismo tiempo su impacto ambiental. En este contexto, la emisión de óxido nitroso (N_2O) constituye una preocupación prioritaria, ya que este gas de efecto invernadero se origina en gran medida a partir de procesos microbianos asociados al ciclo del nitrógeno en los suelos agrícolas. En particular, la desnitrificación incompleta llevada a cabo por bacterias del suelo puede conducir a la liberación de N_2O, especialmente cuando los microorganismos poseen los complejos enzimáticos necesarios para reducir nitrato, nitrito y óxido nítrico, pero carecen de una capacidad eficiente para reducir N_2O a nitrógeno molecular (N_2) (Akiyama et al., 2016; Brambilla et al., 2018).

Los inoculantes agrícolas constituyen una tecnología estratégica para la región, debido a su capacidad para promover el crecimiento vegetal, mejorar la nutrición de los cultivos y reducir la dependencia de fertilizantes nitrogenados sintéticos. Los rizobios utilizados en leguminosas, como los géneros Bradyrhizobium, Sinorhizobium y Mesorhizobium, cumplen funciones clave en la fijación biológica de nitrógeno, la fertilidad del suelo y la sustentabilidad de los sistemas productivos. Sin embargo, muchos inoculantes comerciales fueron seleccionados originalmente con criterios centrados casi exclusivamente en su eficacia agronómica, antes de que la mitigación del cambio climático y la inocuidad ambiental fueran incorporadas como objetivos centrales del desarrollo tecnológico.

La mayoría de los inoculantes actualmente utilizados fueron aislados y seleccionados entre las décadas de 1960 y 1990. En ese período, el objetivo principal era identificar cepas capaces de maximizar la productividad y la calidad nutricional de los cultivos. Como consecuencia, el impacto ambiental de estos microorganismos, en particular su potencial contribución a la emisión de N_2O, no fue considerado como un criterio prioritario. Estudios previos demostraron que algunos inoculantes de uso extendido conservan genes asociados a la producción de N_2O, como los correspondientes a los complejos nitrato reductasa, nitrito reductasa y óxido nítrico reductasa, pero pueden haber perdido genes vinculados con la degradación de este gas, como los genes del complejo óxido nitroso reductasa (Brambilla et al., 2018; Obando et al., 2022). Esta situación plantea la necesidad de revisar la inocuidad ambiental de los inoculantes modernos y de desarrollar estrategias de mejoramiento que permitan conservar su valor agronómico reduciendo, al mismo tiempo, su impacto climático.

En este marco, el proyecto partió de la hipótesis de que los inoculantes agrícolas pueden ser mejorados para integrar simultáneamente dos objetivos: aumentar la productividad de los cultivos y disminuir la emisión de N_2O. Para ello, resultaba necesario caracterizar primero la dotación genética de los inoculantes actuales, especialmente los genes vinculados con la desnitrificación, e identificar cepas prioritarias para el mejoramiento ambiental. A partir de esta información, la reducción o el bloqueo de pasos tempranos de la desnitrificación, en particular la actividad nitrato reductasa, aparecía como una estrategia racional para disminuir el flujo de nitrógeno hacia las etapas posteriores responsables de la generación de N_2O.

Al mismo tiempo, el proyecto se desarrolló en un contexto de estancamiento relativo en el mejoramiento de inoculantes. A diferencia de lo ocurrido en el mejoramiento genético de plantas y animales, el desarrollo de nuevas generaciones de inoculantes agrícolas avanzó más lentamente durante las últimas décadas. La búsqueda tradicional de microorganismos en el ambiente permitió generar productos valiosos, pero los nuevos aislamientos no siempre logran superar la eficacia de cepas comerciales ya adaptadas a procesos industriales, formulaciones y condiciones de uso ampliamente validadas. Por este motivo, el mejoramiento genético de cepas elite surgió como una alternativa estratégica para incorporar nuevos atributos sin perder las ventajas tecnológicas de los inoculantes actualmente utilizados.

Además del desafío ambiental asociado a la emisión de N_2O, los inoculantes deben enfrentar limitaciones agronómicas derivadas de factores bióticos y abióticos. En soja, uno de los factores más relevantes es la exposición indirecta de los rizobios al glifosato en sistemas productivos basados en cultivos tolerantes a este herbicida. El glifosato puede afectar negativamente el crecimiento, la nodulación y la eficacia de fijación biológica de nitrógeno de los rizobios (Fan et al., 2017; Liebrenz et al., 2022). En paralelo, la competencia con microorganismos nativos del suelo, el estrés oxidativo generado durante la interacción planta-microbio y la presencia de patógenos vegetales representan barreras adicionales para maximizar la eficacia de los inoculantes en condiciones productivas reales.

Otro antecedente relevante fue la necesidad de ampliar el repertorio de inoculantes disponibles para cultivos regionales, forrajeros, cereales y sistemas productivos menos atendidos por el mercado tradicional de bioinsumos. América Latina y el Caribe posee una gran diversidad de especies de interés agronómico, ambiental y forrajero que requieren soluciones microbiológicas específicas. La incorporación de nuevos rizobios y otros microorganismos promotores del crecimiento vegetal se presentaba, por lo tanto, como una oportunidad para diversificar la base tecnológica de los inoculantes, fortalecer la sostenibilidad de sistemas marginales o subatendidos y contribuir a una agricultura más resiliente.

Finalmente, el proyecto se inició en un escenario en el que las nuevas tecnologías de mejoramiento, incluyendo la edición génica, comenzaban a ofrecer oportunidades inéditas para acelerar la generación de inoculantes con funciones mejoradas. Sin embargo, la aplicación de estas herramientas en microorganismos de uso agrícola planteaba también desafíos científicos, técnicos y regulatorios. Por ello, el proyecto ATN-RF-18786-RG fue concebido como una plataforma regional orientada a integrar microbiología agrícola, genómica, fisiología bacteriana, edición génica, evaluación agronómica, comunicación científica y transferencia tecnológica, con el propósito de desarrollar inoculantes capaces de aumentar la productividad agrícola, reducir emisiones de N_2O y fortalecer la competitividad de América Latina y el Caribe en el desarrollo de bioinsumos de nueva generación.

Objetivos

Objetivo general. Desarrollar inoculantes agrícolas para cultivos de importancia estratégica en América Latina y el Caribe, capaces de contribuir al aumento de la productividad agropecuaria y, al mismo tiempo, reducir el impacto ambiental asociado a la emisión de óxido nitroso (N_2O), mediante el diagnóstico, mejoramiento genético, evaluación funcional, validación agronómica, comunicación y transferencia de tecnologías microbianas climáticamente inteligentes.

Objetivos específicos

1. Diagnosticar el potencial impacto ambiental de inoculantes comerciales y regionales actualmente utilizados en América Latina y el Caribe, mediante el análisis genómico de genes asociados a la producción y degradación de N_2O, con especial énfasis en los complejos de desnitrificación NAP, NIR, NOR y NOS.
2. Generar y caracterizar mutantes derivados de inoculantes comerciales de soja y alfalfa con alteraciones en genes vinculados a la desnitrificación, particularmente en componentes de la nitrato reductasa, utilizando estrategias de selección de mutantes espontáneas y herramientas de edición génica.
3. Evaluar el impacto de las mutaciones obtenidas sobre la emisión de N_2O, con el fin de identificar cepas con menor impacto ambiental y uso como inoculantes climáticamente inteligentes.
4. Determinar si las cepas mejoradas conservan o incrementan su actividad promotora del crecimiento vegetal, mediante el análisis de parámetros agronómicos como productividad, nodulación, contenido de nitrógeno vegetal y retención de nitrógeno en suelo.
5. Ampliar el uso de inoculantes y microorganismos beneficiosos hacia nuevos cultivos, sistemas productivos y aplicaciones biotecnológicas, incluyendo leguminosas forrajeras, cereales, soja, tomate y cultivos regionales de interés para América Latina y el Caribe.
6. Incorporar nuevos inoculantes mediante la búsqueda, aislamiento, caracterización y evaluación de cepas con capacidad de mejorar la productividad, la nutrición vegetal, la sanidad de los cultivos o la sostenibilidad de los sistemas agropecuarios.
7. Desarrollar cepas derivadas de inoculantes comerciales con mayor tolerancia a factores limitantes del sistema productivo, incluyendo glifosato, estrés oxidativo y competencia con microorganismos nativos del suelo, evaluando su impacto sobre la eficacia simbiótica y el desempeño agronómico.
8. Fortalecer la gestión del conocimiento, la comunicación científica, la formación de recursos humanos y la transferencia tecnológica mediante reuniones de coordinación, seminarios, publicaciones científicas, actividades de capacitación, difusión institucional y presentación de prototipos ante actores públicos y privados.
9. Generar información técnica, científica y regulatoria que contribuya a la validación, escalamiento y eventual adopción de los inoculantes desarrollados, incluyendo la consolidación de bases de datos dinámicas, evidencia experimental y antecedentes regulatorios.

Metodología

La metodología del proyecto se organizó en tres componentes complementarios: i) mejoramiento ecológico de los inoculantes, orientado a diagnosticar y reducir el potencial de emisión de óxido nitroso (N_2O); ii) mejoramiento económico de los inoculantes, orientado a ampliar su eficacia, uso y adaptación a limitantes productivas; y iii) gestión del conocimiento, comunicación y transferencia, orientado a integrar a los equipos participantes, difundir los resultados, generar evidencia científica y avanzar en la presentación de prototipos y antecedentes regulatorios.

Componente 1. Mejoramiento ecológico de los inoculantes

Para diagnosticar el potencial impacto ambiental de los inoculantes actuales se realizó una caracterización genómica de cepas comerciales y regionales utilizadas en cultivos de importancia para América Latina y el Caribe. El ADN genómico bacteriano fue purificado y secuenciado mediante tecnologías de secuenciación masiva. Las lecturas obtenidas fueron mapeadas contra genomas de referencia y regiones génicas asociadas a la desnitrificación, con especial atención a los complejos nitrato reductasa, nitrito reductasa, óxido nítrico reductasa y óxido nitroso reductasa. Este análisis permitió evaluar la presencia o ausencia de genes vinculados con la producción y degradación de N_2O, utilizando herramientas bioinformáticas de mapeo, ensamblado y anotación funcional. En los casos en que se incorporaron nuevas cepas de interés, como rizobios asociados a Lotus, se complementó el análisis con estudios de sintenia, clasificación funcional y evaluación de rutas metabólicas mediante bases de datos genómicas y funcionales. A partir del diagnóstico genómico se seleccionaron inoculantes de soja y alfalfa como blancos prioritarios de mejoramiento ambiental. Para reducir el potencial de emisión de N_2O se utilizaron estrategias complementarias de mejoramiento genético bacteriano. En primer lugar, se seleccionaron mutantes espontáneas con alteraciones en genes asociados a la nitrato reductasa, particularmente napA y napC, utilizando ensayos fenotípicos de actividad nitrato reductasa como criterio inicial de selección (Brambilla et al., 2020). En segundo lugar, se incorporaron estrategias de edición génica dirigidas mediante CRISPR/Cas9 para generar sustituciones puntuales en genes clave de la desnitrificación en inoculantes comerciales de soja (Serantes et al., 2024). Las mutantes obtenidas fueron caracterizadas mediante ensayos bioquímicos, secuenciación de regiones blanco y análisis funcional de la pérdida o reducción de la actividad nitrato reductasa. La emisión de N_2O de las cepas salvajes y mutantes se evaluó en condiciones controladas de microcosmos de suelo y mediante mediciones de gases por cromatografía gaseosa. Los microcosmos permitieron comparar la emisión de N_2O entre inoculantes comerciales y mutantes derivadas bajo condiciones estandarizadas. Esta estrategia se aplicó tanto a rizobios de alfalfa como de soja, incluyendo mutantes directas en genes de desnitrificación y mutantes con cambios en procesos metabólicos asociados a respiración aeróbica/anaeróbica. En paralelo, se evaluó la actividad promotora del crecimiento vegetal de las cepas con menor emisión de N_2O, utilizando

ensayos en plantas de alfalfa y soja cultivadas en condiciones controladas, principalmente en sustratos inertes e irrigadas con medio mínimo sin nitrógeno. Se midieron parámetros como productividad vegetal, nodulación, biomasa nodular, contenido de nitrógeno vegetal y contenido de nitrógeno en suelo, empleando métodos clásicos como Kjeldahl y análisis estadísticos apropiados para comparar tratamientos.

Componente 2. Mejoramiento económico de los inoculantes

Para ampliar el uso de inoculantes ya disponibles se evaluó el desempeño de microorganismos beneficiosos en nuevos cultivos, aplicaciones o sistemas productivos. Esta estrategia incluyó bacterias y hongos con antecedentes de actividad promotora del crecimiento vegetal, control biológico o degradación de residuos orgánicos. Se realizaron ensayos en condiciones controladas, invernáculo, microcosmos y campo, según el microorganismo y el cultivo evaluado. Entre las variables analizadas se incluyeron productividad vegetal, área foliar, peso seco y fresco, contenido de nitrógeno, actividad celulolítica, control de enfermedades fúngicas, severidad de enfermedad, actividad respiratoria microbiana y producción de CO_2 como indicador de degradación de residuos. Cuando correspondió, se utilizaron tinciones específicas, escalas de severidad, ensayos de antagonismo, análisis de fijación biológica de nitrógeno mediante abundancia natural de 15N y modelos estadísticos para comparar tratamientos. La incorporación de nuevos inoculantes se abordó mediante la búsqueda, aislamiento, caracterización y evaluación de microorganismos asociados a cultivos regionales, forrajeros, cereales y leguminosas de interés para América Latina y el Caribe. Se realizaron aislamientos a partir de nódulos, raíces, suelos u otros ambientes relevantes, seguidos por análisis fenotípicos, genéticos, filogenéticos y funcionales. Las cepas candidatas fueron evaluadas por su capacidad para promover el crecimiento vegetal, mejorar el contenido de nitrógeno, favorecer la nodulación, solubilizar nutrientes o inhibir patógenos. Los ensayos incluyeron pruebas en medio de cultivo, cámara de crecimiento, invernadero y campo, con diseños experimentales aleatorizados y análisis estadísticos para identificar cepas superiores. Esta aproximación permitió integrar microorganismos nativos, rizobios simbióticos, bacterias no fijadoras con funciones complementarias y microorganismos con capacidad de control biológico. Para generar inoculantes con mayor adaptación a limitantes productivas se seleccionaron y caracterizaron mutantes espontáneas derivadas de inoculantes comerciales de soja con tolerancia a glifosato, estrés oxidativo y otros factores asociados a la competitividad simbiótica. La tolerancia a glifosato se evaluó mediante ensayos de crecimiento en presencia del herbicida, análisis de fase lag, nodulación en plantas tolerantes a glifosato y evaluación del contenido de nitrógeno en condiciones controladas y de campo (Liebrenz et al., 2022). La tolerancia al estrés oxidativo se evaluó mediante ensayos de inhibición con peróxido de hidrógeno, expresión de genes antioxidantes, actividad catalasa, supervivencia bacteriana y competencia por colonización radicular o nodulación. Las mutaciones responsables de los fenotipos seleccionados fueron identificadas mediante secuenciación genómica y análisis comparativo con las cepas parentales.

La actividad PGPR de las mutantes obtenidas se evaluó mediante ensayos de inoculación en soja en ausencia y presencia de factores de estrés, principalmente glifosato. Se analizaron variables de productividad, biomasa nodular, nodulación, contenido de nitrógeno y desempeño relativo respecto de la cepa comercial parental. En los casos de mutantes asociadas a detoxificación de compuestos derivados del estrés por glifosato, se incorporaron análisis metabólicos y funcionales para evaluar la acumulación de compuestos tóxicos, la tolerancia bacteriana y la reducción de residuos en suelo (Brambilla et al., 2025). Esta estrategia permitió distinguir mutaciones neutras, mutaciones con ventajas solo bajo estrés y mutaciones con efectos positivos sobre la eficacia simbiótica aun en ausencia del factor limitante.

Componente 3. Gestión del conocimiento, comunicación y transferencia

La gestión del conocimiento se desarrolló mediante reuniones periódicas de coordinación, seminarios técnicos, intercambio de materiales y discusión de resultados entre los organismos ejecutores, co-ejecutores y asociados. Dado que el proyecto se inició en el contexto de la pandemia por COVID-19, se priorizaron instancias virtuales de interacción, complementadas posteriormente con encuentros presenciales, capacitaciones y actividades regionales. Estas acciones permitieron sostener la planificación experimental, compartir capacidades técnicas, formar recursos humanos y asegurar el crecimiento integrado de la plataforma regional. La comunicación de resultados se realizó a través de publicaciones científicas, webinars, redes sociales, jornadas de capacitación y actividades dirigidas a públicos académicos, institucionales, productivos y sociales. Los resultados técnicos del proyecto fueron sistematizados y enviados a revistas científicas con referato, priorizando la publicación de avances vinculados con microbiología agrícola, inoculantes, edición génica, tolerancia a estrés, control biológico, fijación biológica de nitrógeno y sustentabilidad. En paralelo, se generaron materiales de difusión y presentaciones institucionales para comunicar los principales avances a actores estratégicos de la región. La transferencia tecnológica se abordó mediante la presentación de prototipos en reuniones científicas, eventos tecnológicos, congresos internacionales, encuentros con empresas del sector agrícola y reuniones con potenciales adoptantes. Estas actividades permitieron comunicar los beneficios económicos y ambientales de los inoculantes desarrollados, discutir su potencial escalamiento, evaluar oportunidades de vinculación tecnológica y avanzar en conversaciones orientadas a la validación pre-comercial. Finalmente, la gestión de información técnica y regulatoria se organizó a partir de bases de datos, revisiones científicas, caracterización genómica y fisiológica de inoculantes, y documentación específica para la evaluación de productos obtenidos mediante edición génica. Esta información permitió integrar evidencia científica, experimental y regulatoria, y acompañar el desarrollo de antecedentes para la clasificación de inoculantes editados como productos no regulados cuando no contienen nuevas combinaciones de material genético.

Resultados

Los resultados alcanzados durante la ejecución del proyecto se organizan de acuerdo con los productos comprometidos en el convenio, manteniendo el orden de los tres componentes principales: mejoramiento ecológico de los inoculantes, mejoramiento económico de los inoculantes, y gestión del conocimiento, comunicación y transferencia. En conjunto, estos resultados integran el diagnóstico genómico y ambiental de inoculantes comerciales y regionales, el desarrollo de cepas mejoradas con menor emisión de óxido nitroso, la evaluación de su desempeño agronómico, la ampliación del uso de microorganismos beneficiosos en nuevos cultivos y sistemas productivos, la incorporación de nuevos inoculantes, el desarrollo de cepas con mayor tolerancia a limitantes productivas, y la generación de evidencia científica, tecnológica, comunicacional y regulatoria para facilitar su transferencia. La presentación se realiza siguiendo estrictamente el orden de los Productos 1 al 12, de modo de vincular cada resultado con las actividades, figuras y evidencias generadas durante el proyecto.

Producto 1. Diagnóstico de inocuidad de los inoculantes actuales

El primer resultado del proyecto fue la caracterización genómica de inoculantes comerciales y regionales utilizados en cultivos de importancia para América Latina y el Caribe, con el objetivo de evaluar su potencial contribución a la producción y degradación de óxido nitroso (N_2O). El análisis bioinformático de los genes asociados a los complejos de desnitrificación permitió distinguir dos grandes grupos de inoculantes según su potencial impacto ambiental. El primer grupo incluyó cepas de alto interés productivo, como Bradyrhizobium japonicum SEMIA 5079, Bradyrhizobium japonicum E109, Sinorhizobium meliloti B399 y Sinorhizobium meliloti B401. Estas cepas poseen genes asociados a la producción de N_2O, correspondientes a los complejos NAP, NIR y NOR, pero carecen de genes funcionales asociados a la degradación de este gas mediante el complejo NOS. Este perfil genómico permitió identificarlas como blancos prioritarios para el mejoramiento ambiental de inoculantes. El segundo grupo incluyó cepas que poseen solo parte de los genes de producción de N_2O o, en algunos casos, una dotación más equilibrada de genes de producción y degradación. Entre ellas se encontraron 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. Este segundo grupo presentó un potencial de impacto ambiental más variable y, en general, menor al de los inoculantes de soja y alfalfa priorizados. En forma complementaria, se avanzó en la secuenciación y caracterización de nuevas cepas con alta eficacia simbiótica. En particular, el análisis del genoma de *Mesorhizobium* sp. RIZ17 mostró la presencia de genes codificantes para el complejo óxido nitroso reductasa, lo que sugiere capacidad potencial para degradar N_2O. Este hallazgo resultó relevante porque amplía el

conocimiento previo sobre el género *Mesorhizobium* y sugiere que algunos rizobios asociados a Lotus podrían contribuir a sistemas productivos ambientalmente más favorables (**Fig.** 1).



Fig. 1. El análisis bio-informático del genoma de la cepa *Mesorhizobium* sp. RIZ17 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP147861.1/) demostró que la misma contienen un cluster completo de degradación del N_2O. En amarillo se muestra las regiones codificantes de cada gen y en celeste los *loci* con sus números de acceso.

El análisis comparativo de la isla simbiótica de RIZ17 mostró una alta conservación de genes vinculados con nodulación, fijación biológica de nitrógeno, biosíntesis de cofactores, sistemas de secreción y transferencia horizontal, en comparación con cepas de referencia del género *Mesorhizobium*. Aunque se observaron diferencias en la organización relativa de algunos operones, no se detectó pérdida de genes clave para la simbiosis, lo que sugiere conservación funcional de la isla simbiótica (**Fig.** 2).

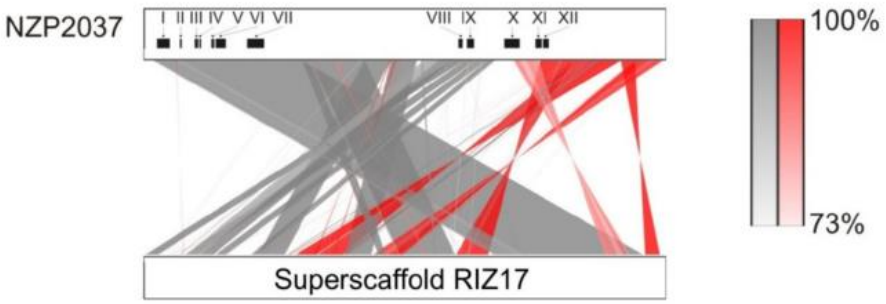


Fig. 2. Análisis comparativo de las islas simbióticas de la cepa RIZ17 con respecto a la isla simbiótica de la cepa NZP2037. Representación comparativa de la isla simbiótica de NZP2037 y de las secuencias scaffold de la cepa RIZ17. Los números romanos indican la posición relativa y el tamaño de los 12 operones descriptos en la isla simbiótica de NZP2037. Las bandas entre la isla de NZP2037 y los scaffolds de las cepas representan el tamaño, en megabases, de las diferentes regiones de la isla de NZP2037 presentes en los scaffolds de las cepas. Los colores de las bandas indican si el marco de lectura de NZP2037 se mantiene igual (tonos de gris intermedio a gris oscuro) o se encuentra invertido (tonos de rojo a rojo claro) en los scaffolds de las cepas. Las escalas ubicadas en el margen derecho representan el porcentaje de similitud de secuencia con el mismo marco de lectura (escala izquierda) o con el marco de lectura invertido (escala derecha).

Finalmente, la clasificación funcional del genoma de RIZ17 mediante categorías KEGG mostró una fuerte representación de genes asociados al metabolismo, especialmente rutas vinculadas con carbohidratos, aminoácidos, cofactores, vitaminas y metabolismo energético (**Fig.** 3).

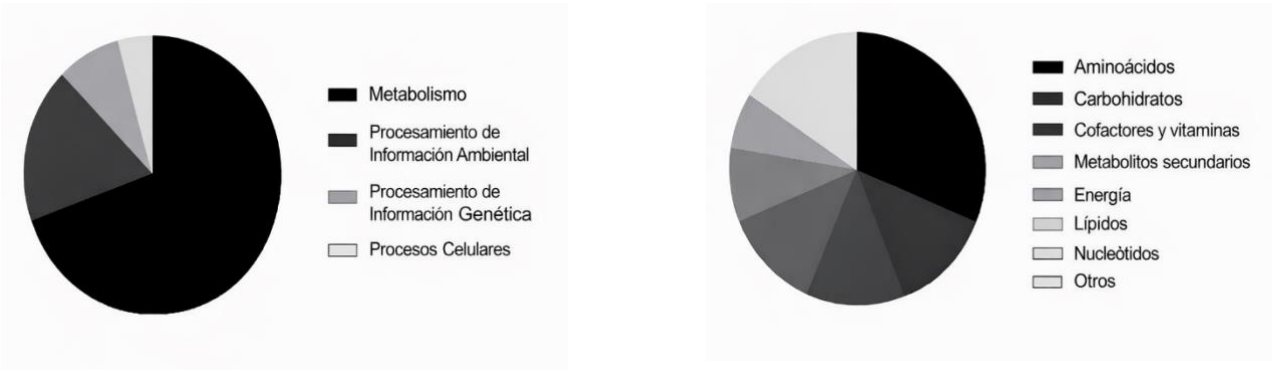


Fig. 3. Distribución de las secuencias génicas entre las diferentes vías y subrutas KEGG dentro de la vía KEGG Metabolismo. El panel izquierdo representa la distribución de las secuencias génicas entre las distintas vías KEGG en RIZ17. El panel derecho representa la distribución de las secuencias génicas entre las diferentes subrutas dentro de la vía KEGG Metabolismo en RIZ17.

El análisis detallado de rutas metabólicas confirmó la presencia de genes vinculados a la reducción de N_2O y a rutas centrales de generación de energía y utilización de carbono, lo que sugiere una elevada capacidad metabólica intrínseca de la cepa (**Fig.** 4).

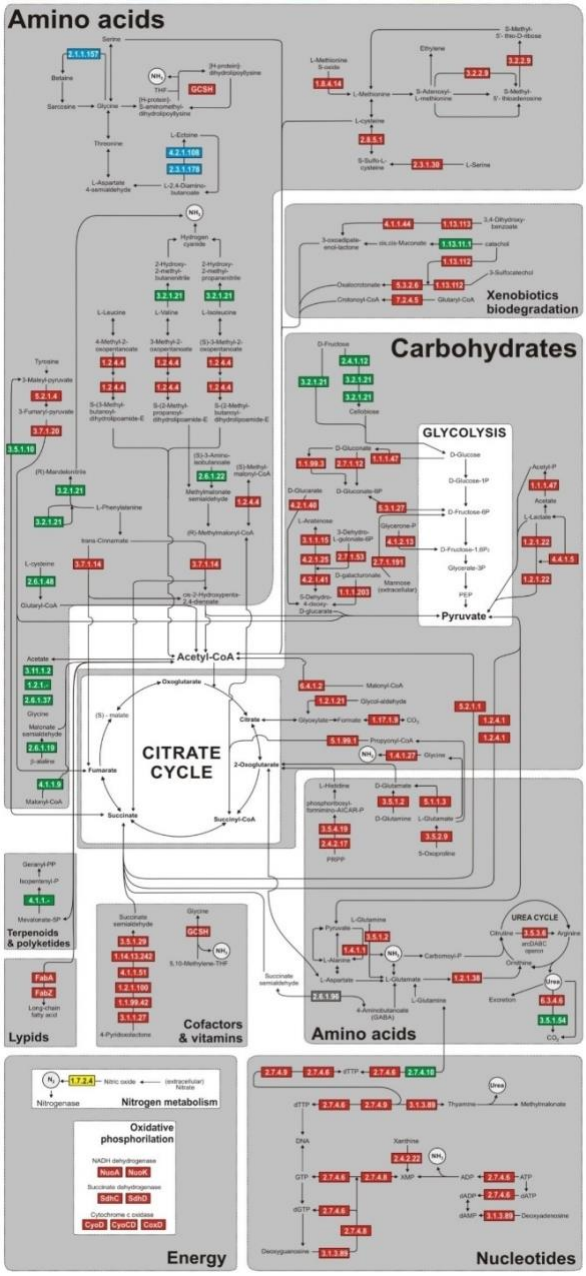


Fig. 4. Distribución esquemática de las secuencias génicas en las subrutas de la vía KEGG Metabolismo. Las secuencias génicas se distribuyeron gráficamente en diferentes rutas metabólicas dentro de las subrutas carbohidratos, energía, aminoácidos, cofactores y vitaminas, nucleótidos, lípidos y biodegradación de xenobióticos. Las secuencias génicas se representaron mediante los números EC correspondientes a cada proteína codificada.

En conjunto, estos resultados permitieron establecer una base racional para priorizar cepas y estrategias de mejoramiento ambiental dentro del proyecto.

Producto 2. Mejoramiento genético del proceso de desnitrificación

A partir del diagnóstico inicial, se avanzó en el mejoramiento genético de inoculantes comerciales de alfalfa y soja mediante la alteración de genes asociados a la actividad nitrato reductasa, considerada un paso limitante en el flujo de nitrógeno hacia la producción de N_2O. En una primera etapa se seleccionaron mutantes espontáneas en genes del complejo NAP, específicamente napA y napC, derivadas de *Sinorhizobium meliloti* B399, *Bradyrhizobium japonicum* E109 y *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079. Como resultado de esta estrategia, se obtuvieron 8, 4 y 2 mutantes derivadas de *S. meliloti* B399, *B. japonicum* SEMIA 5079 y *B. japonicum* E109, respectivamente, con deficiencia en actividad nitrato reductasa. El fenotipo fue detectado mediante ensayos de Griess, en los cuales las cepas mutantes mostraron ausencia o reducción marcada de la coloración asociada a la acumulación de nitrito, en contraste con las cepas salvajes (**Fig.** 5).



Figura 5. Ensayo de Griess representativo en donde la cepa salvaje B399 (izquierda) muestra actividad nitrato reductasa mientras que su mutante (napC) derivada espontanea (derecha) no lo hace.

La secuenciación de 12 mutantes confirmó la presencia de pequeños indels y sustituciones nucleotídicas simples en napA o napC, compatibles con la pérdida o reducción de función del complejo nitrato reductasa. En una segunda etapa, se incorporó la edición génica dirigida mediante CRISPR/Cas9 en inoculantes comerciales de soja. Esta estrategia permitió editar el gen napA en *Bradyrhizobium japonicum* E109 y *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079, generando sustituciones nucleotídicas específicas en regiones funcionales de la proteína NapA. Los clones editados fueron seleccionados inicialmente por fenotipo y luego caracterizados mediante ensayos bioquímicos y secuenciación. Un porcentaje significativo de los clones editados derivados de E109 y SEMIA 5079, correspondiente al 36%, presentó una marcada reducción de la actividad nitrato reductasa en comparación con las cepas salvajes, nuevamente evidenciada por la ausencia de coloración en el ensayo de Griess (**Fig.** 6).



Figura 6. Ensayo de Griess representativo en donde la cepa salvaje E109 (izquierda) muestra actividad nitrato reductasa mientras que su mutante (napA) derivada editada (derecha) no lo hace.

La secuenciación Sanger confirmó la presencia de sustituciones nucleotídicas no sinónimas en el gen napA, responsables de cambios aminoacídicos compatibles con la pérdida parcial o total de actividad enzimática (**Fig.** 7).

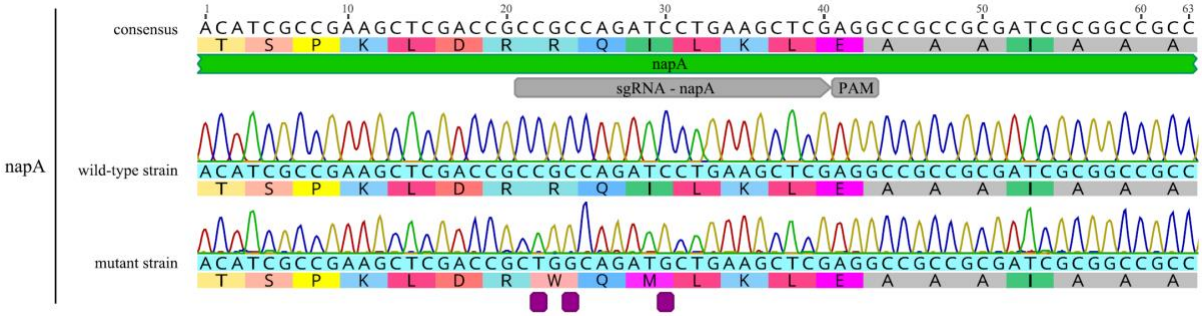


Figura 7. Visualización del análisis de secuenciación *Sanger* del gen *napA* en cepas salvaje y mutante. Se muestran los cromatogramas correspondientes a la secuencia consenso (secuencia idéntica en las cepas E109 y SEMIA 5079), a la cepa salvaje (wild-type strain) y a la cepa mutante editada (mutant strain). Las sustituciones nucleotídicas introducidas mediante el sistema CRISPR/Cas9 se indican con cuadrados violetas y corresponden a cambios no sinónimos que generan sustituciones aminoacídicas en la proteína NapA. La región objetivo de la sgRNA y la secuencia PAM se indican sobre la secuencia consenso. Los colores de los picos reflejan la calidad de lectura de cada base, donde los tonos más intensos indican mayor calidad.

Estos resultados demostraron que la edición génica dirigida permite generar, de manera eficiente y reproducible, inoculantes derivados de cepas comerciales con actividad nitrato reductasa reducida.

Producto 3. Emisión de N_2O en mutantes de desnitrificación

El tercer resultado del proyecto consistió en validar funcionalmente si las mutaciones obtenidas en genes asociados a desnitrificación se traducían efectivamente en una reducción de la emisión de N_2O. Para ello se comparó la emisión de las cepas salvajes con la de mutantes derivadas, utilizando ensayos de microcosmos y mediciones de gases. En alfalfa, se evaluaron mutantes derivadas de *Sinorhizobium meliloti* B399 afectadas en genes del complejo NAP. La comparación entre la cepa salvaje B399 y las mutantes INTA1-6 mostró una disminución significativa de la producción de N_2O. En condiciones de microcosmos, las mutaciones asociadas al complejo NAP redujeron la producción de este gas en aproximadamente dos órdenes de magnitud (**Fig.** 8).

Strain	mg N_2O 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

Figura 8. Producción de N_2O en rizobios de alfalfa. Las mutantes INTA1-6 reducen drásticamente la emisión de N_2O en comparación con el inoculante B399 y la cepa modelo 1021. Para evaluar el efecto de los tratamientos bacterianos sobre las emisiones de N2O del suelo, se prepararon microcosmos colocando aproximadamente 200 g de suelo agronómico con 2 µM de nitrato en botellas esterilizadas de 500 ml, a las que se les agregaron 150 µl de cultivos bacterianos crecidos durante la noche en medio LB y lavados dos veces en solución fisiológica. Los microcosmos se incubaron a 25 °C durante 24 h, y los flujos de N_2O se midieron mediante cromatografía gaseosa.

Este resultado validó la hipótesis de que la interrupción del primer paso de la desnitrificación permite reducir de manera drástica la emisión de N_2O en rizobios de alfalfa. En soja, se analizó inicialmente la emisión de N_2O de la cepa comercial E109 en comparación con la mutante GR5, que contiene la mutación NifH-S90A y presenta tolerancia a glifosato. Esta mutación, asociada a cambios en el metabolismo respiratorio y redox, redujo aproximadamente un 20% la emisión de N_2O respecto de la cepa E109. Como control experimental adicional se utilizó una cepa E109 complementada con un cósmido portador del cluster NOS, aunque esta cepa recombinante solo fue considerada como control de investigación por contener ADN exógeno (**Fig.** 9).

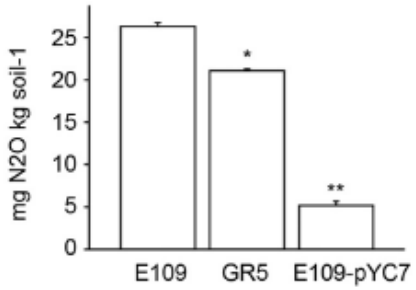


Figura 9. Producción de N_2O en rizobios de soja. El inoculante GR5 reduce la emisión de N_2O con respecto a su par salvaje E109. Como control adicional se complementó la cepa salvaje E109 con un cósmido (pYC7) conteniendo el *cluster* NOS de reducción de N_2O.

Finalmente, la evaluación de una mutante editada en el gen napA derivada de E109 mostró una reducción mucho más marcada de la emisión de N_2O. En este caso, la edición dirigida de napA condujo a una disminución cercana al 90% respecto de la cepa salvaje (**Fig.** 10).

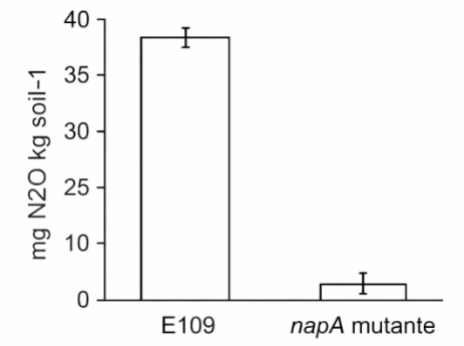


Figura 10 Producción de N_2O en rizobios de soja. El inoculante editado derivado de la cepa E109 reduce la emisión de N_2O con respecto a su par salvaje.

En conjunto, estos resultados demostraron que tanto las mutaciones espontáneas como las mutaciones dirigidas pueden reducir la emisión de N_2O, aunque la intervención directa sobre la nitrato reductasa representa la estrategia más eficiente dentro de las evaluadas.

Producto 4. Actividad PGPR en mutantes de desnitrificación

Luego de validar la reducción de N_2O, se evaluó si las cepas mejoradas conservaban su capacidad promotora del crecimiento vegetal. Este punto fue central para determinar si el mejoramiento ambiental podía ser compatible con el mantenimiento o la mejora del desempeño agronómico. En alfalfa, las cepas INTA1-6 derivadas del inoculante comercial B399 fueron evaluadas en condiciones hidropónicas sin nitrógeno, utilizando como variables la productividad vegetal y la nodulación. Los resultados mostraron que las mutantes INTA4-6 mantuvieron una eficacia de promoción del crecimiento vegetal equivalente a la del inoculante comercial B399. En cambio, las mutantes INTA1-3 mostraron penalidades fenotípicas, probablemente asociadas a efectos pleiotrópicos de algunas mutaciones. Estos resultados permitieron seleccionar variantes con baja emisión de N_2O y sin pérdida detectable de actividad PGPR (**Fig.** 11).

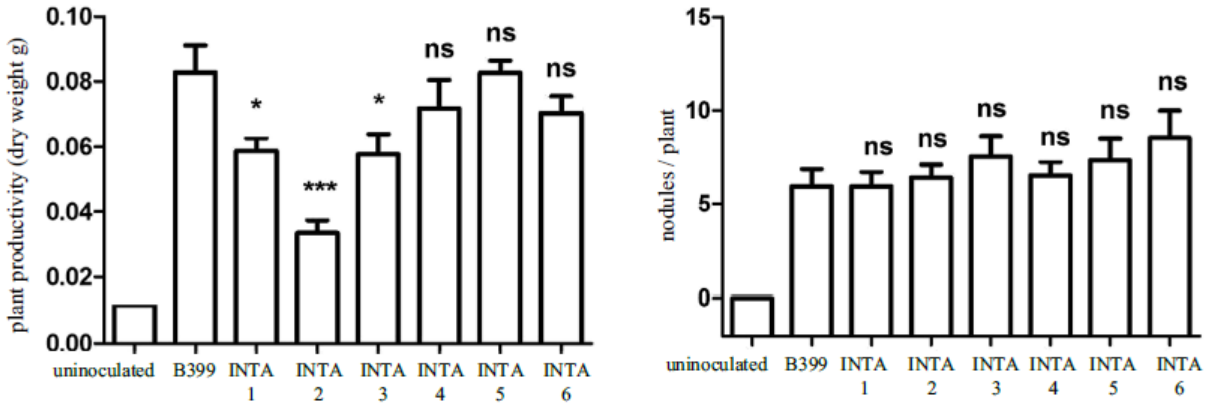


Fig. 11. Efecto de la inoculación con las cepas INTA1-6 en el crecimiento de la alfalfa. Se analizó la productividad (panel izquierdo) y el número de nódulos (panel derecho) de las plantas de alfalfa inoculadas con el inoculante comercial B399 y las cepas INTA1-6 en ausencia de nitrógeno en el sustrato. Todos los valores son medias + SEM (n = 5), donde n = 1 es el promedio de los valores obtenidos para tres plantas individuales que crecieron en la misma maceta. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA seguido de la prueba de contraste de Tukey (ns no significativo, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001). Las comparaciones estadísticas se realizaron entre las plantas tratadas con B399 y las tratadas con INTA1-6. El tratamiento sin inoculación se utilizó como control de la ausencia de rizobios naturales en el sustrato.

En soja, la cepa GR5, derivada del inoculante comercial E109, mostró un impacto positivo sobre la productividad y la calidad del cultivo, incluyendo mejoras en parámetros de biomasa, nodulación y contenido de nitrógeno foliar. Este resultado fue particularmente relevante porque indica que determinadas mutaciones asociadas a una menor emisión de N_2O pueden, además, mejorar el desempeño simbiótico del inoculante (**Fig.** 12).

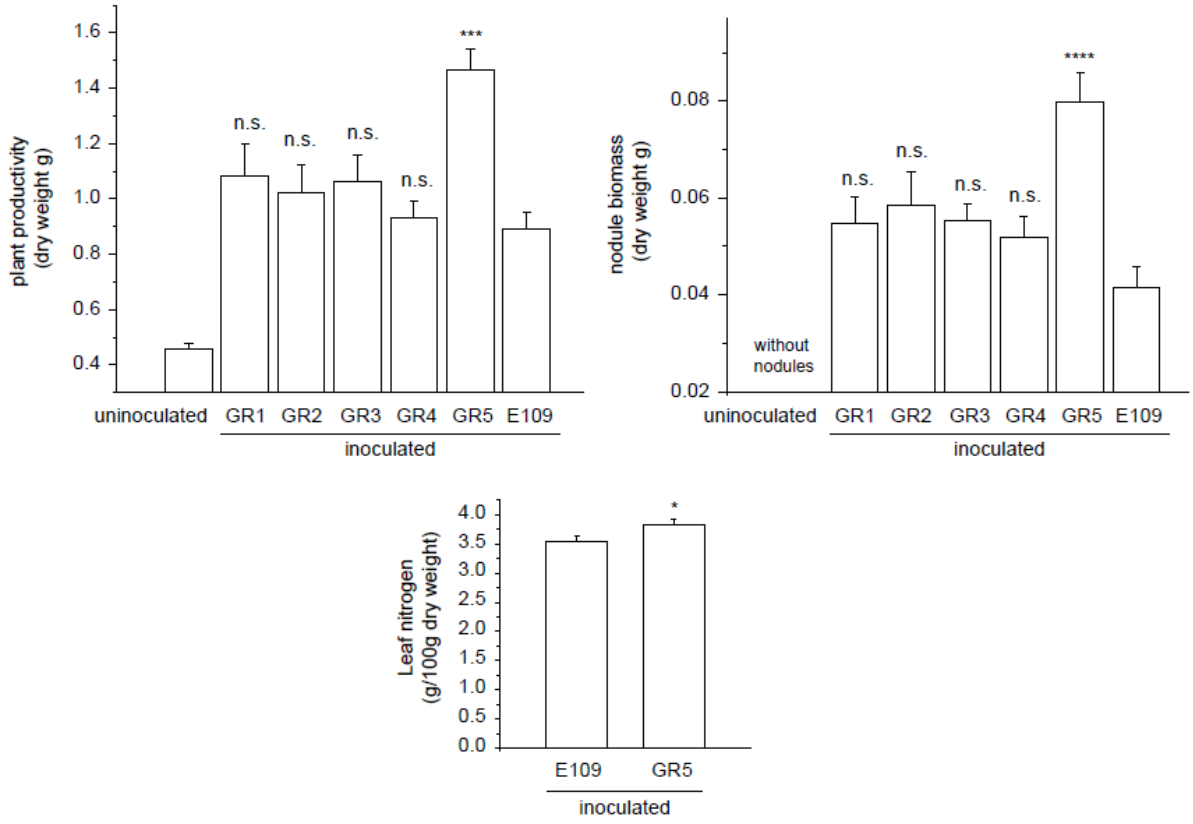


Fig. 12. Efectos de la mutación NifHS90A en la eficacia promotora del crecimiento vegetal del inoculante. Se analizaron la productividad (arriba a la izquierda) y la biomasa de los nódulos (arriba a la derecha) de plantas de soja, inoculadas con la cepa silvestre E109 y las cepas mutantes GR1-GR5, en ausencia de nitrógeno en el sustrato. La cepa GR5 contiene la mutación S90A. Todos los valores son medias + SEM (n = 24). Las diferencias significativas entre los inoculantes se analizaron mediante ANOVA seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett (n.s.: no significativo, ****p < 0,0001). Contenido de nitrógeno en hojas de plantas de soja de 3 meses de edad tratadas con diferentes inoculantes bacterianos en condiciones de campo (abajo en el centro). Los valores representan la media + SEM (n = 9). *p < 0,05; prueba t.

Como estrategia alternativa de mejoramiento, se evaluaron mutaciones dirigidas en el regulador RkpI del inoculante comercial de alfalfa *Sinorhizobium meliloti* B399. El análisis genómico identificó un residuo conservado, K512, en la región C-terminal de RkpI, asociado a la regulación de la biosíntesis de polisacáridos capsulares (**Fig.** 13).

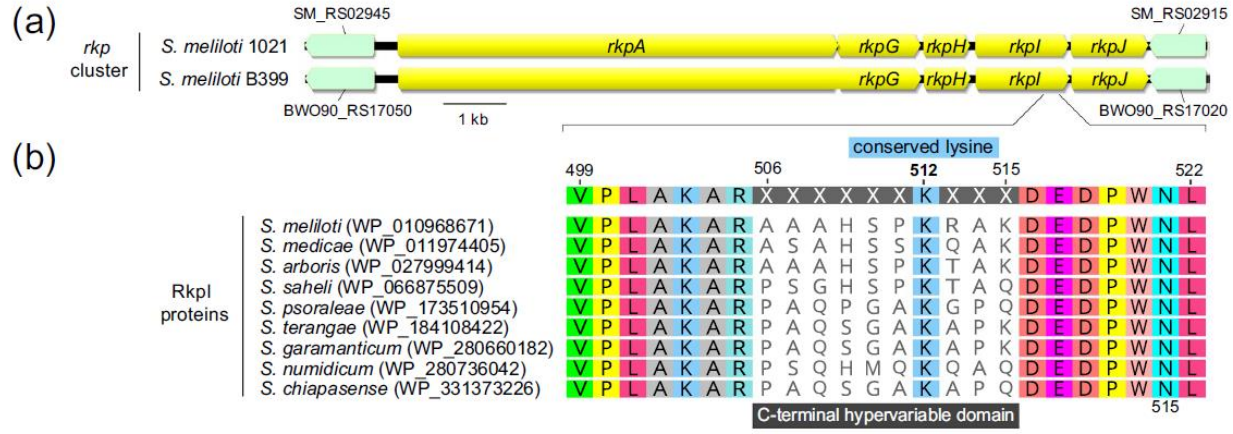


Fig. 13. Identificación del clúster de biosíntesis de cápsula *rkpAGHIJ* y de un residuo conservado en el regulador RkpI en el inoculante comercial de alfalfa *Sinorhizobium meliloti* B399. (a) Organización genómica del clúster *rkpAGHIJ* en *S. meliloti* B399, mostrando la sintenia con la cepa de referencia *S. meliloti* 1021. (b) Alineamiento de proteínas RkpI ortólogas de distintas especies de *Sinorhizobium*, que revela una región C-terminal hipervariable (recuadro negro) que contiene una lisina conservada en la posición 512 (recuadro celeste), identificada como un probable residuo clave para la regulación de la biosíntesis de polisacáridos capsulares.

Las variantes generadas permitieron establecer una relación entre la modulación de la cápsula bacteriana, la desnitrificación y la eficacia simbiótica. Los ensayos funcionales mostraron que todas las variantes de RkpI con alteraciones en la región C-terminal presentaron inhibición de la actividad desnitrificante. Sin embargo, las consecuencias agronómicas dependieron del grado de reducción de cápsula. Mientras que la pérdida total de KPS afectó negativamente la productividad de la alfalfa, las reducciones parciales, especialmente la mutación K512R, mantuvieron niveles productivos equivalentes a B399. Además, la inoculación con la variante K512R incrementó significativamente el contenido total de nitrógeno del suelo respecto del inoculante comercial (**Fig.** 14).

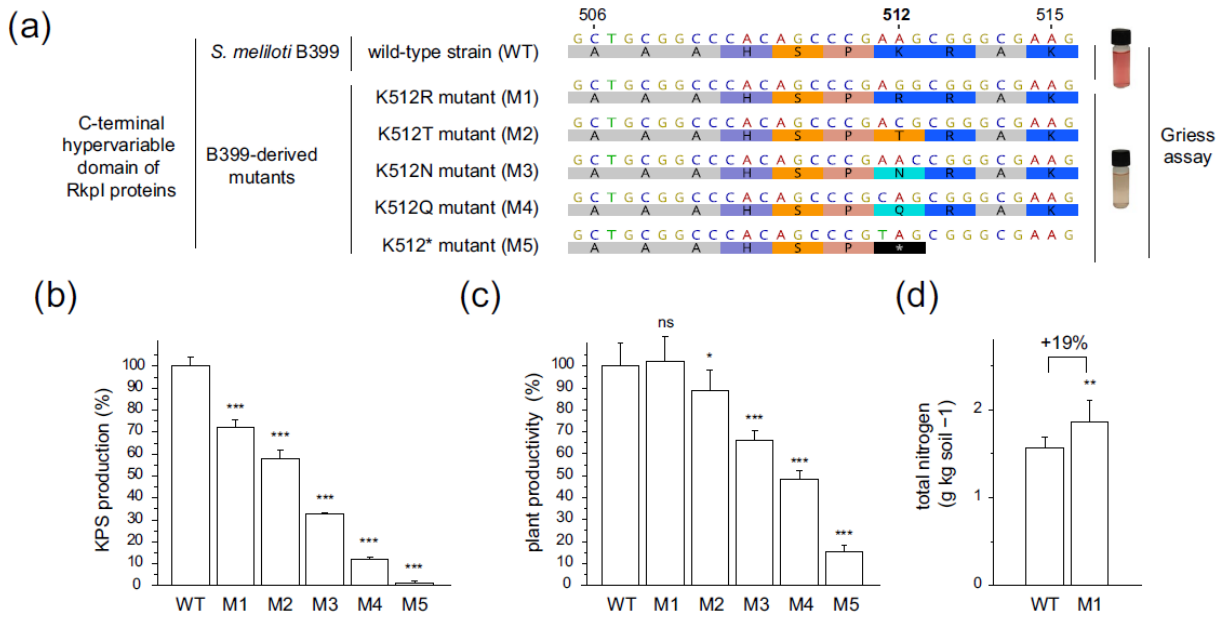


Fig. 14. Análisis funcional de mutaciones dirigidas en la región C-terminal del regulador de la biosíntesis de cápsula RkpI en el inoculante comercial de alfalfa *S. meliloti* B399. (a) Representación esquemática de las mutaciones puntuales introducidas en el gen rkpI de la cepa B399 para generar las variantes mutantes M1–M5, con cambios en la posición 512 que van desde sustituciones conservativas hasta una mutación sin sentido que trunca la región C-terminal. La actividad desnitrificante se evaluó mediante ensayos de Griess, realizados en cultivos bacterianos incubados en condiciones microaeróbicas en presencia de nitrato. (b) Cuantificación de la producción de polisacáridos capsulares (KPS) en las cepas silvestre (B399) y mutantes (M1–M5), determinada mediante tinción con azul de Alcian y análisis densitométrico. El valor del 100% corresponde a la intensidad máxima registrada para la cepa silvestre. (c) Productividad vegetal (biomasa seca) de alfalfa inoculada con la cepa silvestre (B399) y con cepas mutantes (M1–M5), según lo descripto previamente en Jozefkowicz et al. 2018. El valor de referencia del 100% corresponde a la inoculación con la cepa silvestre (B399), que produjo 0,85 kg de peso seco por parcela. (d) Contenido total de nitrógeno del suelo (0–15 cm) en sistemas de alfalfa inoculados con la cepa B399 o con la variante M1 (K512R), determinado mediante el método Kjeldahl, como se describió previamente en Fox et al. 2016. Los datos representan medias ± desvío estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto a B399.

Estos resultados mostraron que es posible desacoplar la reducción de desnitrificación de los efectos negativos sobre la simbiosis, siempre que se preserve un umbral mínimo de producción de cápsula.

Producto 5. Extensión en el uso de los inoculantes

El proyecto también permitió ampliar el uso de microorganismos beneficiosos hacia nuevos cultivos, aplicaciones y sistemas productivos. La extensión de aplicación se realizó con cinco microorganismos: cuatro bacterias, *Azospirillum brasilense* Az39, *Paenibacillus* sp. UY79, *Mesorhizobium* loti R17 y *Paenibacillus* sp. PNM200, y un hongo, *Penicillium* sp. HC1. En primer lugar, se comprobó que *Azospirillum brasilense* Az39, utilizado habitualmente como promotor del crecimiento vegetal en soja, también presenta actividad PGPR sobre alfalfa. En plantas de alfalfa cultivadas en hidroponía y sin aporte de nitrógeno, la inoculación con Az39 produjo un incremento superior al 20% en la productividad vegetal respecto del control no inoculado (**Fig.** 15).

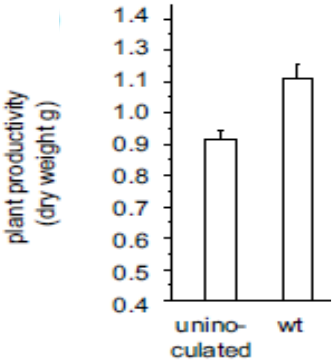


Figura 15. Se analizó el efecto de la inoculación con la cepa Az39 (wt) en la productividad de las plantas de alfalfa en hidroponía a los 50 días post-inoculación. Todos los valores son medias ± SEM (n=25), donde n=1 es el promedio de los valores obtenidos para dos plantas individuales creciendo en macetas individuales. El tratamiento no inoculado (uninoculated) se utilizó como control de la ausencia de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el sustrato.

Este resultado amplía el potencial de uso de Az39 hacia sistemas forrajeros. En segundo lugar, *Paenibacillus* sp. UY79, originalmente aislada de maní, mostró actividad celulasa, detectada mediante tinción con rojo Congo. Esta actividad es relevante por su asociación con mecanismos de control de enfermedades fúngicas y por su compatibilidad potencial con estrategias de manejo integrado en cultivos como alfalfa (**Fig.** 16).

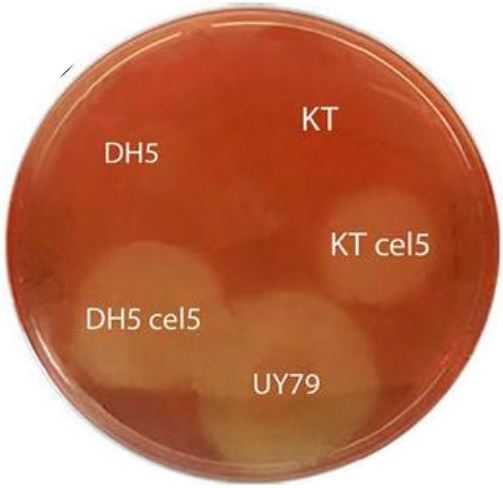


Fig. 16. Se detectó actividad de celulasa como un halo claro alrededor de las colonias cultivadas en un medio que contenía carboximetilcelulosa (CMC) después de la tinción con rojo Congo. *Escherichia coli* DH5α cel5 (DH5 cel5) y *Pseudomonas putida* KT2440 cel5 (KT cel5) se utilizaron como controles positivos, mientras que *E. coli* DH5α (DH5) y *P. putida* KT2440 (KT) se utilizaron como controles negativos.

En tercer lugar, se observó que la inoculación de Lotus corniculatus con *Mesorhizobium loti* R17 contribuye a mejorar el contenido de nitrógeno del sistema suelo-planta en rotaciones con arroz. Los análisis de abundancia natural de 15N indicaron que una proporción elevada del nitrógeno contenido en *Lotus* provenía de la fijación biológica de nitrógeno. En particular, se estimó que el 77,4% del nitrógeno de las plantas provenía de la atmósfera, evidenciando una contribución relevante de la simbiosis al balance nitrogenado del sistema (**Fig.** 17).

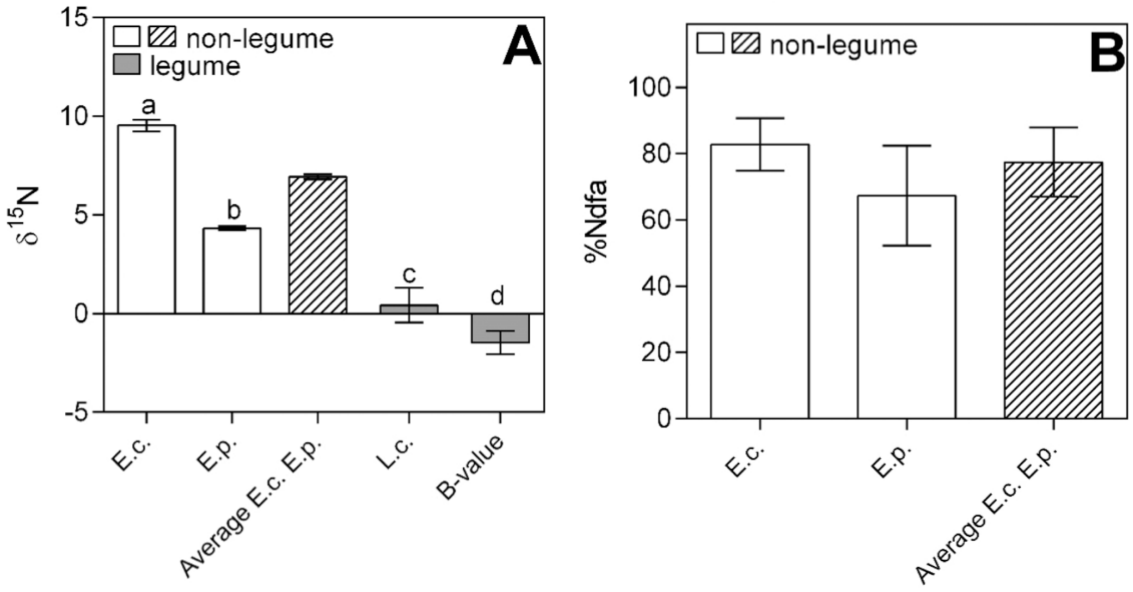


Fig. 17. Análisis de fijación biológica de nitrógeno en *Lotus corniculatus* cultivado en suelo de roca fosfórica. A. δ15n, abundancia natural de nitrógeno 15 (‰) determinada para las plantas de referencia no fijadoras: *Echinochloa crusgalli* (*E. crusgalii*) y *Eclipta prostrata* (*E. prostrata*), y para *Lotus corniculatus* fijador de nitrógeno. promedio *E. crusgalii* y *E. prostrata*: valores promedio de δ15n de *Echinochloa crusgalli* y *Eclipta prostrata*. valor b: valor de δ15n de *Lotus corniculatus* cuya única fuente de nitrógeno es la fijación biológica de nitrógeno. B. Porcentaje de nitrógeno derivado de la atmósfera en *Lotus corniculatus* considerando a *Echinochloa crusgalli* y *Eclipta prostrata* como plantas de referencia y el promedio de ambas, bajo la condición del agroecosistema de campo con roca fosfórica. letras diferentes representan diferencias significativas entre subpoblaciones (análisis ANOVA y pruebas post hoc de DGC, $p < 0.05$, $n = 4$).

En estudios posteriores con cepas aisladas de sistemas arroz-pastura, RIZ17 mostró un desempeño superior en plantas de Lotus corniculatus cultivadas bajo baja disponibilidad de nitrógeno. La inoculación con RIZ17 incrementó significativamente el área foliar total, el peso seco de tallos, el contenido de nitrógeno en tallos y el peso fresco de tallos respecto de la cepa de referencia y de otros aislamientos evaluados (**Fig.** 18).

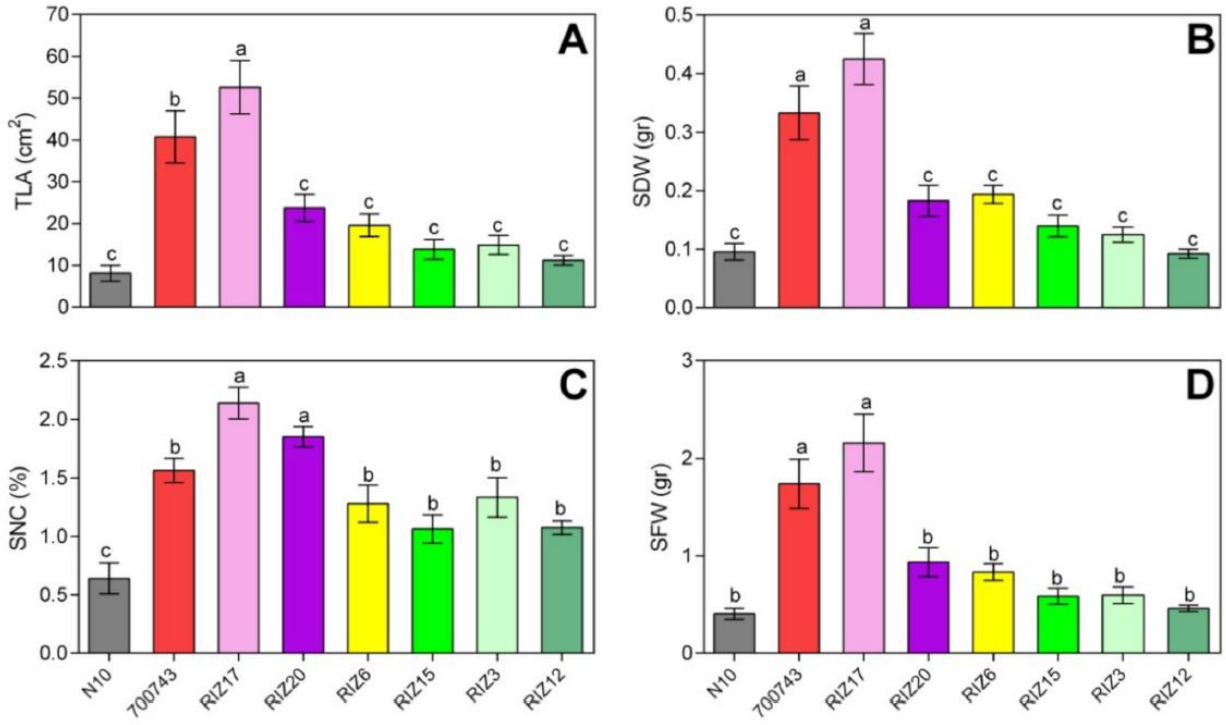


Fig. 18. Parámetros de desempeño vegetal en plantas de Lotus inoculadas con cepas aisladas y cultivadas bajo condiciones de baja disponibilidad de nitrógeno. (A) Área foliar total (cm²); (B) peso seco de tallos (g); (C) contenido de nitrógeno en tallos (%); (D) peso fresco de tallos (g). El tratamiento N10 corresponde a plantas no inoculadas; 700743 corresponde a plantas inoculadas con la cepa de referencia; RIZ17, RIZ20, RIZ6, RIZ15, RIZ3 y RIZ12 corresponden a plantas inoculadas con las cepas aisladas. Los datos fueron analizados mediante ANOVA seguido del test post hoc DGC (α = 0,05). Los valores representan la media ajustada ± error estándar (n = 8). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

Estos resultados posicionan a RIZ17 como candidata para el desarrollo de inoculantes destinados a sistemas basados en Lotus. En cuarto lugar, *Paenibacillus* sp. PNM200, aislada de muestras marinas, mostró capacidad para prevenir la enfermedad causada por *Fusarium oxysporum* FOL59 en tomate. En condiciones de invernadero, las plantas tratadas con PNM200 presentaron menor severidad de marchitez vascular respecto del control infectado, lo que confirma su potencial como agente de biocontrol (**Fig.** 19).

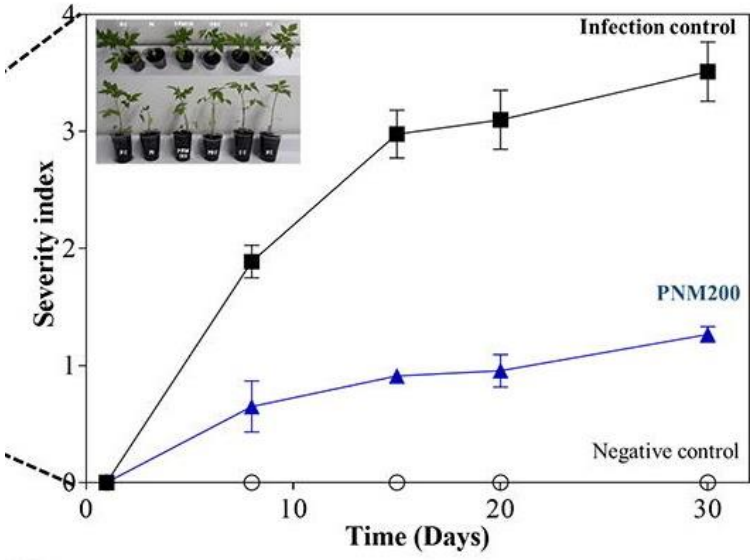


Fig. 19. Actividad antifúngica in vivo de *Paenibacillus* sp. PNM200 contra FOL59. La figura presenta el perfil del índice de severidad. Los símbolos representan: NC (control negativo), INC (control de infección), e inoculado con PNM200. Los datos presentados en cada gráfico son los promedios ± desviación estándar de tres réplicas biológicas por tratamiento.

Finalmente, *Penicillium* sp. HC1 incrementó la degradación de residuos vegetales de clavel en microcosmos, medida mediante producción de CO2. Los tratamientos inoculados presentaron mayor actividad respiratoria que los controles sin inocular, indicando una mayor actividad microbiana asociada a la degradación de residuos vegetales (**Fig.** 20).

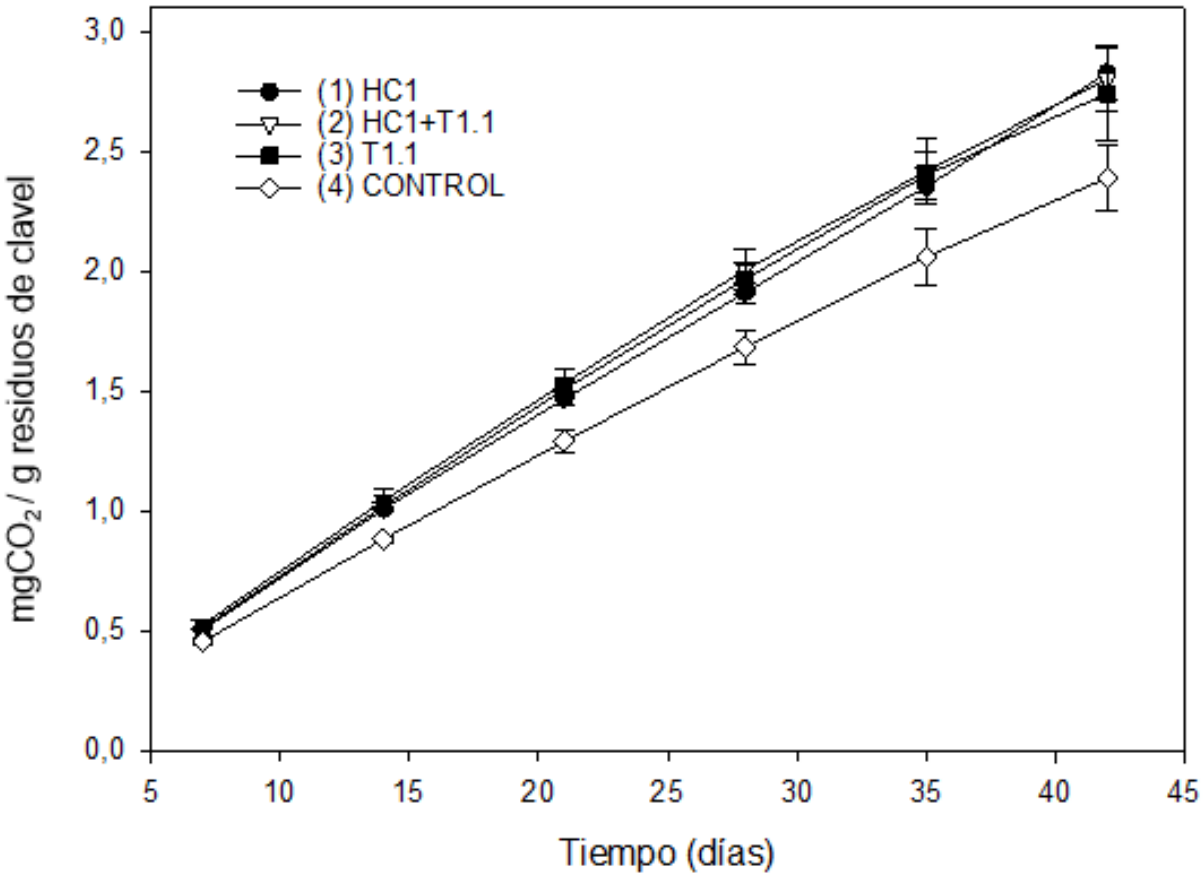


Figura 20. Cinéticas de mg CO2/g de residuos de clavel en microcosmos. Se usaron frascos de vidrio de 600 mL esterilizados, cada uno con 60 g de residuos (tallos y hojas de 2-3 cm, de Siecha Flowers S.A), 15 mL de solución salina (Anexo A) y 10 mL del microorganismo. Para mezclas, se usaron 5 mL de *Pleurotus ostreatus* T1.1 y 5 mL de *Penicillium* sp. HC1 (1x10^6 UFC/mL y esporas/mL, respectivamente). Se incluyó un control sin inoculación. Se incubaron a 28±2°C durante 42 días. Se monitoreó CO2, actividad enzimática semanal y se caracterizó el contenido de lignina y celulosa al final. Cada tratamiento tuvo 3 réplicas.

En conjunto, estos resultados ampliaron el espectro de uso de microorganismos beneficiosos en cultivos regionales, sistemas forrajeros, manejo de enfermedades y reciclado de residuos vegetales.

Producto 6. Nuevos inoculantes incorporados

El sexto producto permitió incorporar nuevos microorganismos con potencial agronómico para cultivos regionales, forrajeros, cereales y leguminosas de interés en América Latina y el Caribe. En *Desmanthus virgatus* se aisló y caracterizó una nueva cepa de rizobio, denominada *Ensifer* sp. 8L12.1. En ensayos de campo realizados en el Campo Experimental Juan Donnet, la inoculación con esta cepa incrementó la biomasa forrajera y el contenido de nitrógeno de las plantas respecto de los controles sin inocular y sin fertilizar (**Fig.** 21).

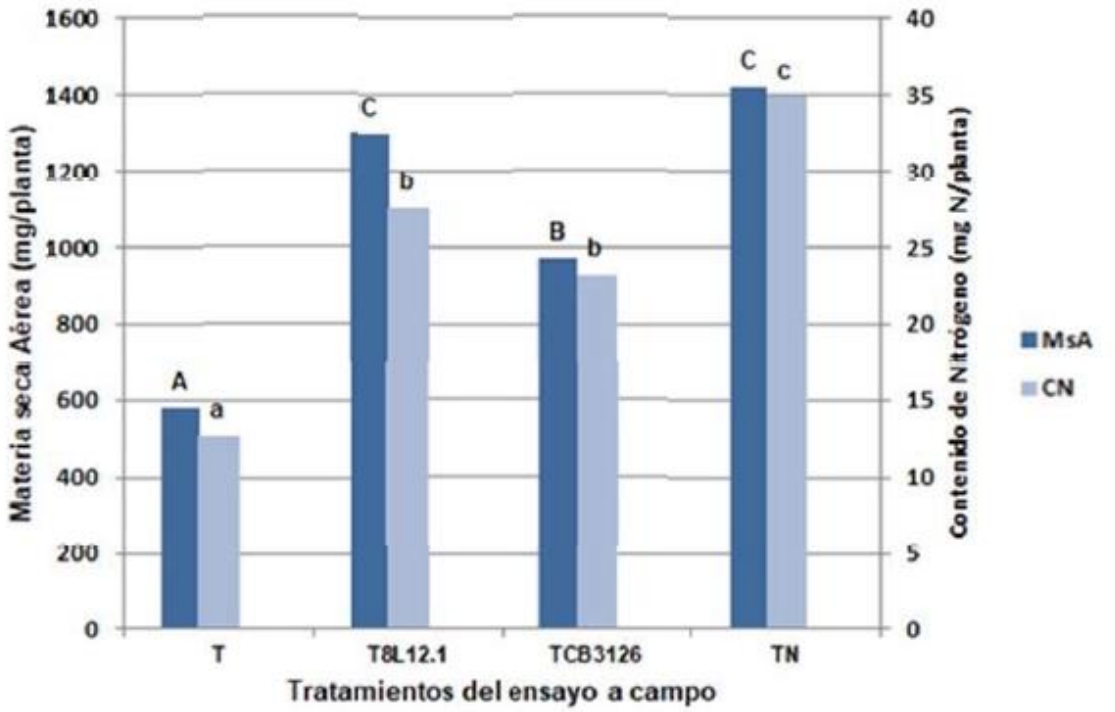


Figura 21. En esta figura se muestra la acción de la inoculación con rizobios sobre la materia seca y el contenido de nitrógeno del cultivo *D. virgatus* en ensayos de campo. T: plantas sin inoculación; T8L12.1: inoculadas con la cepa nativa 8L12.1; TCB3216: inoculadas con la cepa recomendada *E. terangae* CB3216; TN: sin inoculación con nitrógeno.

Además, se realizaron aislamientos y caracterizaciones filogenéticas preliminares de 30 nuevos rizobios provenientes de *D. virgatus* y *D. paspalaceus* en las provincias argentinas de Jujuy y Salta, ampliando la base de recursos microbiológicos disponibles para este género (Tabla 1).

Table 1. List of root nodule bacteria isolated from soils of northwest Argentina (provinces of Salta and Jujuy) through the use of *D. paspalaceus* and *D. virgatus* as trapping plants.

Isolate ID [1]	Place of Origin	Natural Host	Origen of the Root Nodules	MALDI-TOF [2] Identification Group
6-67	Salta	*D. paspalaceus*	Trapping plant in the laboratory	β
6-69	Salta	*D. paspalaceus*	Trapping plant in the laboratory	β
6-70	Salta	*D. paspalaceus*	Trapping plant in the laboratory	α
6-71	Salta	*D. paspalaceus*	Trapping plant in the laboratory	α
6-72	Salta	*D. paspalaceus*	Trapping plant in the laboratory	β
6-117	Salta	*D. paspalaceus*	Trapping plant in the laboratory	α
7-73	Jujuy	*D. virgatus*	Trapping plant in the laboratory	α
7-74	Jujuy	*D. virgatus*	Trapping plant in the laboratory	α
7-75	Jujuy	*D. vitgatus*	Trapping plant in the laboratory	α
7-76	Jujuy	*D. virgatus*	Trapping plant in the laboratory	α
7-77	Jujuy	*D. virgatus*	Trapping plant in the laboratory	α
7-78	Jujuy	*D. vitgatus*	Trapping plant in the laboratory	α
7-79	Jujuy	*D. virgatus*	Trapping plant in the laboratory	α
7-80	Jujuy	*D. virgatus*	Plant collected in the field	α
7-81	Jujuy	*D. vitgatus*	Plant collected in the field	α
7-82	Jujuy	*D. virgatus*	Plant collected in the field	α
8-83	Jujuy	*D. virgatus*	Trapping plant in the laboratory	α
8-84	Jujuy	*D. vitgatus*	Trapping plant in the laboratory	α
8-85	Jujuy	*D. virgatus*	Trapping plant in the laboratory	α
8-86	Jujuy	*D. virgatus*	Trapping plant in the laboratory	α
8-87	Jujuy	*D. vitgatus*	Trapping plant in the laboratory	α
8-88	Jujuy	*D. virgatus*	Trapping plant in the laboratory	α
8-89	Jujuy	*D. virgatus*	Trapping plant in the laboratory	α
8-90	Jujuy	*D. vitgatus*	Trapping plant in the laboratory	α
8-91	Jujuy	*D. virgatus*	Trapping plant in the laboratory	α
8-92	Jujuy	*D. virgatus*	Trapping plant in the laboratory	α
8-93	Jujuy	*D. vitgatus*	Trapping plant in the laboratory	α
8-94	Jujuy	*D. virgatus*	Trapping plant in the laboratory	α
8-95	Jujuy	*D. virgatus*	Trapping plant in the laboratory	α
8-96	Jujuy	*D. vitgatus*	Trapping plant in the laboratory	α

[1]: Isolates' IDs refer to: [sampled site]-[isolate number]. For geolocation of each sampled site see Table S1A.
[2]: Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry.

En *Mimosa pudica* se identificó *Cupriavidus* sp. UYMMa02A, una bacteria fijadora de nitrógeno capaz de colonizar raíces, formar nódulos y promover el crecimiento vegetal. Las plantas inoculadas presentaron mayor altura que las plantas no inoculadas, confirmando el potencial de esta cepa como inoculante alternativo para Mimosa (**Fig.** 22).

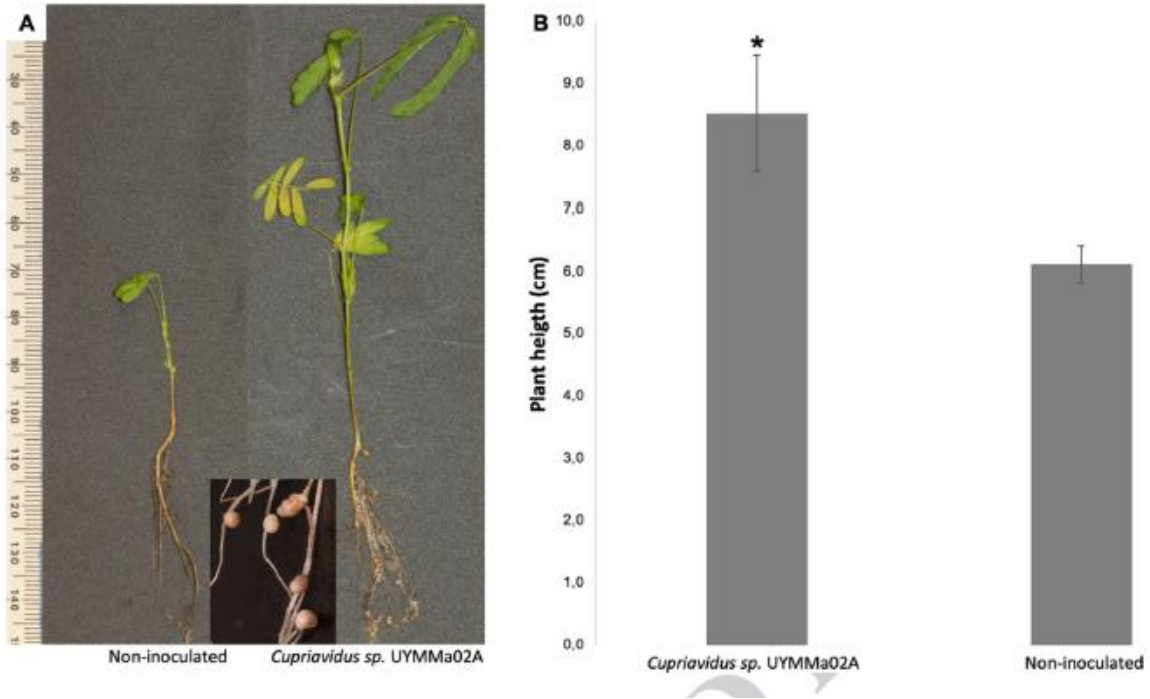


Figura 22. Capacidad de promoción del crecimiento de *Mimosa pudica* por parte de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A. A. Ejemplos del fenotipo de desarrollo de *M. pudica* cuando se inocula con *Cupriavidus* sp. UYMMA02A o no se inocula. Inserto, detalle de los nódulos formados por *Cupriavidus* sp. UYMMa02A en las raíces de *M. pudica*. B. Se registró la altura de las plantas de *M. pudica* 30 días después de la inoculación con *Cupriavidus* sp. UYMMa02A o con agua como control no inoculado. El asterisco indica diferencias significativas (valor p < 0,01) entre las plantas inoculadas y las no inoculadas.

En *Lupinus* spp. se realizó una búsqueda amplia de bacterias fijadoras de nitrógeno asociadas a seis especies nativas. Como resultado, se obtuvieron 109 cepas del género *Bradyrhizobium* con capacidad de nodular lupinos y promover su desarrollo vegetativo y reproductivo. Este trabajo amplió de manera significativa el repertorio de rizobios disponibles para especies de *Lupinus* nativas de Uruguay (**Fig.** 23).

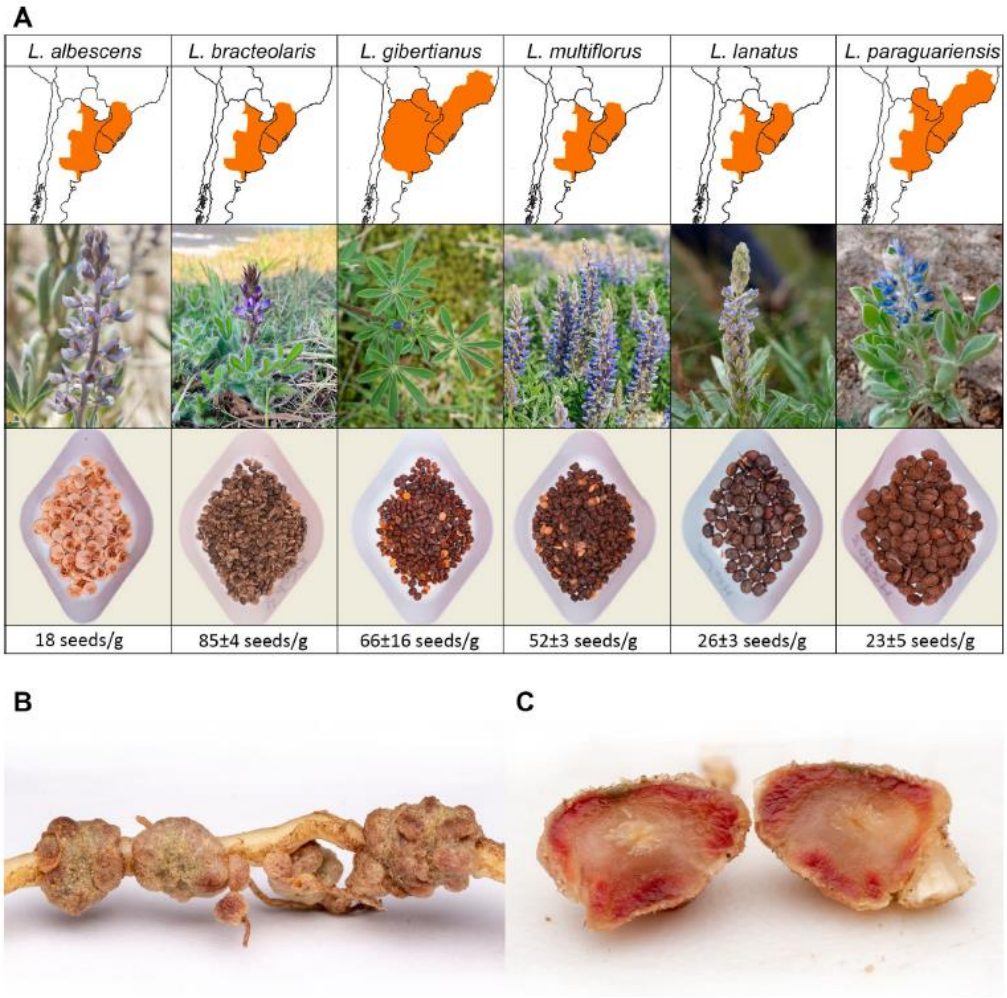


Fig.23. Distribución geográfica, plantas y morfología de nódulos de *Lupinus* spp. nativos de Uruguay. (A) Cada columna corresponde a una especie diferente de *Lupinus*; las filas corresponden al rango de distribución geográfica (arriba), una fotografía de la planta (en medio) y una fotografía de sus semillas que incluye información sobre el número de semillas por gramo (abajo). (B) Una fotografía de nódulos típicos encontrados en plantas de lupino; (C) esta figura resalta la coloración rojiza interna de los nódulos debido a la presencia de leghemoglobina. En particular, en B y C, los nódulos corresponden a simbiosis de *L. bracteolaris* UYLB-BP03.

En soja, se aisló *Bacillus* sp. UY6A, una cepa con capacidad de inhibir el crecimiento de diversos hongos patógenos mediante la producción de metabolitos difusibles. Los ensayos de antagonismo mostraron inhibición frente a patógenos relevantes como *Phytophthora sojae*, *Macrophomina phaseolina* y *Fusarium graminearum*, entre otros (**Fig.** 24).

Hongo/oomycete	Cultivo de aislamiento	Inhibición por difusibles
Phytophtora sojae Ps09	Soja	+[a]
Phytophtora sojae Ps11	Soja	+
Phytophtora sojae Ps25	Soja	+
Phytophtora sojae Ps28	Soja	+
Phytophtora sojae Ps35	Soja	+
Phomopsis sp. j83	Soja	+
Phomopsis sp. j87	Soja	++
Phomopsis sp. j664	Soja	++
Phomopsis sp. j821	Soja	++
Phomopsis sp. j429	Soja	++
Macrophomina sp j432	Soja	+
Macrophomina sp j629	Soja	+
Macrophomina sp j745	Soja	+
Macrophomina sp j746	Soja	+
Macrophomina sp j431	Soja	+
Sclerotinia sp. FI2525	Soja	++
Sclerotium rolfsii FI1948	Remolacha	+
Sclerotium sp. 2527	Cannabis	+
Rhizoctonia solani Rz01	Soja	+
Pythium sp. Py03	Soja	-
Pythium sp. Py05	Soja	+
Pythium sp. Py06	Soja	+
Pythium sp. Py07	Soja	-
Pythium sp. Py10	Soja	-
Fusarium graminearum j73	Soja	++
Fusarium graminearum j117	Soja	++
Fusarium graminearum j174	Soja	++
Fusarium graminearum j346	Soja	++
Fusarium graminearum j660	Soja	++
Fusarium graminearum fg13000	Soja	++
Fusarium graminearum fg13001	Soja	++
Fusarium graminearum fg13002	Soja	++
Fusarium graminearum fg13003	Soja	++
Fusarium graminearum fg13006	Soja	++
Fusarium oxysporum j168	Soja	++
Fusarium oxysporum j175	Soja	++
Fusarium oxysporum j250	Soja	+
Fusarium oxysporum S564	Sorgo	++
Fusarium oxysporum j38	Soja	++
Fusarium neocosmoporiellum 1	Lupino	++

Tabla 3. Capacidad de inhibición del crecimiento del hongo/oomycete a los 8 días.
[a]: -no se observa inhibición, + se observa inhibición, ++ mayor inhibición, ND no realizado.

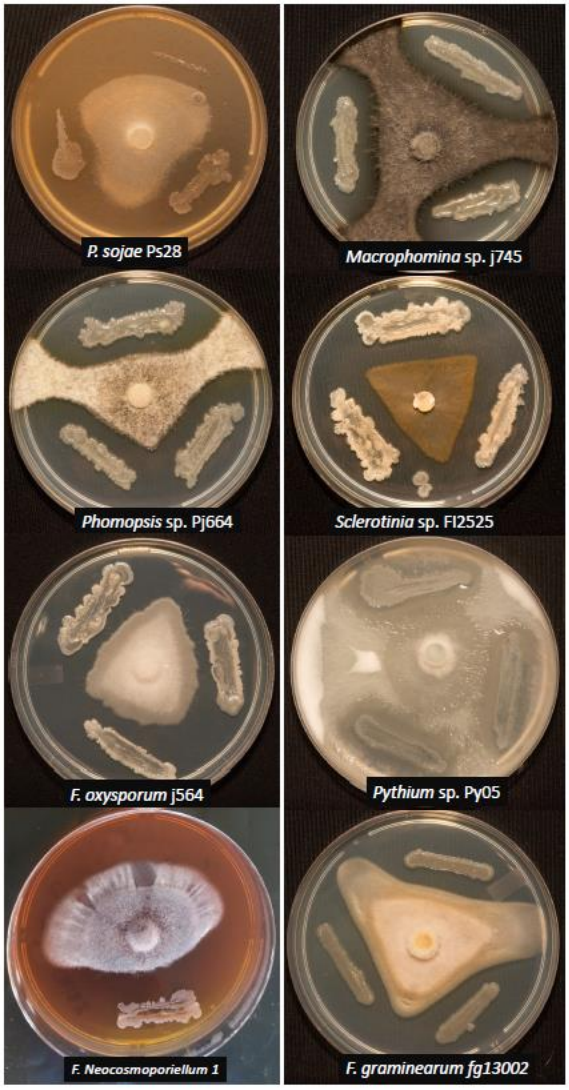


Fig. 24: Placas representativas de los resultados obtenidos en el ensayo de antagonismo por metabolitos difusibles de *Bacillus* sp. UY6A contra hongos patógenos de soja.

Este resultado incorpora una alternativa bacteriana con potencial para el control biológico de enfermedades de soja. En trigo y avena se realizaron 23 aislamientos de cepas con actividad promotora del crecimiento vegetal. A partir de estos ensayos se seleccionaron dos cepas, T4R2(2) y T1R3(1)/STRR, con capacidad de promover el crecimiento en campo y de solubilizar fósforo en condiciones controladas (**Fig.** 25).

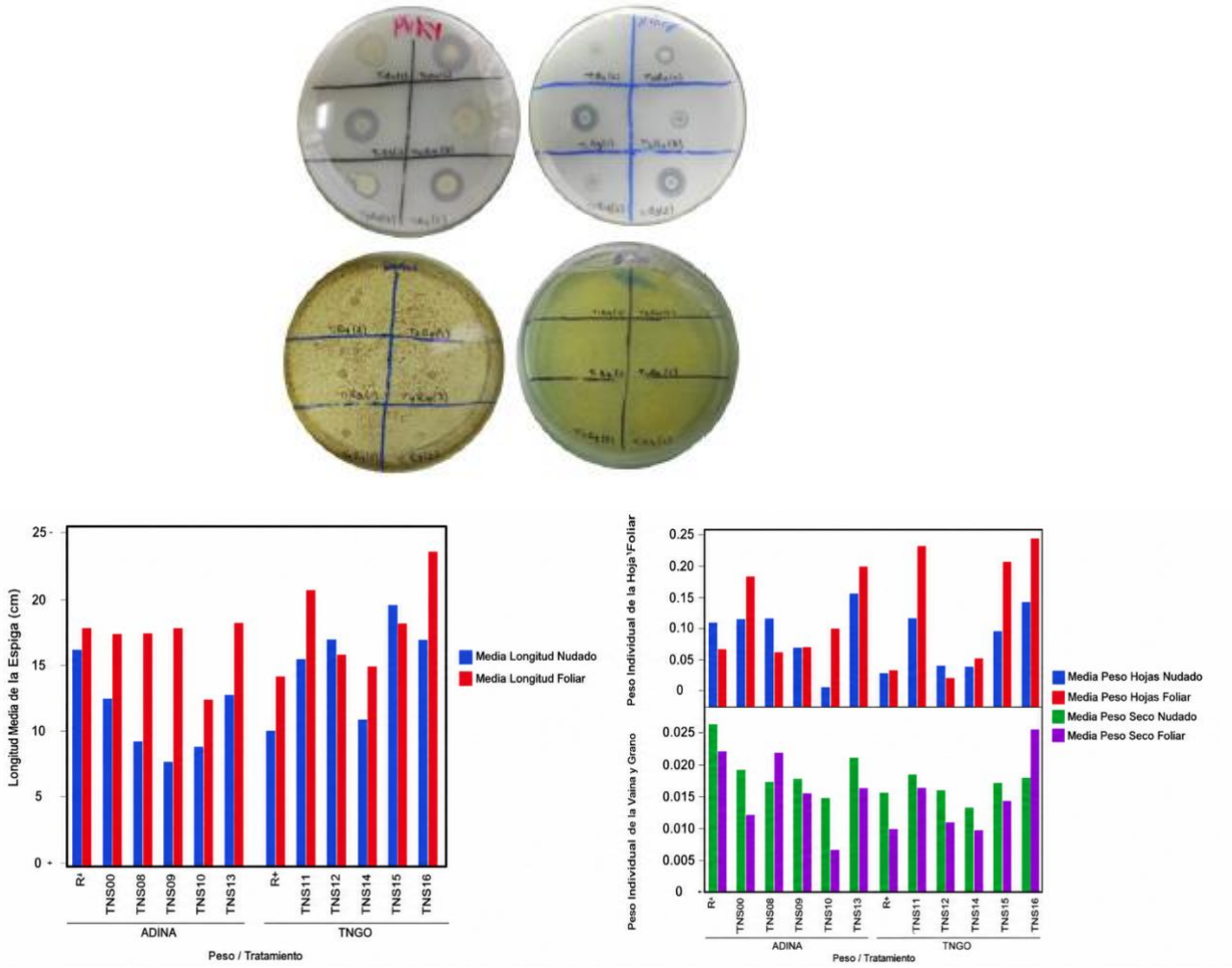


Fig. 25. (panel superior) Resultados de prueba en medios solubilizadores. (panel inferior) Comparación entre pesos (seco y fresco) y Longitudes de los tratamientos de avena y trigo.

Estos resultados aportan nuevas alternativas de bioinsumos para cereales. Finalmente, se caracterizó una interacción cooperativa entre el inoculante comercial de alfalfa *Sinorhizobium meliloti* B399 y la cepa no fijadora *Sinorhizobium* sp. LMB1. La cepa LMB1, aplicada individualmente, no promovió el crecimiento vegetal; sin embargo, en co-inoculación con B399 incrementó significativamente la productividad aérea de la alfalfa. El análisis genómico mostró que LMB1 perdió genes esenciales de fijación biológica de nitrógeno, pero conserva genes accesorios asociados al metabolismo de nitrógeno reactivo, incluyendo hmpA. Los ensayos de co-inoculación demostraron que hmpA cumple un rol clave en el incremento del número de nódulos y de rizobios viables de B399 por nódulo (**Fig.** 26).

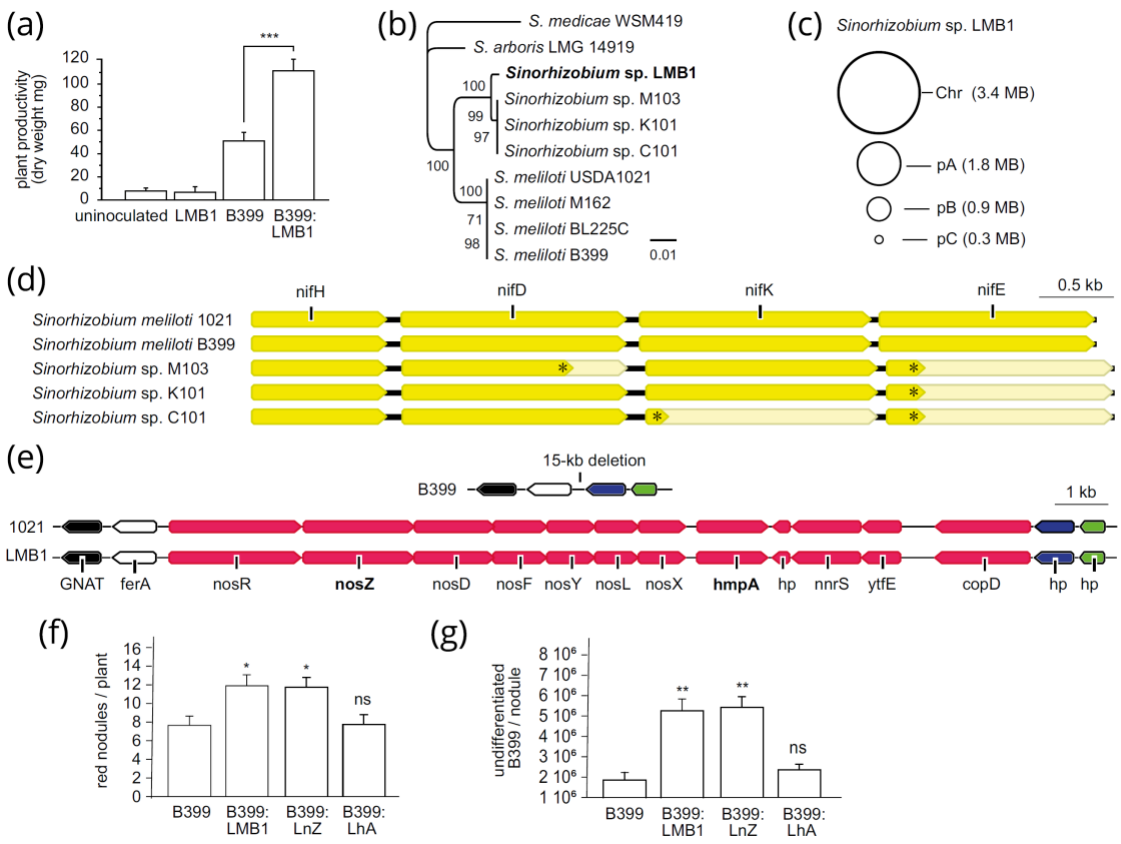


Fig. 26. El gen hmpA cumple un rol esencial en la cooperación entre las cepas B399 y LMB1. (a) Productividad de plantas de alfalfa inoculadas con B399, LMB1 y mezclas 1:1 de ambas cepas, medida como peso seco aéreo total en ausencia de nitrógeno. Los valores representan la media ± SEM (n = 12; *** p < 0,001; test t). (b) Análisis evolutivo de LMB1 utilizando cepas representativas de *S. meliloti* y especies relacionadas. (c) El genoma tetrapartito de LMB1 (6,4 Mb) está compuesto por un cromosoma y tres plásmidos depositados en NCBI (CP141212–CP141215). (d) Las cepas relacionadas C101, K101 y M103 presentan mutaciones sin sentido en genes esenciales para la nitrogenasa. (e) A diferencia de B399, LMB1 perdió los genes nif pero conservó genes asociados a la reducción de N_2O (nosZ) y oxidación de NO (hmpA). (f) Número de nódulos por planta y (g) número de rizobios viables de B399 por nódulo en inoculaciones simples y co-inoculaciones con LMB1 y sus mutantes LnZ (nosZ) y LhA (hmpA). Los valores representan la media ± SEM. Se indica la significancia estadística de las diferencias entre tratamientos (ns: no significativo; * p < 0,05; ** p < 0,01; test de Tukey).

Estos resultados indican que cepas simbióticamente ineficientes pueden contribuir al desempeño agronómico de inoculantes comerciales mediante mecanismos de cooperación metabólica.

Producto 7. Cepas con tolerancia al herbicida glifosato

El proyecto permitió desarrollar y caracterizar cepas derivadas del inoculante comercial de soja *Bradyrhizobium japonicum* E109 con mayor tolerancia a glifosato, estrés oxidativo y otras limitantes del ambiente rizosférico. En primer lugar, se obtuvieron más de 50 cepas derivadas de E109 capaces de tolerar dosis letales de glifosato. Entre ellas se seleccionaron las cepas GR1-GR5, que presentaron mutaciones en genes vinculados con transporte, metabolismo y degradación del herbicida. Estas mutantes mostraron mayor tolerancia al glifosato tanto en cultivo puro como en condiciones in planta, y conservaron la capacidad de nodular soja tolerante al herbicida (**Fig.** 27).

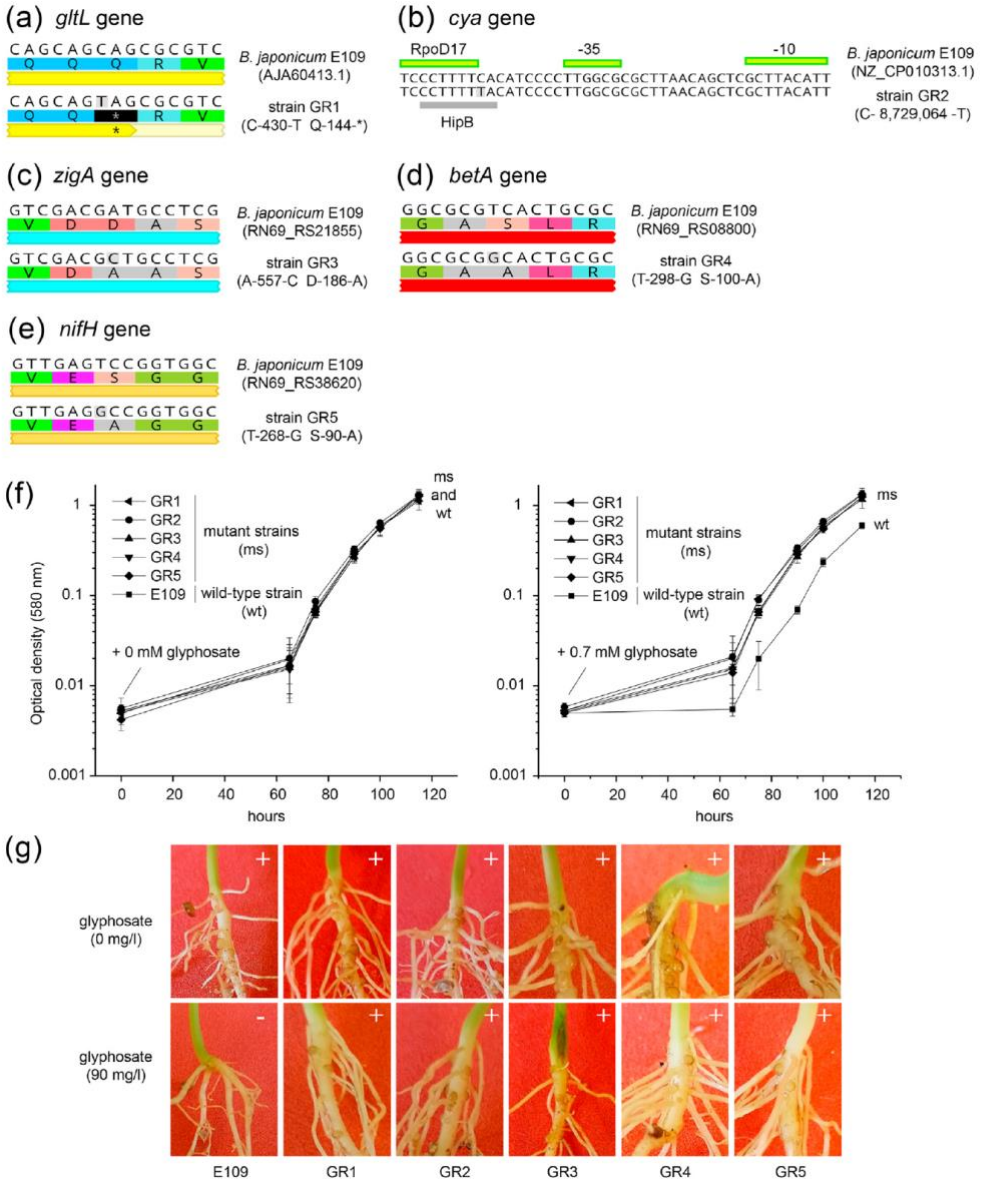


Figura 27. Mutaciones responsables del fenotipo de resistencia a glifosato (GS) en cepas mutantes espontáneas derivadas del inoculante comercial de soja E109 y capacidad de estos mutantes para sortear los efectos bacteriostáticos del GS tanto en cultivo puro como in planta. En comparación con el genoma de la cepa parental E109, los genomas de las cepas resistentes a GS (a) GR1, (b) GR2, (c) GR3, (d) GR4 y (e) GR5 presentan mutaciones únicamente en los genes *gltL* (amarillo), *cya* (verde), *zigA* (celeste), *betA* (rojo) y *nifH* (naranja), que codifican un transportador de glutamato, una adenilato ciclasa, una metalocaperona de unión a *Zn*, una colina deshidrogenasa y una subunidad de la nitrogenasa, respectivamente. Las mutaciones se indican en gris y su impacto sobre las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos se describe a la derecha. (f) Se evaluó la duración de la fase lag de E109 (una bacteria de crecimiento lento) y de sus mutantes derivados resistentes a GS GR1–GR5 en medio RMM2 con o sin estrés por GS. Los valores representan la media ± DE (n = 3). (g) Se analizó la capacidad de las cepas E109 y GR1–GR5 para nodular soja tolerante a GS en medio mínimo INTA13 sin nitrógeno. Las plantas inoculadas con rizobios fueron expuestas o no a una aplicación de GS. El experimento de inoculación se realizó dos veces utilizando ocho repeticiones por tratamiento, obteniéndose los mismos resultados. Se indican raíces con (+) o sin (–) nódulos.

En particular, la cepa GR5, portadora de la mutación NifH-S90A, incrementó el contenido de nitrógeno foliar en plantas de soja de tres meses en condiciones de campo respecto de la cepa parental E109 (**Fig.** 28).

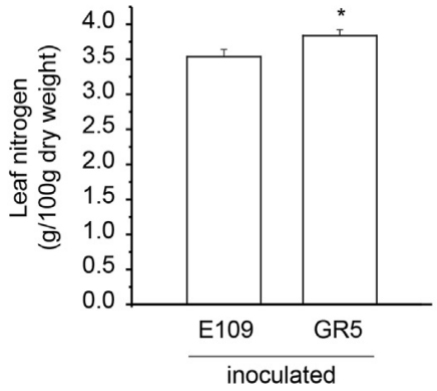


Fig. 28. Efectos de la mutación S90A sobre el contenido de nitrógeno foliar en plantas de soja de 3 meses de edad bajo condiciones de campo. Los valores representan el promedio + SEM (n=9); *p < 0,05; t-test.

El análisis del efecto del glifosato en sistemas de soja tolerante al herbicida permitió describir una cascada de efectos que involucra la translocación del herbicida hacia la rizosfera, la inhibición de rizobios fijadores de nitrógeno, el retraso en la nodulación, la reducción de productividad y la acumulación de residuos en suelo (**Fig.** 29).

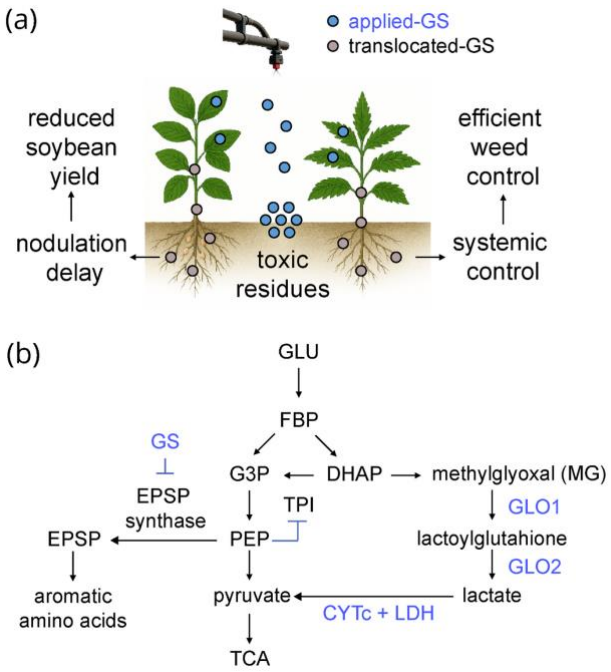


Fig. 29. Representación esquemática de los efectos del glifosato (GS) en soja transgénica, el manejo de malezas y sus implicancias para el ambiente y la salud pública. (a) Diagrama que muestra el comportamiento sistémico del GS tras su aplicación foliar en sistemas de soja tolerante a glifosato, donde el herbicida se transloca eficientemente hacia las raíces tanto del cultivo transgénico como de las malezas. A pesar de lograr un control eficaz y sistémico de malezas, el GS inhibe a cepas fijadoras de nitrógeno de *B. japonicum*, retrasando la nodulación y reduciendo el rendimiento de la soja. El GS se acumula en el suelo en forma de residuos tóxicos. (b) Interferencia del GS con rutas metabólicas centrales en una amplia variedad de organismos, incluidos los cultivos y las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, principalmente a través de la inhibición de la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSP sintasa), bloqueando la síntesis de compuestos aromáticos como aminoácidos esenciales mediante la vía del shikimato. Esta inhibición también conduce a la acumulación de fosfoenolpiruvato (PEP), al aumento de los niveles de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y a la producción del dicarbonilo citotóxico metilglioxal (MG). El MG se degrada a piruvato a través de las enzimas glioxalasa I y II (GLO1 y GLO2), el citocromo c (CYTc) y la lactato deshidrogenasa (LDH). Abreviaturas adicionales: GLU, glucosa; FBP, fructosa-1,6-bisfosfato; G3P, gliceraldehído-3-fosfato; TPI, triosa fosfato isomerasa; EPSP, 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato; TCA, ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

A nivel metabólico, se vinculó el estrés por glifosato con la acumulación de metilglioxal, un compuesto dicarbonílico citotóxico. En este contexto, se caracterizó la cepa MGD1, portadora de una mutación Ser100Ala en una lactato deshidrogenasa asociada al clúster de degradación de metilglioxal. MGD1 mostró mayor capacidad para sortear el efecto bacteriostático del metilglioxal y del glifosato, menor acumulación intracelular de metilglioxal bajo estrés, y capacidad de conferir tolerancia al glifosato cuando el clúster correspondiente fue expresado en Escherichia coli. En condiciones de campo, MGD1 mejoró la biomasa nodular bajo aplicación de glifosato y redujo los niveles del herbicida en suelo (**Fig.** 30).

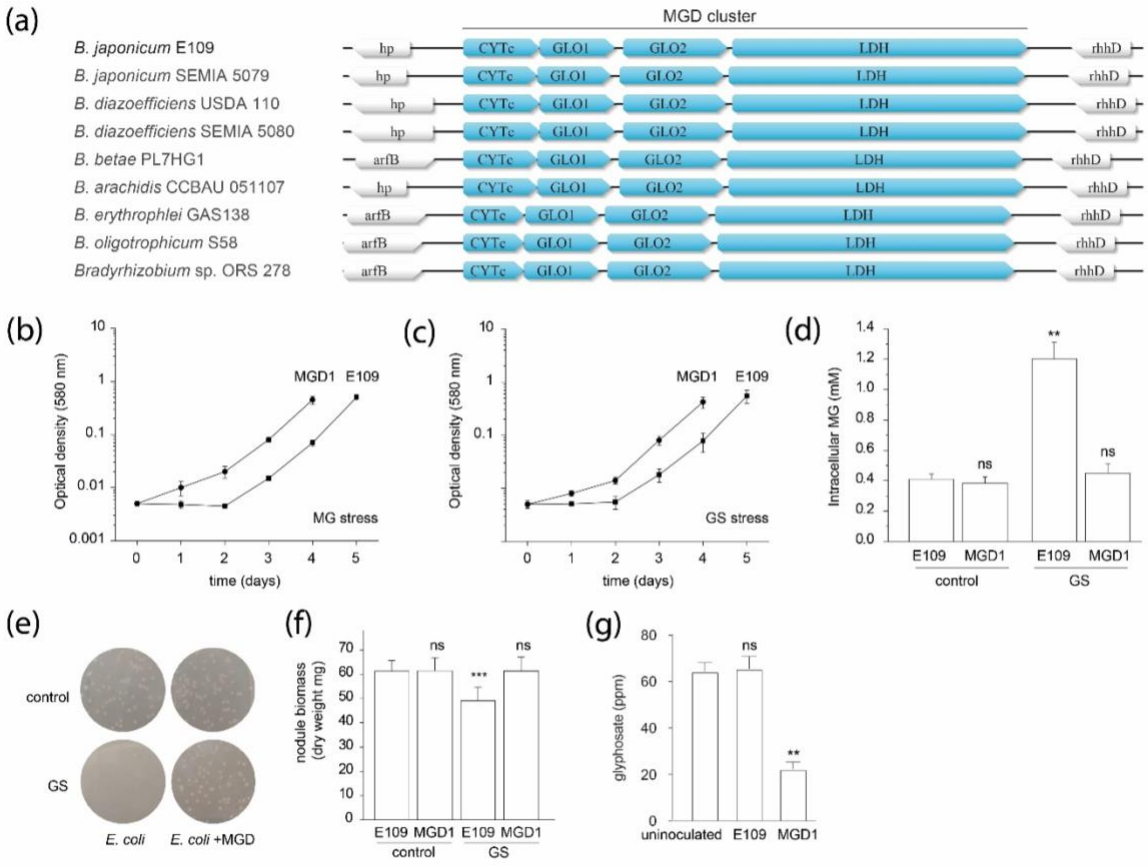


Fig. 30. El clúster de degradación de metilglioxal (MGD) contribuye a la tolerancia al estrés por glifosato en rizobios de soja. (a) La figura muestra el clúster conservado de degradación de MG (resaltado en celeste) en cepas pertenecientes al género *Bradyrhizobium*. Se representa la región genómica en cepas modelo e inoculantes. La cepa MGD1 supera el efecto bacteriostático observado en la cepa E109 cuando se expone a (b) MG (1,2 mM) en medio YEM y (c) GS (0,7 mM) en medio RRM2 bajo condiciones in vitro. (d) Cultivos en fase exponencial de las cepas E109 y MGD1 tratados con GS mostraron que MGD1 acumula niveles intracelulares significativamente menores de MG bajo estrés por GS. (e) La expresión heteróloga del clúster

MGD de MGD1 en E. coli confirió tolerancia al GS en concentraciones letales para la cepa silvestre. La biomasa nodular (f) de plantas de soja tolerantes a GS inoculadas con E109 o MGD1 se evaluaron con o sin aplicaciones de GS, sin fertilización nitrogenada sintética. (g) Niveles de GS en suelos agrícolas de plantas transgénicas inoculadas tras la aplicación del herbicida, mostrando la capacidad de MGD1 para reducir la concentración de GS. Los valores representan media ± DE (n = 4–25). Las diferencias significativas se analizaron mediante ANOVA seguido del test de comparaciones múltiples de Dunnett (ns.: no significativo, ***p < 0,001, **p < 0,01).

También se seleccionaron mutantes espontáneos resistentes al estrés oxidativo derivados de E109, denominados glxA-glxA4. Estas cepas presentaron mutaciones puntuales en el gen glxA, un regulador transcripcional asociado a un clúster antioxidante que incluye catA e yfbR (**Fig.** 31).

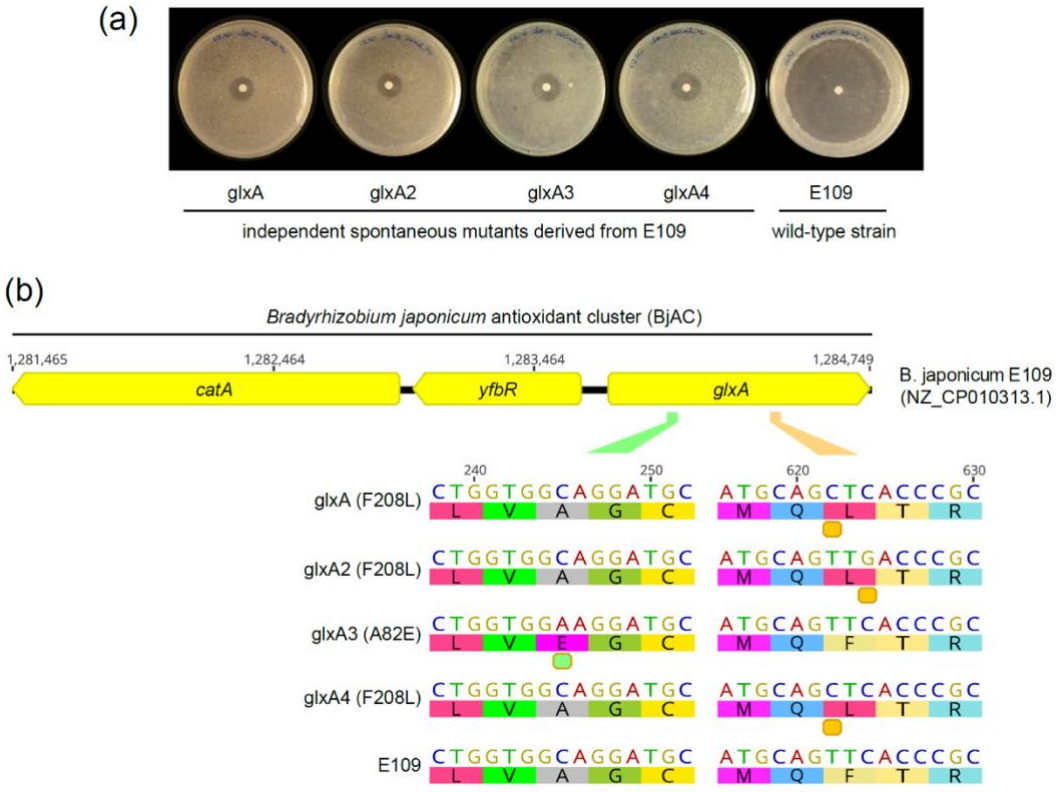


Fig. 31. Identificación de un nuevo clúster génico antioxidante en *B. japonicum* E109. (a) El ensayo de inhibición en disco confirma la tolerancia a H_2O_2 de cuatro mutantes espontáneos (glxA–glxA4) derivados de la cepa E109. (b) En comparación con el genoma de la cepa parental E109, los genomas de las cepas resistentes al estrés glxA–glxA4 presentan mutaciones únicamente en el gen regulador transcripcional *glxA* (RN69_RS05820). Este gen forma parte de un clúster antioxidante (BjAC), que codifica una catalasa (CatA) y una fosfohidrolasa (YfbR), normalmente involucradas en la detoxificación del estrés oxidativo. CatA (WP_014491374), YfbR (WP_014491375) y GlxA (WP_039154670).

La cepa glxA mostró mayor expresión de genes antioxidantes, mayor actividad catalasa y menor frecuencia de aparición de mutaciones espontáneas bajo estrés oxidativo, confirmando el rol funcional de este clúster (**Fig.** 32).

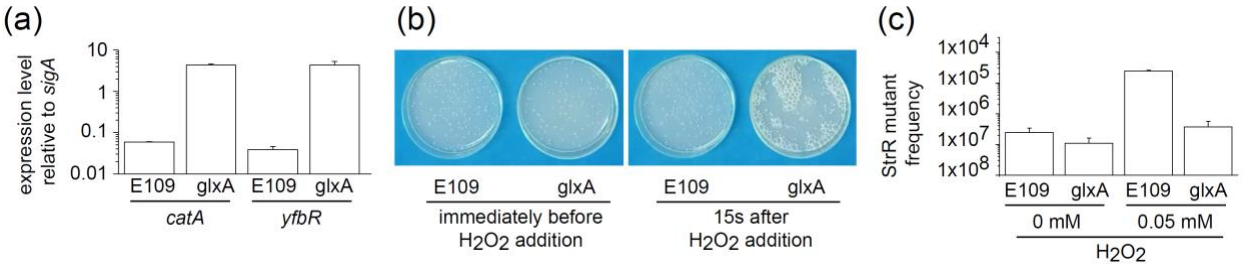


Fig. 32. Efectos de la mutación de *glxA* sobre la expresión de los genes *catA* y *yfbR* y análisis de la relevancia de dichas expresiones en las actividades catalasa y fosfohidrolasa. (a) Estudios de RT-PCR en tiempo real de la expresión de *catA* y *yfbR* en *B. japonicum* E109 y en su derivado mutante glxA. (b) A diferencia de las colonias de E109, las colonias glxA produjeron una gran cantidad de burbujas de oxígeno tras la exposición a H_2O_2, lo que sugiere una mayor tasa de hidrólisis del peróxido de hidrógeno. (c) En concordancia con la esperada mayor hidrólisis de nucleótidos oxidados en los mutantes espontáneos, la cepa glxA mostró una menor frecuencia de aparición de resistencia espontánea a estreptomicina en comparación con la cepa parental E109 bajo condiciones de estrés oxidativo. Los valores representan media ± DE (n = 3).

Los análisis evolutivos y de sintenia indicaron que el clúster antioxidante BjAC probablemente fue adquirido por transferencia horizontal en el ancestro común de *B. japonicum*, y que se encuentra ausente en especies relacionadas como *B. diazoefficiens* USDA110 (**Fig.** 33).

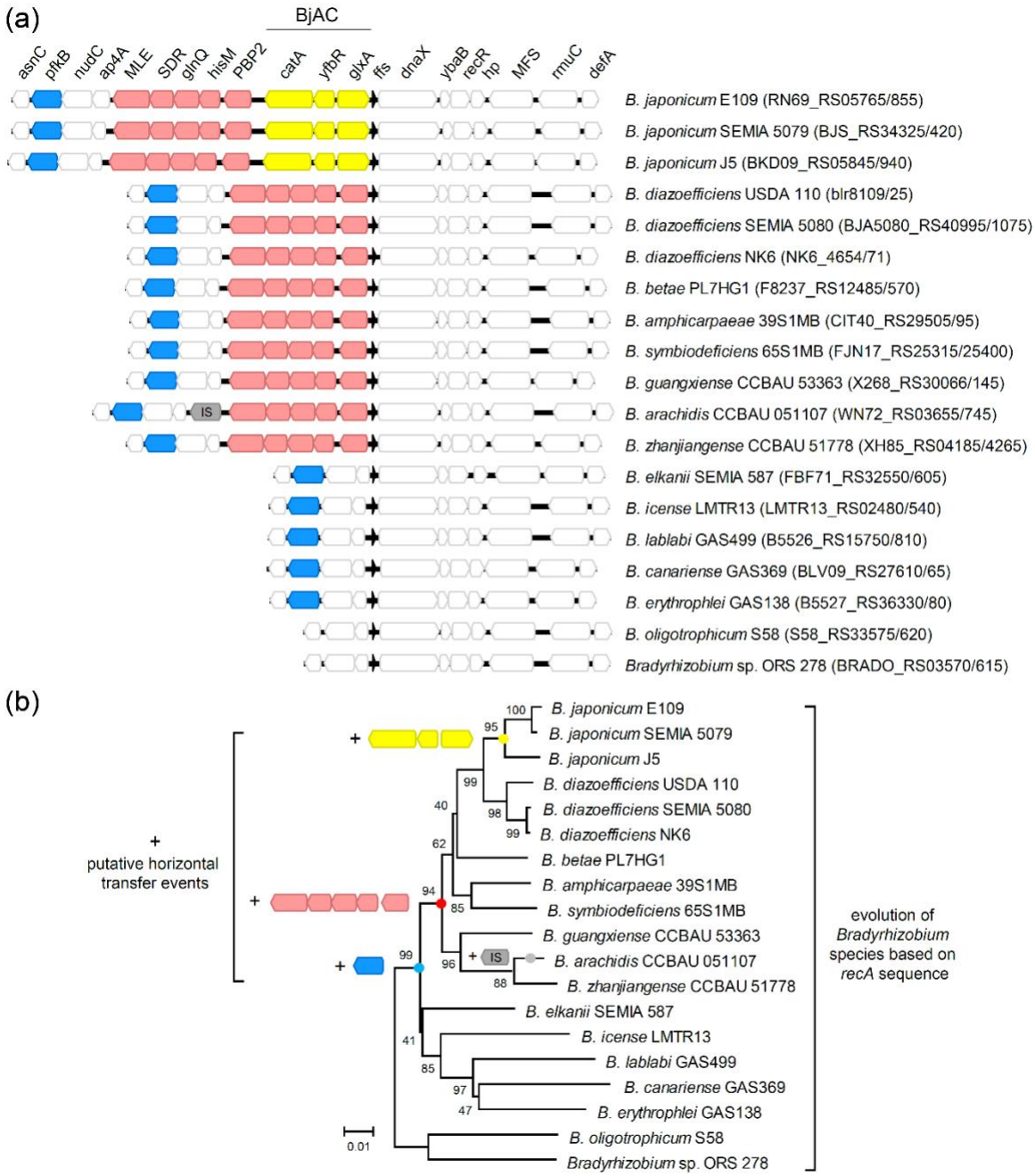


Fig. 33. Evidencias de la adquisición de BjAC en el ancestro común de las especies de *B. japonicum* mediante transferencia horizontal. (a) El clúster BjAC de cepas pertenecientes a *B. japonicum* (por ejemplo, la cepa E109) se localiza dentro de una región conservada del genoma de *Bradyrhizobium* y, específicamente, inmediatamente aguas abajo de un blanco frecuente de elementos móviles (el gen *ffs*). En este posible punto caliente de integración, las especies de *Bradyrhizobium* exhiben distintos bloques genómicos homólogos no conservados, resaltados

con diferentes colores. De manera relevante, BjAC está ausente en otras especies de *Bradyrhizobium*, incluida la especie estrechamente relacionada *B. diazoefficiens*, que incluye a la cepa modelo USDA110. En esta cepa modelo y en otras del género *Bradyrhizobium* existen proteínas anotadas como YfbR; sin embargo, estas proteínas y YfbR de *B. japonicum* probablemente no están relacionadas, dada su baja identidad de aminoácidos (<20%). Los genes ortólogos conservados se muestran en blanco, excepto los genes *ffs*, que se muestran en negro. Los bloques genómicos no conservados aguas abajo de la región *ffs* se muestran en azul (gen metabólico), rojo (genes metabólicos) y amarillo (genes antioxidantes), con la excepción de una secuencia de inserción (IS) de *B. arachidis*, mostrada en gris. (b) Relaciones filogenéticas entre especies representativas del género *Bradyrhizobium* basadas en un análisis NJ del gen *recA*. Se indican los porcentajes de *bootstrap* iguales o superiores al 40 % en los nodos. La integración del análisis evolutivo y del estudio de sintenia apoya que la explicación más parsimoniosa para la presencia de BjAC en *B. japonicum* es la ocurrencia de un evento de transferencia horizontal en el ancestro común de esta especie.

La introducción de BjAC en USDA110 incrementó su capacidad competitiva de colonización radicular hasta niveles comparables a E109, demostrando que este clúster actúa como factor simbiótico funcional en el género *Bradyrhizobium* (**Fig.** 34).

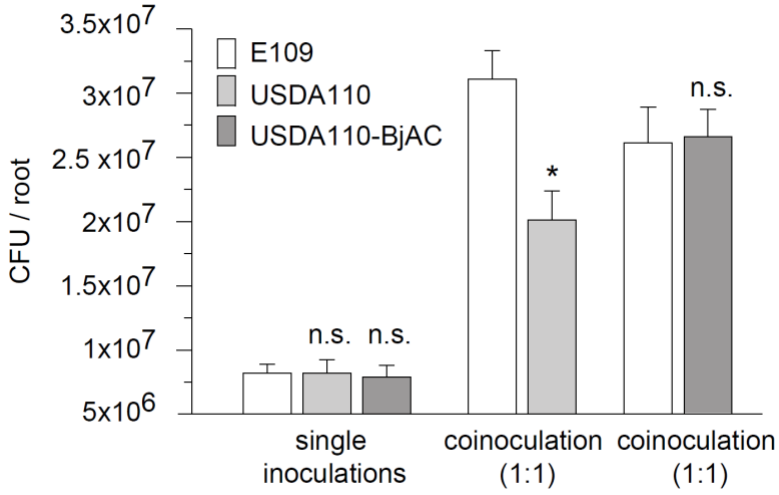


Fig. 34. Colonización de raíces de soja por *B. japonicum* E109, *B. diazoefficiens* USDA110 y *B. diazoefficiens* USDA110-BjAC. Las cepas silvestres (E109 y USDA110) y la cepa recombinante (USDA110-BjAC), que contienen (E109 y USDA110-BjAC) o no contienen BjAC (USDA110), fueron inoculadas individualmente (inoculaciones simples) o en conjunto (coinoculaciones) sobre plántulas de soja de 2 días de edad e incubadas en tubos de vidrio durante 4 días bajo condiciones de cámara de crecimiento. A los 5 días post-inoculación, las bacterias adheridas a las raíces fueron removidas y se determinaron las unidades formadoras de colonia (UFC). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones

múltiples de Dunnett, comparando todos los tratamientos con el control E109 en las inoculaciones simples, y mediante test t de Student ($p < 0,05$) en los ensayos de coinoculación. Los valores corresponden a la media ± EEM (n = 4).

En ensayos de competencia por nodulación, la cepa glxA ocupó más del 80% de los nódulos cuando fue inoculada en mezcla 1:1 con E109, mientras que un control resistente a estreptomicina mantuvo proporciones cercanas a 1:1. Estos resultados muestran una ventaja competitiva clara de los mutantes resistentes al estrés oxidativo durante la nodulación (**Fig.** 35).

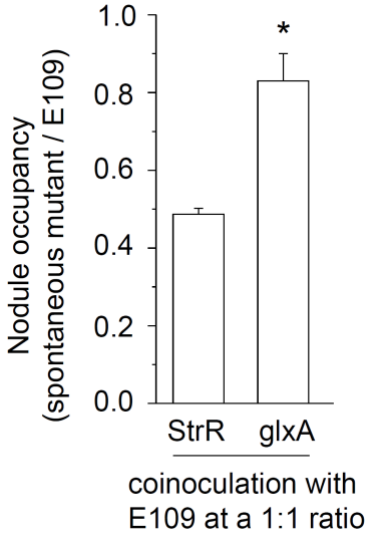


Fig. 35. Efectos de la mutación de glxA sobre la ocupación nodular. La cepa silvestre E109 y sus mutantes espontáneos derivados StrR y glxA fueron inoculados en una proporción 1:1, utilizando 10^3 UFC/planta. La ocupación de los nódulos se determinó mediante el uso de medios selectivos que contenían estreptomicina o H_2O_2. Los datos se basan en el análisis de cinco nódulos tomados de cada una de 20 plantas, lo que se considera n = 1. Los valores corresponden a la media ± EEM (n = 3). El análisis estadístico se realizó mediante test t de Student (n.s.: no significativo, $p < 0,05$).

Además, en ensayos hidropónicos sin nitrógeno, las plantas inoculadas con glxA mostraron mayor productividad que las inoculadas con E109, sin pérdida de biomasa nodular, lo que posiciona a esta cepa como candidata para mejorar la eficacia de inoculantes de soja (**Fig.** 36).

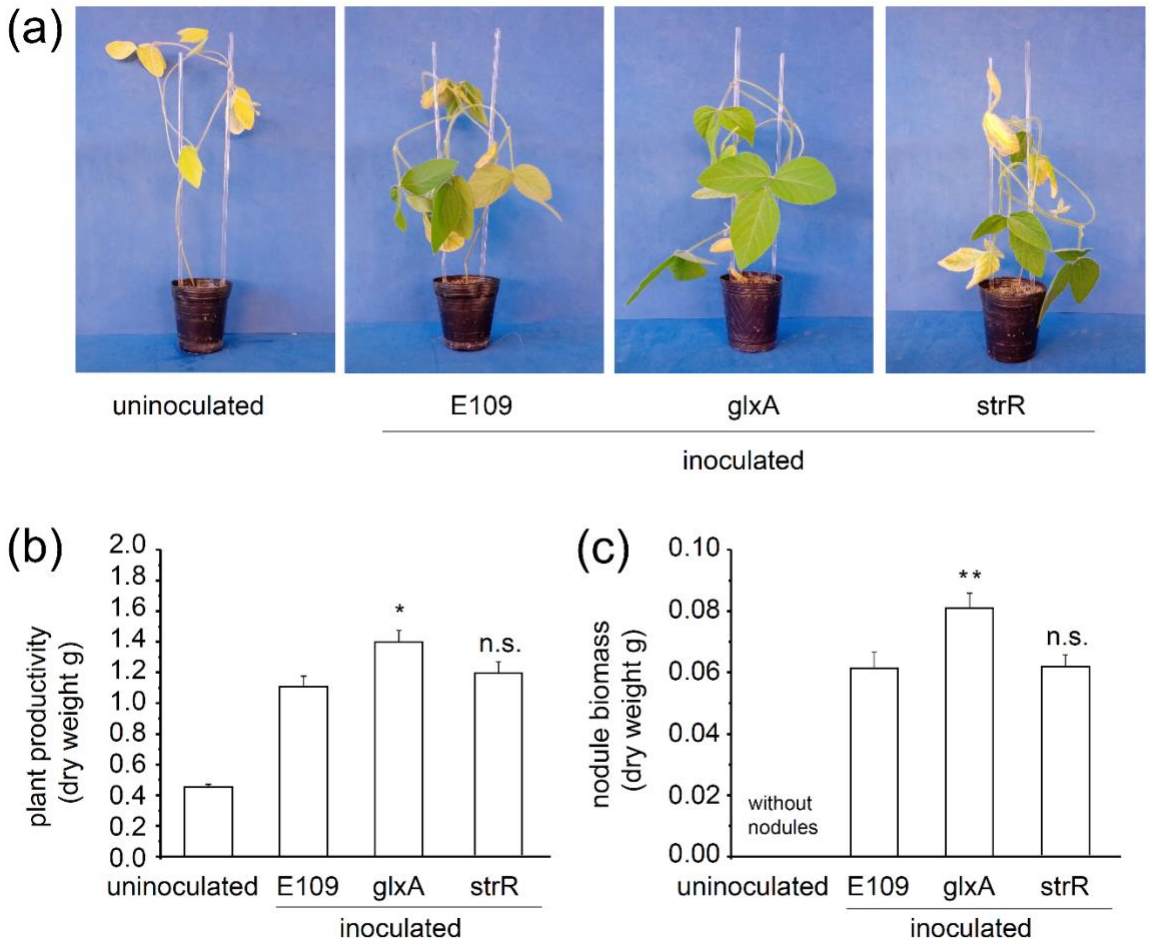


Fig. 36. Efectos de la mutación de *glxA* sobre la eficacia promotora del crecimiento vegetal. El fenotipo (a), la productividad (b) y la biomasa nodular (c) de plantas de soja inoculadas con la cepa silvestre E109 y la cepa mutante glxA se analizaron en ausencia de nitrógeno en el sustrato. Todos los valores corresponden a la media ± SE (n = 24), donde n = 1 representa el promedio de los valores obtenidos para tres plantas individuales cultivadas en macetas individuales. Las diferencias significativas entre inoculantes se analizaron mediante ANOVA seguido del test de comparaciones múltiples de Dunnett (n.s.: no significativo, **p < 0,01, *p < 0,05).

Finalmente, se identificó un nuevo mutante espontáneo resistente al estrés oxidativo, denominado AK, portador de una mutación V263A en el gen lysC. Esta mutación se asoció con mayor tolerancia al peróxido de hidrógeno, mayor eficacia metabólica bajo estrés oxidativo y nutricional, mayor supervivencia en condiciones limitantes y ventaja competitiva durante la ocupación nodular frente a E109 (**Fig.** 37).

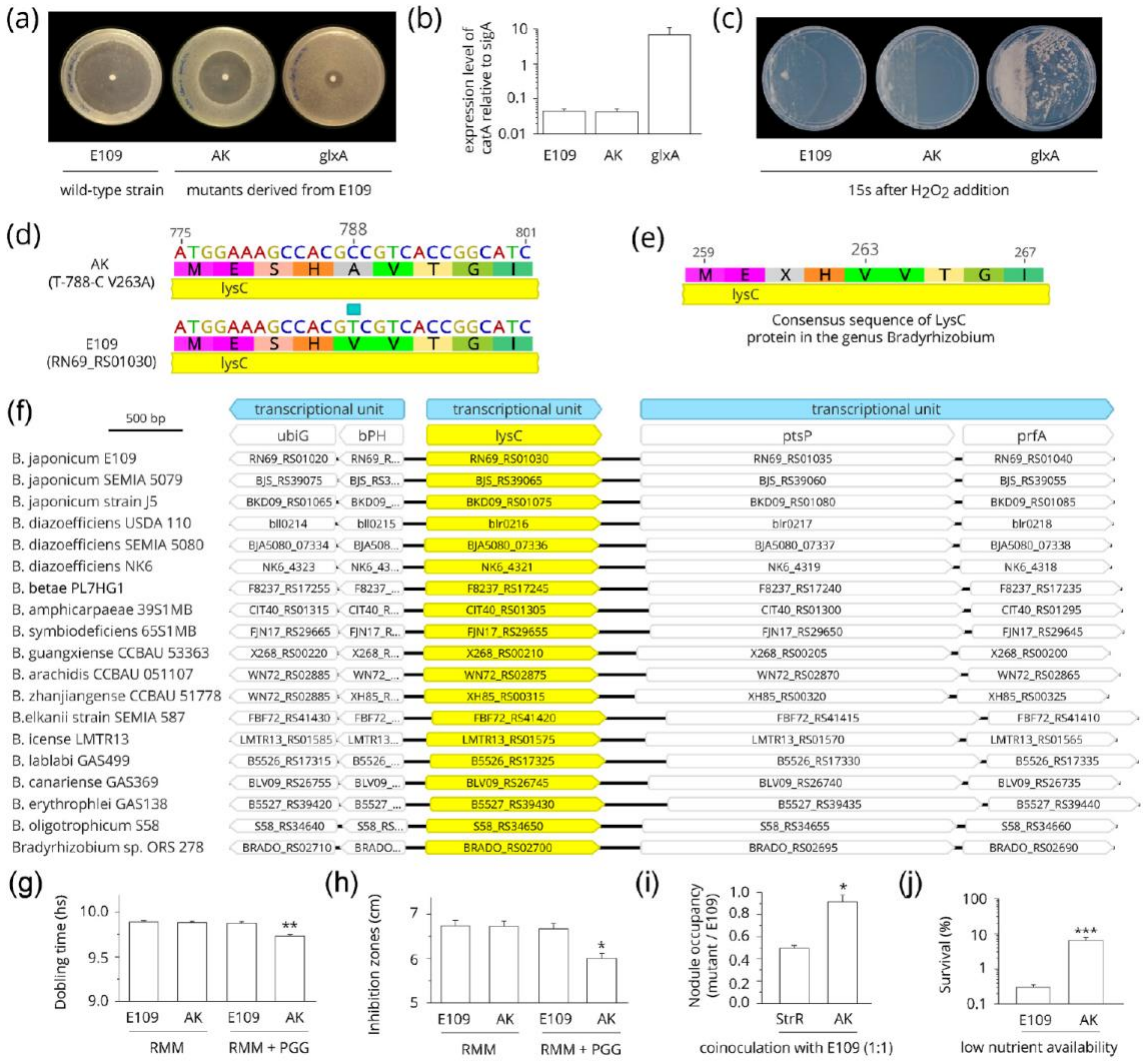


Figura 37. La mutación V263A en LysC mejora la resistencia al estrés oxidativo y la competitividad de nodulación en el inoculante de soja E109. (a) El ensayo de inhibición de disco en agar YEM confirma la tolerancia al H2O2 (30%) de un mutante espontáneo (AK) derivado de la cepa salvaje E109. (b) Estudios de RT-PCR en tiempo real de la expresión de catA en *B. japonicum* E109 y su derivado mutante de lysC, cepa AK. (c) Contrariamente a las colonias E109 y AK, las colonias glxA produjeron una gran cantidad de burbujas de oxígeno después de la exposición al H2O2. (d) En comparación con el genoma de su cepa parental E109, el genoma de la cepa resistente a la oxidación AK muestra una mutación solo dentro del gen lysC (amarillo), que codifica una proteína similar a la quinasa del aspartato. La mutación está resaltada en gris y su impacto en las secuencias de nucleótidos y aminoácidos se describe a la izquierda. (e) La secuencia de consenso de la proteína LysC en el género *Bradyrhizobium* revela que la valina en la posición 263 y la mayoría de los aminoácidos cercanos están altamente conservados en este

grupo de microsimbiontes. (f) El gen lysC de cepas pertenecientes al género *Bradyrhizobium* (por ejemplo, la cepa E109) está situado dentro de una región conservada del genoma de *Bradyrhizobium*, y específicamente, inmediatamente aguas abajo de dos componentes del sistema de fosfotransferencia bacteriana (PTS) relacionados con la translocación y fosforilación de numerosos sustratos (los genes ptsP y prfA). Las unidades de transcripción putativas están resaltadas en azul claro (www.microbesonline.org). (g) El tiempo de duplicación de la cepa salvaje E109 y la cepa mutante AK se evaluaron en células en crecimiento exponencial en medio RMM, con o sin la adición de 50 µg/ml de proil-glicil-glicina (PGG). (h) El ensayo de inhibición de disco utilizando H2O2 (30%) en agar RMM, con o sin la suplementación de 50 µg/ml de PGG. (i) La cepa E109 y sus mutantes espontáneos derivados StrR y AK fueron inoculados en una proporción de 1:1, utilizando 103 UFC/planta. La ocupación de los nódulos se determinó utilizando medios selectivos que contenían estreptomicina o H2O2. (j) Las cepas E109 y AK se cultivaron durante una semana en una proporción de 1:1, utilizando 103 UFC/planta. La ocupación de los nódulos se determinó utilizando medios selectivos que contenían estreptomicina o H2O2. (j) Para evaluar la supervivencia celular en condiciones de bajo nutriente, las culturas de YEM de las cepas E109 y AK se transfirieron a una solución fisiológica (0.9% de NaCl) e incubaron durante dos meses. La supervivencia se expresó como un porcentaje del número de unidades formadoras de colonias en el momento cero, que se tomó como 100%. Los estudios fisiológicos y moleculares se realizaron como se describió anteriormente (Liebrenz et al., 2022). Los valores son medios ± SEM (n=4-20). Los asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa (Prueba t de Student: *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

En conjunto, estos resultados demuestran que el mejoramiento de inoculantes puede incorporar tolerancia a glifosato, detoxificación metabólica, resistencia al estrés oxidativo y mayor competitividad simbiótica como rasgos complementarios.

Producto 8. Perfil de actividad PGPR de las mutantes obtenidas

El octavo producto evaluó específicamente si las mutaciones seleccionadas por tolerancia a glifosato mantenían un perfil adecuado de promoción del crecimiento vegetal. En una primera etapa se analizaron las cepas GR1-GR5 derivadas de *Bradyrhizobium japonicum* E109 en ausencia de aplicación de glifosato. Estas cepas portan mutaciones puntuales en gltL, cya, zigA, betA y nifH, respectivamente, responsables del fenotipo de tolerancia. Los ensayos de inoculación en soja mostraron que ninguna de las mutaciones evaluadas generó penalidades sobre la actividad PGPR en ausencia del herbicida. Más aún, la cepa GR5 presentó un desempeño superior al de la cepa parental E109, evidenciado por mejoras en parámetros productivos bajo condiciones sin nitrógeno en el sustrato (**Fig.** 38).

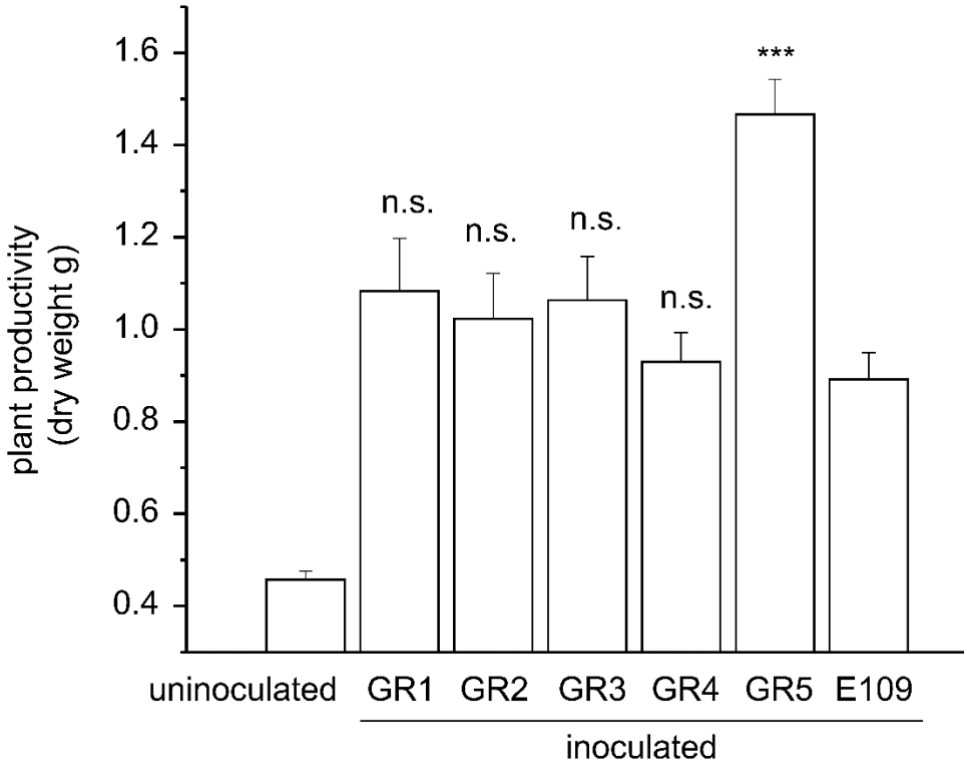


Figura 38. Efectos de las mutaciones de tolerancia a glifosato en la eficacia de la promoción de crecimiento vegetal. La productividad de las plantas inoculadas con la cepa parental E109 y las mutantes GR1-GR5 fueron analizadas en ausencia de nitrógeno en el sustrato y sin la adición de glifosato. Los valores son del promedio + SEM (n = 24). Las diferencias significativas entre los inoculantes fueron analizadas con ANOVA y test de Dunnettt (n.s.: no significativa, ****p < 0.0001).

Este resultado confirmó que la tolerancia a glifosato no necesariamente implica costos funcionales para la simbiosis y que algunas mutaciones pueden incluso mejorar la eficacia del inoculante. En una segunda etapa se evaluó la cepa MGD1, asociada a una mayor detoxificación de metilglioxal y tolerancia a glifosato. En ausencia del herbicida, no se detectaron diferencias significativas entre MGD1 y E109, lo que indica que la mutación no produce efectos pleiotrópicos negativos. En cambio, bajo aplicación de glifosato, la inoculación con MGD1 permitió atenuar las pérdidas productivas observadas con la cepa parental (**Fig.** 39).

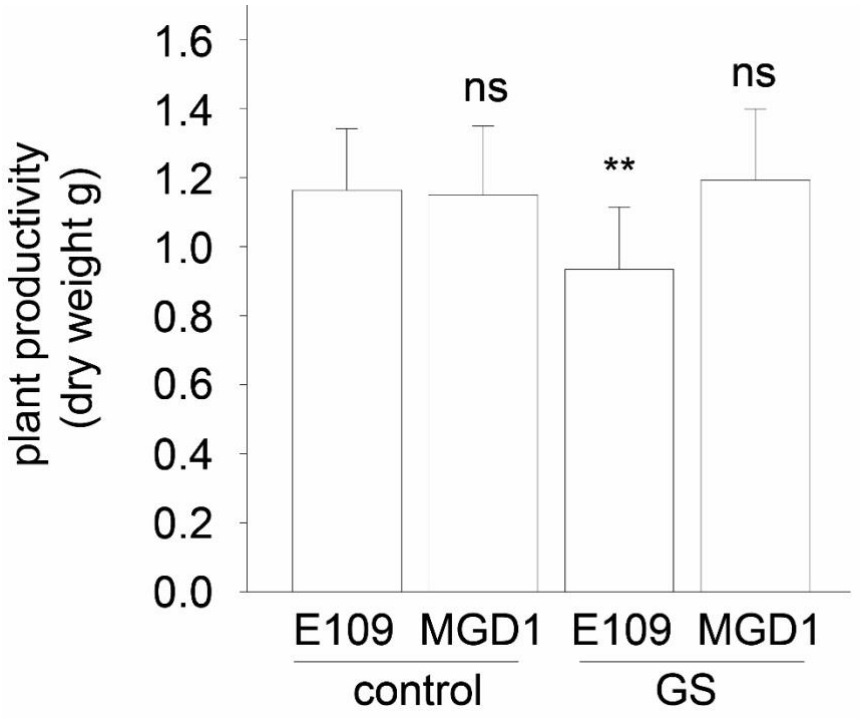


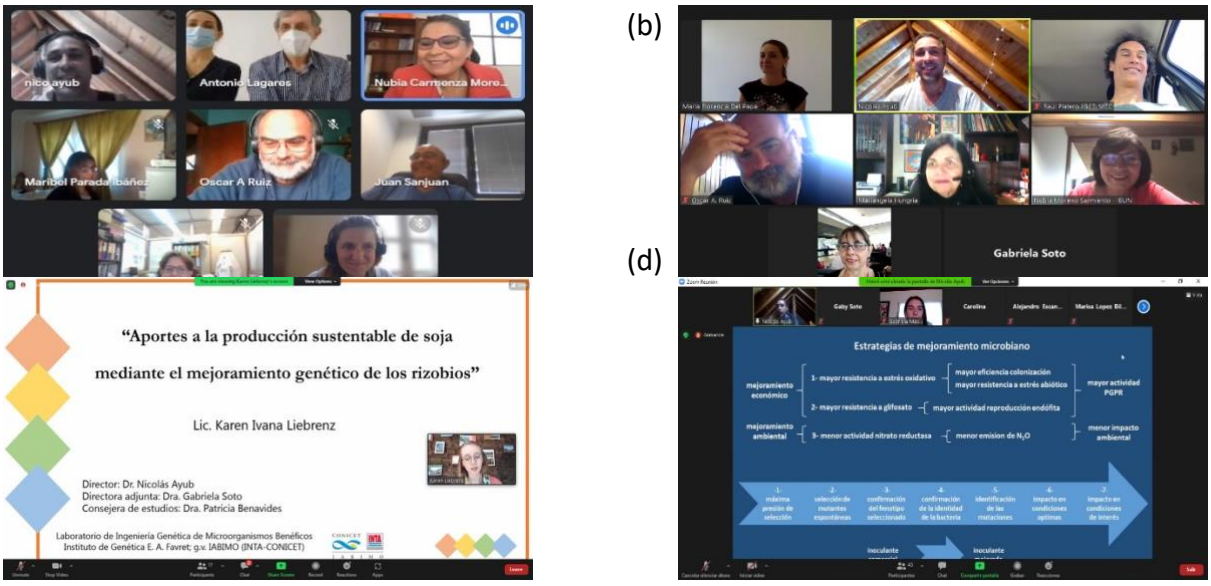
Fig. 39. La productividad de plantas de soja tolerantes a GS inoculadas con E109 o MGD1 se evaluaron con o sin aplicaciones de GS, sin fertilización nitrogenada sintética. Los valores representan media ± DE (n = 4–25). Las diferencias significativas se analizaron mediante ANOVA seguido del test de comparaciones múltiples de Dunnett (ns.: no significativo, **p < 0,01).

Estos resultados demuestran que algunas mutaciones mejoran el desempeño del inoculante de manera específica bajo condiciones de estrés, sin afectar su comportamiento en condiciones no estresantes.

Producto 9. Avances en la comunicación

El proyecto desarrolló una estrategia sostenida de comunicación, coordinación y formación de recursos humanos durante los años 1, 2, 3 y 4. Dado que el inicio del proyecto coincidió con la pandemia por COVID-19, se implementó desde el comienzo una modalidad de interacción virtual que permitió mantener reuniones de coordinación general, intercambio técnico-científico entre grupos de trabajo y seminarios periódicos de presentación de avances. Se realizaron reuniones semestrales de coordinación entre directores técnicos de los organismos ejecutores, co-ejecutores y asociados, así como seminarios cuatrimestrales de becarios, becarias, investigadores e investigadoras. Estas actividades permitieron sostener la planificación conjunta, discutir resultados, compartir capacidades técnicas y fortalecer la formación de recursos humanos altamente calificados. En total participaron más de 50 profesionales, incluyendo investigadores y doctorandos (**Fig.** 40).

(a) (b)



(c) (d)

Fig. 40. Ejemplos de encuentros de coordinación (a y b) y seminarios (c y d) del proyecto.

En materia de difusión pública, se redefinió la estrategia original de comunicación, priorizando canales más dinámicos y de mayor interacción que una base de datos estática. Inicialmente se utilizó la plataforma X mediante la cuenta @bioinoculantes; posteriormente, debido a un ciberataque, se priorizó Instagram como canal seguro de comunicación digital. La cuenta utilizada alcanzó más de 800 seguidores y contó con la participación de más de 20 profesionales en la generación de material audiovisual (**Fig.** 41).



Fig. 41. Ejemplo de comunicación masiva de las actividades del proyecto en redes sociales en los años 2024 en X (panel izquierdo) y 2025 en Instagram (panel derecho).

También se realizaron actividades de difusión dirigidas a personal diplomático en formación, mediante vínculos con el Instituto del Servicio Exterior de la Nación Argentina. Estas jornadas permitieron comunicar a 24 profesionales las capacidades técnicas y productivas instaladas en América Latina y el Caribe, así como el potencial regional para la producción y exportación de inoculantes convencionales y editados (**Fig.** 42).



Fig. 42. Ejemplo de jornada de capacitación a personal diplomático en formación en el Instituto de Genética, Buenos Aires, Argentina.

Asimismo, se llevó a cabo un webinar oficial de FONTAGRO, en el cual se presentaron de manera integral los avances del proyecto. Durante esta actividad se expusieron los resultados técnicos vinculados con edición génica en inoculantes comerciales, selección y validación de mutantes espontáneos, ampliación del espectro de aplicación de inoculantes, evidencia generada en condiciones controladas y de campo, desafíos regulatorios y oportunidades de transferencia tecnológica. El material audiovisual del webinar alcanzó casi mil visualizaciones (**Fig.** 43).



Fig. 43. Presentación del webinar del proyecto, contando los últimos avances en todos los países (https://www.youtube.com/watch?v=t1n3BNNI3PE).

Finalmente, se realizó una jornada presencial de capacitación regional en Bogotá, Colombia, orientada a la comunidad vinculada con la producción y desarrollo de inoculantes en América Latina y el Caribe. En esta actividad se difundieron avances técnicos, regulatorios y comerciales, con énfasis en mutantes espontáneas, edición génica mediante CRISPR/Cas9 y pasos clave para la inscripción y comercialización de nuevos inoculantes. Participaron referentes de Argentina, Uruguay, Chile, Paraguay, Perú, Colombia y Brasil (**Fig.** 44).



Fig. 44. Ejemplo de capacitación regional orientada a la difusión de aspectos técnicos, regulatorios y comerciales de las tecnologías desarrolladas en el marco del proyecto, con especial énfasis en la edición génica mediante CRISPR/Cas9 en el año 2025. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Producto 10. Redacción de resultados y revisiones

El proyecto generó una producción científica significativa, orientada a difundir los avances técnicos en revistas científicas con referato. En total se realizaron veinte publicaciones vinculadas con los objetivos del proyecto, cubriendo áreas como control biológico, caracterización de rizobios, genómica de inoculantes, tolerancia a estrés oxidativo, tolerancia a glifosato, promoción del crecimiento vegetal, fijación biológica de nitrógeno, cooperación microbiana, edición génica en inoculantes y evaluación regulatoria de productos editados. Las publicaciones incluyeron trabajos sobre Paenibacillus sp. PNM200 y control de Fusarium en tomate; rizobios asociados a Desmanthus; genomas de bacterias fijadoras de nitrógeno; mutantes de Bradyrhizobium resistentes a estrés oxidativo; mecanismos de tolerancia a glifosato; funciones de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal; Azospirillum y alfalfa; contribución de Lotus corniculatus al carbono del suelo en rotaciones arroz-pastura; Cupriavidus y Mimosa pudica; Paenibacillus UY79 y actividad antifúngica; diversidad de Sinorhizobium en Desmanthus; Bradyrhizobium asociado a Lupinus; mecanismos de cooperación entre rizobios fijadores y no fijadores; edición génica de inoculantes de soja mediante CRISPR/Cas9; rizobacterias asociadas a Lotus en sistemas arroz-pastura; degradación eficiente de glifosato por inoculantes comerciales mejorados; mutaciones en RkpI asociadas a mayor contenido de nitrógeno en suelo; y plasticidad genómica y fisiológica de variantes comerciales de inoculantes de soja. En conjunto, estas publicaciones documentaron y validaron científicamente los principales avances del proyecto, aportando evidencia revisada por pares sobre los desarrollos microbiológicos, agronómicos, ambientales, regulatorios y tecnológicos alcanzados (Tabla 2).

Tabla 2. Producción científica de este proyecto en revistas con referato.

#	Título	Autores	Año	Revista	Link
1	Antifungal activity of marine-derived Paenibacillus sp. PNM200 against Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici, the causal agent of tomato vascular wilt	Vinchira et al.	2021	Biological Control	https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104501
2	CARACTERIZACIÓN FENO-GENOTÍPICA Y SIMBIÓTICA DE RIZOBIOS AISLADOS DE Desmanthus Virgatus (L.) WILLD. EN SUELOS DE LA PROVINCIA DE JUJUY (ARGENTINA)	Fornasero et al.	2021	FAVE Sección Ciencias Agrarias	https://doi.org/10.14409/fa.v20i1.10268

#	Título	Autores	Año	Revista	Link
3	Genome sequence of Bradyrhizobium yuanmingense strain P10 130, a highly efficient nitrogen-fixing bacterium that could be used for Desmodium incanum inoculation	Toniutti et al.	2021	Gene	https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145267
4	Whole-Genome Resequencing of Spontaneous Oxidative Stress-Resistant Mutants Reveals an Antioxidant System of Bradyrhizobium japonicum Involved in Soybean Colonization	Liebrenz et al.	2021	Microbial Ecology	https://doi.org/10.1007/s00248-021-01925-2
5	Multiple ways to evade the bacteriostatic action of glyphosate in rhizobia include the mutation of the conserved serine 90 of the nitrogenase subunit NifH to alanine	Liebrenz et al.	2022	Research in Microbiology	https://doi.org/10.1016/j.resmic.2022.103952
6	A synthesis of functional contributions of rhizobacteria to growth promotion in diverse crops	Brambilla et al.	2022	Rhizosphere	https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100611
7	Subfunctionalization probably drives the emergence of plant growth-promoting genes	Frare et al.	2022	Symbiosis	https://doi.org/10.1007/s13199-022-00872-x
8	Analysis of the contribution of Lotus corniculatus to soil carbon content in a rice-pasture rotation system	Maguire et al.	2022	Agriculture, Ecosystems & Environment	https://doi.org/10.1016/j.agee.2022.108159
9	Genomics and transcriptomics insights into luteolin effects on the beta-rhizobial strain Cupriavidus necator UYPR2.512	Rodríguez-Esperón et al.	2022	Environmental Microbiology	https://doi.org/10.1111/1462-2920.15845

#	Título	Autores	Año	Revista	Link
10	Paenibacillus sp. Strain UY79, Isolated from a Root Nodule of Arachis villosa, Displays a Broad Spectrum of Antifungal Activity	Costa et al.	2022	Applied and environmental microbiology	ttps://doi.org/10.1128/AEM.01645-21
11	Diversity, Genomics and Symbiotic Characteristics of Sinorhizobia That Nodulate Desmanthus spp. in Northwest Argentina	Zuber et al.	2023	Biology	https://doi.org/10.3390/biology12070958
12	Nodulation in the absence of nod genes induction: alternative mechanisms involved in the symbiotic interaction between Cupriavidus sp. UYMMa02A and Mimosa pudica	Rodríguez-Esperón et al.	2023	Environmental Sustainability	https://doi.org/10.1007/s42398-023-00286-5
13	Diversity of Bradyrhizobium strains that nodulate Lupinus species native to Uruguay.	Costa et al.	2023	Environmental Sustainability	https://doi.org/10.1007/s42398-023-00263-y
14	Oligopeptide uptake improves oxidative stress resistance and nodulation competitiveness in soybean rhizobia	Brambilla et al.	2023	Rhizosphere	https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2023.100823
15	Exploring the cooperation between nitrogen-fixing and non-fixing alfalfa rhizobia	Brambilla et al.	2024	Symbiosis	https://doi.org/10.1007/s13199-024-01007-0
16	Genome editing of soybean inoculant using CRISPR/Cas9 system: enhancing agricultural sustainability	Serantes et al.	2024	Plant Cell, Tissue and Organ Culture	https://doi.org/10.1007/s11240-024-02764-y

#	Título	Autores	Año	Revista	Link
17	Exploring the relationship of potential new rhizobacteria metabolism with Lotus spp. performance in a rice-pasture rotation system	Maguire et al.	2025	Symbiosis	https://doi.org/10.1007/s13199-025-01088-5
18	Engineering a commercial soybean inoculant to efficiently degrade glyphosate	Brambilla et al.	2025	Rhizosphere	https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2025.101109
19	K512R mutation in the capsule biosynthesis regulator RkpI of the commercial nitrogen-fixing alfalfa inoculant Sinorhizobium meliloti B399 improves soil nitrogen content	Brambilla et al.	2025	Symbiosis	https://doi.org/10.1007/s13199-025-01099-2
20	Genomic and physiological plasticity in natural variants of commercial soybean inoculants supports the non-GMO status of base-edited inoculants	Cardillo et al.	2025	Plant Cell, Tissue and Organ Culture	https://doi.org/10.1007/s11240-025-03059-6

Producto 11. Presentación de prototipos

Los prototipos desarrollados en el proyecto fueron presentados en distintas instancias científicas, tecnológicas, institucionales y productivas. Estas actividades permitieron visibilizar los avances ante actores del sector agrícola y explorar oportunidades de transferencia y escalamiento. En América Latina, los prototipos fueron presentados en las Reuniones Latinoamericanas de Rizobiología realizadas en Pereira, Colombia, en 2023, y en La Plata, Argentina, en 2025. En estas reuniones participaron organismos ejecutores, co-ejecutores y asociados del proyecto, así como empresas regionales y multinacionales del sector agrícola (**Fig.** 45).



Fig. 45. En RELAR 2023 (panel izquierdo) y 2025 (panel derecho) los prototipos desarrollados por todos los organismos participantes fueron presentados a empresas del sector agrícola de importancia regional y de relevancia multinacional (https://drive.google.com/file/d/1ldoK4HczHl3UJG7bCEiUYZHw_km3nctr/view; https://relar2025.alaronline.org/; https://alaronline.org/relar-2025/).

En Europa, los prototipos de inoculantes para leguminosas fueron presentados en el 27th European Nitrogen Cycle Meeting, realizado en Granada, España, en 2024, y en el 4th World Alfalfa Congress, realizado en Reims, Francia, en 2025. Estas presentaciones permitieron comunicar los avances del proyecto ante actores científicos y productivos vinculados con el ciclo del nitrógeno, la alfalfa y los bioinsumos de alcance regional y global (**Fig.** 46).



Fig. 46. En NITROGEN2024 (panel izquierdo) y WORLD ALFALFA CONGRESS 2025 (panel derecho) los prototipos desarrollados por el CSIC y el INTA fueron presentados a empresas del sector agrícola con presencia en mercados regionales y global (https://nitrogen2024.es/; https://world-alfalfa-congress.com/)

Como estrategia complementaria, los investigadores del proyecto participaron en eventos de ciencia y tecnología, como CITA e INNOVAR, y difundieron los avances mediante medios de comunicación masiva. Estas actividades contribuyeron a acercar los beneficios económicos y ambientales de los prototipos a públicos más amplios, incluyendo actores del sistema científico-tecnológico, empresas, productores y sociedad en general (**Fig.** 47).







Fig. 47. Ejemplos de las participaciones de los investigadores de este proyecto en eventos alternativos de ciencia y tecnología (panel superior) y de difusión masiva (panel inferior) de los beneficios económicos de los prototipos desarrollados.
https://www.youtube.com/watch?v=vxf9sJ24dtM&t=166s
https://www.lanacion.com.ar/economia/campo/primero-en-el-mundo-un-equipo-de-cientificos-descubrio-como-aumentar-hasta-un-6-la-productividad-de-nid04082025/

Finalmente, los inoculantes editados desarrollados en el marco del proyecto fueron presentados a los directorios de Agricultores Federados Argentinos (AFA) SCL y de Innovaciones Tecnológicas Agropecuarias (INTEA) en noviembre y diciembre de 2025. Estas reuniones permitieron discutir su potencial de escalamiento productivo, inserción comercial, validación pre-comercial y adecuación a los marcos regulatorios vigentes. Actualmente se trabaja en la redacción de convenios de vinculación tecnológica con AFA e INTEA para avanzar en el licenciamiento de la tecnología desarrollada (**Fig.** 48).



Fig. 48. La presentación de prototipos a las máximas autoridades de AFA scl (nov-2025) e INTEA (dic-2025) contó con la presencia del presidente del INTA, el Ing. Nicolás Bronzovich.

Producto 12. Base de datos sobre los nuevos inoculantes producidos en ALC

El producto asociado a la base de datos evolucionó desde un enfoque originalmente descriptivo hacia una herramienta dinámica de gestión del conocimiento, capaz de integrar información científica, genómica, fenotípica, productiva y regulatoria. Como punto de partida, se realizó una revisión integral de microorganismos de importancia agroindustrial, publicada en una revista científica de alto impacto, que sirvió como base para la organización inicial de la información sobre bioinsumos microbianos (**Fig.** 49).



Rhizosphere 24 (2022) 100611

Contents lists available at ScienceDirect

Rhizosphere

journal homepage: www.elsevier.com/locate/rhisph

A synthesis of functional contributions of rhizobacteria to growth promotion in diverse crops

Silvina Brambilla [a,b,**], Margarita Stritzler [a,b], Gabriela Soto [a,b], Nicolas Ayub [a,b,*]

[a] Instituto de Genética Ewald A. Favret, (INTA), Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABiMO), CONICET-INTA, Buenos Aires, Argentina
[b] Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), CABA, Argentina

ARTICLE INFO

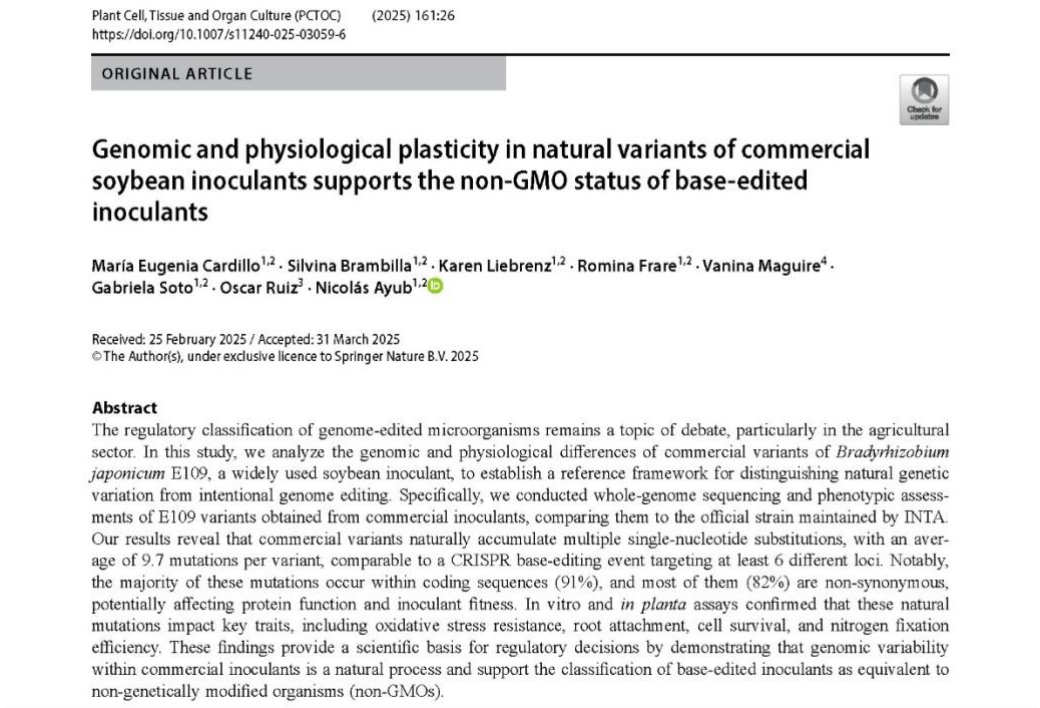
Keywords:
Plant
Microorganisms
PGPM
Sustainable agriculture
Crop productivity

ABSTRACT

The endophytic microbes are known to live asymptomatically inside their host and play crucial roles in the growth, development, fitness, and diversification of plants. The plant-endophyte association ranges from mutualism to pathogenicity helping the host to combat a diverse array of biotic and abiotic stressful conditions, thus reducing the impact of chemical fertilizers on the environment. The present review is focused on the role of plant growth-promoting bacteria in sustainable production of legume and non-legume crops. Specifically, we described the inoculants used in the production of soybean (*Glycine max*), alfalfa (*Medicago sativa*), common bean (*Phaseolus vulgaris*), subclover (*Trifolium subterraneum*), different *Lotus* species, yellow lupin (*Lupinus luteus*), white carob tree (*Prosopis alba*), rice (*Oryza sativa*), maize (*Zea mays*), wheat (*Triticum aestivum*), quinoa (*Chenopodium quinoa*), tomato (*Solanum lycopersicum*), guinea grass (*Megathyrsus maximus*) and canola (*Brassica napus*) in South America.

Fig. 49. Portada de la revisión integral de los microorganismos de importancia agroindustrial (https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100611) que dio origen a la generación de una nueva base de datos (https://strapi-fontagro.nyc3.cdn.digitaloceanspaces.com/platform_documents/projects/1788176215743_es-18786_-_Producto_12_-_Base_de_datos__Apr_.pdf).

A medida que avanzó el proyecto, se evidenció que una base de datos estática resultaba insuficiente para capturar la diversidad genética, fenotípica y regulatoria de los inoculantes desarrollados, especialmente aquellos obtenidos mediante edición génica. Por ello, se avanzó hacia una caracterización más profunda de la variabilidad natural existente entre inoculantes comerciales considerados equivalentes. Estos estudios fueron integrados en una publicación científica que analizó la plasticidad genómica y fisiológica de variantes comerciales de un inoculante de soja (**Fig.** 50).



Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) (2025) 161:26
https://doi.org/10.1007/s11240-025-03059-6

ORIGINAL ARTICLE

Genomic and physiological plasticity in natural variants of commercial soybean inoculants supports the non-GMO status of base-edited inoculants

María Eugenia Cardillo[1,2] · Silvina Brambilla[1,2] · Karen Liebrenz[1,2] · Romina Frare[1,2] · Vanina Maguire[4] · Gabriela Soto[1,2] · Oscar Ruiz[3] · Nicolás Ayub[1,2]

Received: 25 February 2025 / Accepted: 31 March 2025
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2025

Abstract
The regulatory classification of genome-edited microorganisms remains a topic of debate, particularly in the agricultural sector. In this study, we analyze the genomic and physiological differences of commercial variants of *Bradyrhizobium japonicum* E109, a widely used soybean inoculant, to establish a reference framework for distinguishing natural genetic variation from intentional genome editing. Specifically, we conducted whole-genome sequencing and phenotypic assessments of E109 variants obtained from commercial inoculants, comparing them to the official strain maintained by INTA. Our results reveal that commercial variants naturally accumulate multiple single-nucleotide substitutions, with an average of 9.7 mutations per variant, comparable to a CRISPR base-editing event targeting at least 6 different loci. Notably, the majority of these mutations occur within coding sequences (91%), and most of them (82%) are non-synonymous, potentially affecting protein function and inoculant fitness. In vitro and *in planta* assays confirmed that these natural mutations impact key traits, including oxidative stress resistance, root attachment, cell survival, and nitrogen fixation efficiency. These findings provide a scientific basis for regulatory decisions by demonstrating that genomic variability within commercial inoculants is a natural process and support the classification of base-edited inoculants as equivalent to non-genetically modified organisms (non-GMOs).

Fig. 50. Portada del estudio genómico y fenotípico de inoculantes comerciales que sirvió como antecedente crítico para justificar la posterior aceptación de los inoculantes editados como non-GMO por la CONABIA (https://doi.org/10.1007/s11240-025-03059-6).

Los análisis comparativos de secuenciación genómica completa, ensayos in vitro y evaluaciones en planta demostraron que microorganismos comercializados como un mismo inoculante acumulan naturalmente mutaciones puntuales a lo largo del tiempo. Muchas de estas mutaciones se localizaron en regiones codificantes, fueron no sinónimas y tuvieron efectos funcionales sobre caracteres como tolerancia al estrés oxidativo, supervivencia bacteriana, colonización radicular y fijación biológica de nitrógeno. Esta evidencia permitió establecer un marco objetivo para comparar la variabilidad natural con las modificaciones puntuales introducidas mediante edición génica de precisión.

En paralelo, se generó documentación técnica para la evaluación regulatoria de un inoculante editado. Esta documentación incluyó la caracterización detallada del microorganismo, la estrategia molecular utilizada, la modificación puntual introducida, la evaluación fenotípica del rasgo buscado y la demostración de ausencia de nuevas combinaciones de material genético en el producto final. La verificación se realizó mediante curado del vector de edición, PCR específicas y secuenciación genómica completa. Con esta información, la CONABIA concluyó que el microorganismo desarrollado no contiene una nueva combinación de material genético y, por lo tanto, no se encuentra alcanzado por la normativa aplicable a organismos genéticamente modificados. Este dictamen permitió clasificar al producto como material no regulado o non-GMO (**Fig.** 51).



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
AÑO DE LA RECONSTRUCCIÓN DE LA NACIÓN ARGENTINA

Nota

Número: NO-2025-94788946-APN-DNB#MEC

CIUDAD DE BUENOS AIRES
Miércoles 27 de Agosto de 2025

Referencia: - EX -2025-48587497-APN-DNB#MEC. INTA. Bioinoculante BJ24 (Bradyrhizobium japonicum E109).

A: Juan Gentile (GGC#INTA),

Con Copia A:

De mi mayor consideración:

En relación a la Instancia de Consulta Previa (ICP) presentada ante la Coordinación de Innovación y Biotecnología bajo el expediente N° 48587497/2025 para la obtención del organismo *Bradyrhizobium japonicum* E109 con incremento en la competitividad de nodulación y en la eficiencia de promoción del crecimiento vegetal, a través de la tecnología de edición génica mediante el sistema CRISPR/Cas, se le informa que la CONABIA procedió a su evaluación y consideró que dicho producto no contiene una nueva combinación de material genético.

Por tal motivo el producto, tal como fue descrito en la ICP remitida, no se encuentra alcanzado por la Resolución N°763/11 del entonces Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, pudiendo ser manejado como material no regulado.

Sin otro particular saluda atte.

Fig. 51. Resolución de la CONABIA, Argentina, determinando que los productos generados en

este proyecto por edición génica son considerados como material no regulado (*non-GMO).*

La disponibilidad de esta resolución regulatoria permitió extender la validación empírica de la eficacia del inoculante editado en el territorio sojero argentino, mediante ensayos realizados por el INTA y un potencial adoptante, AFA SCL, en localidades que abarcan desde el sur de la provincia de Buenos Aires hasta Salta (**Fig.** 52).



Fig. 52. En este mapa de Argentina se encuentran resaltadas las localidades donde se está evaluando la eficacia del nuevo inoculante editado para soja, en estaciones experimentales propias del organismo ejecutor (INTA) así como en localidades propias del posible adoptante (AFA scl).

En conjunto, este producto consolidó la base de datos como un insumo vivo de gestión del conocimiento, con valor científico, productivo y regulatorio para el desarrollo de nuevas generaciones de inoculantes en América Latina y el Caribe.

Indicadores Técnicos

Durante la ejecución del proyecto se alcanzaron indicadores técnicos vinculados con el diagnóstico ambiental de inoculantes, el mejoramiento genético microbiano, la reducción de emisiones de óxido nitroso, la evaluación agronómica de cepas mejoradas, la ampliación del uso de bioinsumos, la incorporación de nuevos microorganismos, la comunicación científica y la transferencia tecnológica. Se secuenciaron y analizaron genomas de inoculantes comerciales y regionales utilizados en cultivos de importancia para América Latina y el Caribe, identificando cepas con distinto potencial de producción y degradación de N_2O. Este diagnóstico permitió priorizar inoculantes de soja y alfalfa como blancos principales de mejoramiento ambiental. Se obtuvieron mutantes espontáneas y editadas en genes asociados a la desnitrificación, incluyendo alteraciones en napA y napC. En inoculantes de soja editados mediante CRISPR/Cas9, el 36% de los clones evaluados mostró reducción marcada de la actividad nitrato reductasa. Se validaron cepas con reducción significativa de emisión de N_2O. En rizobios de alfalfa se observaron disminuciones de aproximadamente dos órdenes de magnitud, mientras que en rizobios de soja editados en napA se alcanzó una reducción cercana al 90% respecto de la cepa parental. Se identificaron cepas mejoradas que mantuvieron o incrementaron su actividad promotora del crecimiento vegetal. En alfalfa, mutantes de baja emisión conservaron productividad y nodulación equivalentes al inoculante comercial. En soja, cepas como GR5 y MGD1 mostraron mejoras o ventajas funcionales asociadas a productividad, contenido de nitrógeno, tolerancia a glifosato y desempeño bajo estrés. Se amplió el uso de cinco microorganismos beneficiosos hacia nuevos cultivos o aplicaciones: Azospirillum brasilense Az39, Paenibacillus sp. UY79, Mesorhizobium loti R17/RIZ17, Paenibacillus sp. PNM200 y Penicillium sp. HC1. Estos microorganismos mostraron actividad promotora del crecimiento vegetal, control biológico, mejora del contenido de nitrógeno o degradación de residuos vegetales. Se incorporaron nuevos microorganismos con potencial como inoculantes para cultivos regionales, forrajeros y cereales, incluyendo Ensifer sp. 8L12.1 para Desmanthus virgatus, Cupriavidus sp. UYMMa02A para Mimosa pudica, 109 aislamientos de Bradyrhizobium asociados a Lupinus spp., Bacillus sp. UY6A con actividad antifúngica en soja, y cepas promotoras del crecimiento de trigo y avena. Se desarrollaron cepas derivadas del inoculante comercial de soja Bradyrhizobium japonicum E109 con tolerancia a glifosato, estrés oxidativo y mayor competitividad simbiótica. Se obtuvieron más de 50 cepas tolerantes a glifosato, se seleccionaron mutantes funcionales GR1-GR5, y se caracterizaron cepas como glxA, MGD1 y AK por su mejor desempeño frente a limitantes productivas. Se generaron 20 publicaciones científicas con referato vinculadas a los resultados del proyecto, cubriendo aspectos de microbiología agrícola, inoculantes, fijación biológica de nitrógeno, edición génica, control biológico, tolerancia a estrés, degradación de glifosato, cooperación microbiana y regulación de inoculantes editados. Se realizaron actividades periódicas de coordinación, seminarios técnicos, capacitaciones, webinars, difusión en redes sociales y jornadas regionales,

con participación de más de 50 profesionales en instancias internas del proyecto, más de 20 profesionales en generación de material audiovisual y públicos técnicos, institucionales y productivos de distintos países de la región. Se presentaron prototipos tecnológicos ante actores científicos, productivos e institucionales en América Latina y Europa, incluyendo reuniones especializadas, congresos internacionales, eventos tecnológicos, empresas del sector agrícola y potenciales adoptantes. Asimismo, se avanzó en conversaciones de vinculación tecnológica con AFA SCL e INTEA. Se generó evidencia técnica y regulatoria que permitió obtener una resolución de CONABIA indicando que un inoculante editado desarrollado en el marco del proyecto no contiene una nueva combinación de material genético y puede ser considerado material no regulado o non-GMO. Este hito permitió avanzar en la validación territorial del inoculante editado en distintas localidades de la región sojera argentina.

Hallazgos Destacados

El proyecto demostró que inoculantes comerciales ampliamente utilizados en soja y alfalfa pueden contribuir a la emisión de óxido nitroso debido a su dotación genética de desnitrificación, pero también que ese impacto puede reducirse drásticamente mediante mejoramiento genético microbiano. En particular, se desarrollaron mutantes espontáneas y cepas editadas mediante CRISPR/Cas9 con menor actividad nitrato reductasa, logrando reducciones de emisión de N_2O de aproximadamente dos órdenes de magnitud en rizobios de alfalfa y cercanas al 90% en rizobios de soja, sin comprometer necesariamente su desempeño agronómico. Además, el proyecto mostró que la mejora ambiental de los inoculantes puede integrarse con mejoras productivas y tecnológicas más amplias, incluyendo mayor tolerancia a glifosato, resistencia al estrés oxidativo, mejor competitividad simbiótica, ampliación del uso de microorganismos beneficiosos en nuevos cultivos e incorporación de nuevos inoculantes regionales. Un hallazgo especialmente relevante fue la generación de evidencia técnica y regulatoria que permitió clasificar un inoculante editado como material no regulado o non-GMO en Argentina, estableciendo un precedente estratégico para el desarrollo y transferencia de bioinsumos editados en América Latina y el Caribe

Historias en el campo

Una de las experiencias más destacadas del proyecto fue la validación agronómica de mutantes derivadas de inoculantes comerciales de alfalfa y soja con menor potencial de emisión de N_2O. Tradicionalmente existía la preocupación de que una reducción en la actividad de desnitrificación pudiera afectar negativamente la capacidad simbiótica de los rizobios. Sin embargo, los ensayos realizados demostraron que varias de las cepas mejoradas mantuvieron niveles de productividad, nodulación y acumulación de nitrógeno equivalentes o superiores a los inoculantes comerciales originales. Estos resultados constituyeron una prueba de concepto de que es posible desarrollar inoculantes climáticamente inteligentes sin sacrificar eficacia agronómica.

Otra experiencia relevante fue la identificación y evaluación de nuevos microorganismos para cultivos y sistemas productivos poco explorados. En particular, la cepa Mesorhizobium sp. RIZ17 mostró una elevada capacidad para mejorar el crecimiento y el contenido de nitrógeno de Lotus corniculatus en sistemas arroz-pastura, mientras que otros microorganismos demostraron potencial para el control biológico de enfermedades en tomate, la promoción del crecimiento en alfalfa y la degradación de residuos vegetales. Estos resultados evidenciaron el valor de la biodiversidad microbiana regional como fuente de nuevas tecnologías para una agricultura más sostenible.

Finalmente, uno de los hitos más significativos fue la transición de los desarrollos obtenidos desde el laboratorio hacia escenarios reales de adopción. La obtención de un dictamen regulatorio que clasificó a un inoculante editado como material no regulado (non-GMO) permitió avanzar hacia su evaluación en una amplia red de localidades distribuidas a lo largo de la región sojera argentina. Paralelamente, la presentación de los prototipos ante empresas, cooperativas y potenciales adoptantes abrió nuevas oportunidades de transferencia tecnológica, consolidando el vínculo entre investigación científica, regulación y aplicación productiva.

Discusión

Los resultados obtenidos durante la ejecución del proyecto permitieron avanzar simultáneamente en el mejoramiento ambiental, productivo y tecnológico de los inoculantes agrícolas utilizados en América Latina y el Caribe. A continuación, se discuten los principales hallazgos en función de los tres componentes del proyecto, contrastándolos con antecedentes científicos previamente publicados y analizando su relevancia para el desarrollo de bioinsumos climáticamente inteligentes.

Componente 1. Mejoramiento ecológico de los inoculantes

Los resultados obtenidos demuestran que los inoculantes agrícolas actualmente utilizados en América Latina y el Caribe presentan perfiles genómicos contrastantes respecto de la desnitrificación y, por lo tanto, distintos potenciales de emisión de N_2O. La identificación de cepas comerciales de soja y alfalfa que conservan genes asociados a la producción de N_2O, pero carecen de genes funcionales para su reducción, coincide con observaciones previas realizadas en rizobios de importancia agronómica (Brambilla et al., 2018; Obando et al., 2022). Estos resultados refuerzan la necesidad de incorporar criterios ambientales en la selección y evaluación de inoculantes, complementando los criterios tradicionales basados exclusivamente en productividad. La reducción de la actividad nitrato reductasa mediante mutaciones espontáneas y edición génica confirmó experimentalmente que la modificación de etapas tempranas de la desnitrificación constituye una estrategia eficiente para disminuir la emisión de N_2O. La reducción observada en rizobios de alfalfa y soja es consistente con el rol central que poseen los complejos NAP en el flujo de nitrógeno hacia la formación de N_2O (Philippot et al., 2007; Brambilla et al., 2020). Asimismo, los resultados obtenidos mediante CRISPR/Cas9 demuestran que la edición génica puede acelerar el mejoramiento de inoculantes comerciales sin necesidad de reemplazar cepas ya adaptadas a procesos industriales y agronómicos. Un aspecto particularmente relevante fue comprobar que la reducción de emisiones no necesariamente implica una pérdida de eficacia agronómica. Varias de las cepas obtenidas conservaron niveles de productividad y nodulación comparables a los inoculantes originales, mientras que algunas mutaciones incluso generaron mejoras adicionales en parámetros vinculados a la nutrición nitrogenada. Estos resultados sugieren que la mitigación de emisiones y la productividad agrícola no constituyen objetivos incompatibles, sino que pueden abordarse de manera integrada mediante estrategias racionales de mejoramiento microbiano.

Componente 2. Mejoramiento económico de los inoculantes

La extensión de uso de microorganismos previamente caracterizados y la incorporación de nuevos inoculantes permitieron ampliar significativamente la base tecnológica disponible para distintos sistemas productivos de la región. Los resultados obtenidos en alfalfa, Lotus, tomate,

cereales y cultivos regionales coinciden con estudios que destacan la importancia de la biodiversidad microbiana como fuente de nuevas funciones agronómicas, incluyendo promoción del crecimiento vegetal, control biológico, reciclado de nutrientes y mejora de la fertilidad de los suelos (Vessey, 2003; Glick, 2012). La obtención de cepas con tolerancia a glifosato, estrés oxidativo y mayor competitividad simbiótica representa otro avance relevante. Diversos trabajos han demostrado que el glifosato puede afectar negativamente la fijación biológica de nitrógeno y la eficacia de los rizobios asociados a soja (Fan et al., 2017; Liebrenz et al., 2022). En este contexto, las mutaciones identificadas en este proyecto permiten mejorar la adaptación de los inoculantes a condiciones productivas reales, caracterizadas por la aplicación frecuente de herbicidas y por la presencia de múltiples factores de estrés. Asimismo, los resultados asociados a los mutantes resistentes al estrés oxidativo aportan evidencia sobre la importancia de los mecanismos antioxidantes durante la colonización radicular y la competencia por nodulación. La ventaja competitiva observada en las cepas mejoradas sugiere que la adaptación a condiciones de estrés puede constituir un criterio complementario para el desarrollo de inoculantes de próxima generación. En conjunto, estos resultados muestran que el mejoramiento de inoculantes puede orientarse simultáneamente a aumentar productividad, estabilidad y adaptación a las condiciones de campo.

Componente 3. Gestión del conocimiento, comunicación y transferencia

La experiencia del proyecto demuestra que la generación de innovaciones en bioinsumos requiere integrar investigación científica, comunicación, regulación y transferencia tecnológica. La producción de veinte publicaciones científicas, la realización de actividades de capacitación, la participación en congresos internacionales y la presentación de prototipos permitieron transformar resultados experimentales en conocimiento accesible para distintos actores del sistema científico, productivo e institucional. Uno de los hallazgos más relevantes fue la generación de evidencia técnica y regulatoria para la evaluación de inoculantes editados. La demostración de que una modificación puntual obtenida mediante edición génica puede generar microorganismos funcionalmente mejorados sin incorporar nuevas combinaciones de material genético constituye un antecedente de importancia para el desarrollo futuro de bioinsumos. Este resultado se encuentra alineado con las tendencias regulatorias observadas en distintos países que diferencian productos editados de organismos transgénicos tradicionales cuando no existe incorporación estable de ADN exógeno (Wolt et al., 2016; Lassoued et al., 2021). Finalmente, el proyecto contribuyó a fortalecer capacidades regionales en microbiología agrícola, edición génica, evaluación agronómica y transferencia tecnológica. La articulación entre instituciones de distintos países permitió compartir recursos, metodologías y experiencias, consolidando una plataforma regional para el desarrollo de inoculantes climáticamente inteligentes. En este sentido, los resultados obtenidos trascienden el desarrollo de cepas específicas y constituyen una base para futuras iniciativas orientadas a incrementar la productividad agrícola y reducir el impacto ambiental de los sistemas productivos de América Latina y el Caribe.

Conclusiones

Los resultados obtenidos durante la ejecución del proyecto permitieron cumplir los objetivos planteados originalmente y generar avances significativos en el desarrollo de inoculantes agrícolas más eficientes y ambientalmente sustentables. A continuación, se presentan las principales conclusiones organizadas según los tres componentes del proyecto, integrando los aspectos ecológicos, productivos, científicos, regulatorios y de transferencia tecnológica alcanzados.

Componente 1. Mejoramiento ecológico de los inoculantes. El proyecto permitió identificar inoculantes comerciales y regionales con distinto potencial de producción y degradación de N_2O, estableciendo una base objetiva para priorizar estrategias de mejoramiento ambiental. La generación de mutantes espontáneas y cepas editadas en genes asociados a la desnitrificación demostró que es posible reducir significativamente las emisiones de N_2O mediante el mejoramiento genético microbiano. Asimismo, se comprobó que varias de las cepas de baja emisión conservaron niveles adecuados de productividad, nodulación y fijación biológica de nitrógeno, demostrando que la mitigación de emisiones y la eficacia agronómica pueden integrarse en una misma tecnología.

Componente 2. Mejoramiento económico de los inoculantes. La ampliación del uso de microorganismos beneficiosos hacia nuevos cultivos y aplicaciones, junto con la incorporación de nuevos inoculantes regionales, permitió diversificar la base tecnológica disponible para América Latina y el Caribe. Los resultados obtenidos demostraron que la biodiversidad microbiana regional constituye una fuente valiosa de innovaciones para mejorar productividad, nutrición vegetal, control biológico y sostenibilidad de los sistemas agropecuarios. Además, el desarrollo de cepas con mayor tolerancia a glifosato, estrés oxidativo y otras limitantes productivas confirmó que es posible generar inoculantes con mayor adaptación a las condiciones reales de campo sin comprometer su actividad promotora del crecimiento vegetal.

Componente 3. Gestión del conocimiento, comunicación y transferencia. El proyecto fortaleció las capacidades regionales en microbiología agrícola, edición génica, evaluación agronómica y transferencia tecnológica mediante una intensa actividad de coordinación, capacitación, difusión y producción científica. La generación de veinte publicaciones científicas, la presentación de prototipos en ámbitos académicos y productivos, y la interacción con potenciales adoptantes contribuyeron a aumentar la visibilidad e impacto de los desarrollos obtenidos. Finalmente, la obtención de evidencia regulatoria que permitió clasificar un inoculante editado como material no regulado (non-GMO) constituye un antecedente estratégico para acelerar la adopción de nuevas generaciones de bioinsumos en América Latina y el Caribe.

Recomendaciones

Los resultados obtenidos indican que los criterios ambientales deberían incorporarse de manera sistemática en los programas de selección y evaluación de inoculantes agrícolas. En particular, se recomienda incluir análisis genómicos y funcionales de genes asociados a la desnitrificación y a la emisión de N_2O como parte de los procesos de caracterización de nuevas cepas, complementando los criterios tradicionales centrados exclusivamente en productividad y fijación biológica de nitrógeno.

Asimismo, se recomienda profundizar las actividades de validación agronómica de los inoculantes mejorados en una mayor diversidad de ambientes, cultivos y condiciones productivas de América Latina y el Caribe. Los resultados obtenidos sugieren que el mejoramiento de la tolerancia a glifosato, al estrés oxidativo y a otros factores limitantes puede contribuir significativamente a incrementar la estabilidad y eficacia de los inoculantes bajo condiciones reales de producción. Del mismo modo, resulta conveniente continuar explorando la biodiversidad microbiana regional como fuente de nuevos microorganismos con funciones de promoción del crecimiento vegetal, control biológico y sostenibilidad agrícola.

Finalmente, se recomienda fortalecer las acciones de articulación entre investigación, regulación y sector productivo para facilitar la transferencia de las tecnologías desarrolladas. La experiencia obtenida durante el proyecto demuestra que la generación temprana de evidencia científica y regulatoria puede acelerar los procesos de adopción de nuevas tecnologías. En este sentido, los avances alcanzados con inoculantes editados constituyen una oportunidad para promover marcos regulatorios basados en evidencia científica y favorecer el desarrollo de bioinsumos innovadores en la región.

Referencias Bibliográficas

Akiyama, H., Hoshino, Y. T., Itakura, M., Shimomura, Y., Wang, Y., Yamamoto, A., Tago, K., Nakajima, Y., Minamisawa, K., & Hayatsu, M. (2016). Mitigation of soil N2O emission by inoculation with a mixed culture of indigenous Bradyrhizobium diazoefficiens. Scientific Reports, 6, 32869. https://doi.org/10.1038/srep32869

Brambilla, S., Frare, R., Soto, G., Jozefkowicz, C., & Ayub, N. (2018). Absence of the nitrous oxide reductase gene cluster in commercial alfalfa inoculants is probably due to the extensive loss of genes during rhizobial domestication. Microbial Ecology, 76(2), 299–302. https://doi.org/10.1007/s00248-018-1145-9

Brambilla, S., Soto, G., Odorizzi, A., Arolfo, V., McCormick, W., Primo, E., Giordano, W., Jozefkowicz, C., & Ayub, N. (2020). Spontaneous mutations in the nitrate reductase gene napC drive the emergence of eco-friendly low-N2O-emitting alfalfa rhizobia in regions with different climates. Microbial Ecology, 79(4), 1044–1053. https://doi.org/10.1007/s00248-019-01473-w

Brambilla, S., Stritzler, M., Soto, G., & Ayub, N. (2022). A synthesis of functional contributions of rhizobacteria to growth promotion in diverse crops. Rhizosphere, 24, 100611. https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100611

Brambilla, S., Liebrenz, K., Frare, R., Gomez, C., Stritzler, M., Soto, G., & Ayub, N. (2023). Oligopeptide uptake improves oxidative stress resistance and nodulation competitiveness in soybean rhizobia. Rhizosphere, 28, 100823. https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2023.100823

Brambilla, S., Liebrenz, K., Odorizzi, A., et al. (2024). Exploring the cooperation between nitrogen-fixing and non-fixing alfalfa rhizobia. Symbiosis, 93, 281–284. https://doi.org/10.1007/s13199-024-01007-0

Brambilla, S., Pascuan, C., Frare, R., Liebrenz, K., Pesquero, N., Ruiz, M. J., Soto, G., Cristos, D., & Ayub, N. (2025). Engineering a commercial soybean inoculant to efficiently degrade glyphosate. Rhizosphere, 34, 101109. https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2025.101109

Brambilla, S., Serantes, L., Pascuan, C., Cardillo, M. E., Odorizzi, A., Peric Prugna, A., Arolfo, V., Padula, G., Gortari, M., Ruiz, O., Soto, G., & Ayub, N. (2025). K512R mutation in the capsule biosynthesis regulator RkpI of the commercial nitrogen-fixing alfalfa inoculant Sinorhizobium meliloti B399 improves soil nitrogen content. Symbiosis. https://doi.org/10.1007/s13199-025-01099-2

Cardillo, M. E., Brambilla, S., Liebrenz, K., Frare, R., Maguire, V., Soto, G., Ruiz, O., & Ayub, N. (2025). Genomic and physiological plasticity in natural variants of commercial soybean inoculants supports the non-GMO status of base-edited inoculants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 161, 26. https://doi.org/10.1007/s11240-025-03059-6

Costa, A., Corallo, B., Amarelle, V., Stewart, S., Pan, D., Tiscornia, S., & Fabiano, E. (2022). Paenibacillus sp. strain UY79, isolated from a root nodule of Arachis villosa, displays a broad spectrum of antifungal activity. Applied and Environmental Microbiology, 88, e01645-21. https://doi.org/10.1128/AEM.01645-21

Costa, A., Panzera, M., Roldán, D. M., et al. (2023). Diversity of Bradyrhizobium strains that nodulate Lupinus species native to Uruguay. Environmental Sustainability, 6, 195–211. https://doi.org/10.1007/s42398-023-00263-y

Fan, L., Feng, Y., Weaver, D. B., Delaney, D. P., Wehtje, G. R., & Wang, G. (2017). Glyphosate effects on symbiotic nitrogen fixation in glyphosate-resistant soybean. Applied Soil Ecology, 121, 11–19.

Fornasero, L. V., et al. (2021). Caracterización feno-genotípica y simbiótica de rizobios aislados de Desmanthus virgatus (L.) Willd. en suelos de la provincia de Jujuy (Argentina). FAVE Sección Ciencias Agrarias. https://doi.org/10.14409/fa.v20i1.10268

Frare, R., Mozzicafreddo, M., Gomez, C., et al. (2022). Subfunctionalization probably drives the emergence of plant growth-promoting genes. Symbiosis, 87, 249–253. https://doi.org/10.1007/s13199-022-00872-x

Liebrenz, K., Gómez, C., Brambilla, S., Frare, R., Stritzler, M., Maguire, V., Ruiz, O., Soldini, D., Pascuan, C., Soto, G., & Ayub, N. (2021). Whole-genome resequencing of spontaneous oxidative stress-resistant mutants reveals an antioxidant system of Bradyrhizobium japonicum involved in soybean colonization. Microbial Ecology. https://doi.org/10.1007/s00248-021-01925-2

Liebrenz, K., Frare, R., Gómez, C., Pascuan, C., Brambilla, S., Soldini, D., Maguire, V., Carrio, A., Ruiz, O., McCormick, W., Soto, G., & Ayub, N. (2022). Multiple ways to evade the bacteriostatic action of glyphosate in rhizobia include the mutation of the conserved serine 90 of the nitrogenase subunit NifH to alanine. Research in Microbiology, 173, 103952. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2022.103952

Maguire, V. G., Rodríguez, A. A., Ezquiaga, J. P., Salas, N., Gortari, M., Ayub, N., Bouilly, P. J., Romero, F. M., Gárriz, A., & Ruiz, O. A. (2022). Analysis of the contribution of Lotus corniculatus to soil carbon content in a rice-pasture rotation system. Agriculture, Ecosystems & Environment, 340, 108159. https://doi.org/10.1016/j.agee.2022.108159

Maguire, V. G., Rodríguez, A. A., Alonso, A. M., Ezquiaga, J. P., Salas, N., Llames, M. E., Gortari, M., Ayub, N., Brambilla, S. M., Bouilly, P. J., Romero, F. M., Gárriz, A., & Ruiz, O. A. (2025). Exploring the relationship of potential new rhizobacteria metabolism with Lotus spp. performance in a rice-pasture rotation system. Symbiosis, 97, 139–155. https://doi.org/10.1007/s13199-025-01088-5

Monza, J., Irisarri, P., Díaz, P., Delgado, M. J., Mesa, S., & Bedmar, E. J. (2006). Denitrification ability of rhizobial strains isolated from Lotus sp. Antonie van Leeuwenhoek, 89, 479–484. https://doi.org/10.1007/s10482-005-9046-6

Obando, M., Antonelli, C., Casanave, S., Maguire, V., Torres, D., Pérez, G., Bailleres, M., Donadío, F., Creus, C., Videla, C., Puente, M., Zilli, J., Alves, B., Ruiz, O., Bedmar, E., & Cassán, F. (2022). Evaluation of nitrous oxide emission by soybean inoculated with Bradyrhizobium strains commonly used as inoculants in South America. Plant and Soil, 472, 311–328. https://doi.org/10.1007/s11104-021-05242-y

Rodríguez-Esperón, C., Sandes, L., Eastman, I., et al. (2023). Nodulation in the absence of nod genes induction: Alternative mechanisms involved in the symbiotic interaction between Cupriavidus sp. UYMMa02A and Mimosa pudica. Environmental Sustainability, 6, 383–401. https://doi.org/10.1007/s42398-023-00286-5

Serantes, L., Stritzler, M., Brambilla, S., Soto, G., & Ayub, N. (2024). Genome editing of soybean inoculant using CRISPR/Cas9 system: Enhancing agricultural sustainability. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 157, 35. https://doi.org/10.1007/s11240-024-02764-y

Toniutti, M. A., et al. (2021). Genome sequence of Bradyrhizobium yuanmingense strain P10 130, a highly efficient nitrogen-fixing bacterium that could be used for Desmodium incanum inoculation. Gene. https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145267

Vinchira-Villarraga, D. M., Castellanos, L., Moreno-Sarmiento, N., Suarez-Moreno, Z. R., & Ramos, F. A. (2021). Antifungal activity of marine-derived Paenibacillus sp. PNM200 against Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici, the causal agent of tomato vascular wilt. Biological Control, 154, 104501. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104501

Zuber, N. E., Fornasero, L. V., Erdozain Bagolín, S. A., Lozano, M. J., Sanjuán, J., Del Papa, M. F., & Lagares, A. (2023). Diversity, genomics and symbiotic characteristics of Sinorhizobia that nodulate Desmanthus spp. in Northwest Argentina. Biology, 12(7), 958. https://doi.org/10.3390/biology12070958

Instituciones participantes

















Secretaría Técnica Administrativa

FONTAGRO

Con el apoyo de:

BID
Banco Interamericano de Desarrollo

IICA

www.fontagro.org
Correo electrónico: fontagro@fontagro.org