



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES

Tesis para acceder al título de Doctor en Ciencias Biológicas

“Estrategias para mitigar la liberación de gases del efecto invernadero en el cultivo de soja [*Glycine max* L. (Merr.)] por la utilización de rizobacterias del género *Bradyrhizobium* y otras promotoras del crecimiento vegetal.”

“Strategies for mitigation of greenhouse gasses emissions from soybean crop [*Glycine max* L. (Merr.)] over the use of rhizobacteria of *Bradyrhizobium* genus and others Plant growth-promoting rhizobacteria”

BSc., MSc. DOLLY MELISSA OBANDO CASTELLANOS

DIRECTOR:

Dr. Fabricio Dario Cassán

CO-DIRECTOR:

Dr. Eulogio José Bedmar Gómez

Río Cuarto, Noviembre de 2018

COMISIÓN ASESORA

Nombre y apellido: Dra. **Melina Andrea Talano**

Lugar de trabajo: Departamento de Biología Molecular, Facultad de Cs.Exactas Físicoquímicas y Naturales - [UNRC] Universidad Nacional de Río Cuarto.

Nombre y apellido: Dr. **Sergio Alemán**

Lugar de trabajo: Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Cs.Exactas Físicoquímicas y Naturales - Universidad Nacional de Río Cuarto [UNRC].

Nombre y apellido: Dra. **Marisa Anahí Gómez**

Lugar de trabajo: Laboratorio de Microbiología Agrícola, Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur

AGRADECIMIENTOS

A mi Mami, por todas las horas que me acompañaste al teléfono, por todas tus oraciones, por los momentos en los que me hiciste reír cuando más lo necesité, por secarme las lágrimas a miles de kilómetros, por ser mi soporte todos estos años y animarme a terminar el doctorado. Gracias por todo tu amor y tu cariño. Yo no lo hubiera logrado sin ti y no me va a alcanzar la vida para agradecerte todo lo que haces por mí. ¡Te adoro, Madre amada!

A mi titi hermosa por ser tan linda hermana, por tus mensajes y tus historias, por hacerme parte de tu vida siempre. Eres la mejor hermana del mundo y de ahora en adelante vamos a compartir por todos los años que estuvimos lejos. ¡Te amo infinitamente!

A mi Padre, mi gordito, mi “Gorgojito Mayor”, que sepas que todo lo hice por mi Familia y especialmente por mi Madre y por ti. Así como leíste comedidamente mis dos tesis anteriores, te dejo esta última como un recuerdo de mi amor por ti. En cada momento y en cada viaje yo te sentí conmigo y estoy segura que la estás pasando de maravilla y por eso estoy feliz.
¡Te amo, Pa!

A mi Robert, mi parcero, mi negrito, mi cómplice, ¡El amor de mi vida! Gracias por todos estos años de paciencia, de viajes soñados, de llamadas interminables y sobre todo GRACIAS por haberme enseñado que juntos somos libres y felices. ¡Te amo!

A Fabricio Cassán, porque sin conocerme me diste tu voto de confianza, por toda tu gestión año tras año para que yo lograra cumplir con los objetivos de la tesis y pudiera escribir estas líneas para poderme graduar. Todas las experiencias me las llevo como el mejor aprendizaje para toda la vida ¡Mil Gracias por todo!

A la comisión de tesis doctoral: Melina Talano, Sergio Alemano y Marisa Gómez por su asesoría, su buena disposición y su aporte constructivo para darle forma y coherencia a la tesis.

A todos el equipo del Laboratorio de Microbiología de Suelos y de la Interacción Planta – Microorganismo (LFVIPM) por su colaboración. Especialmente a José Luis Gualpa por toda tu asesoría científica, incluso retrasando tus compromisos hiciste lo posible porque yo pudiera terminar. Muchas Gracias por eso.

A Eulogio Bedmar y a todo el equipo del laboratorio del metabolismo del nitrógeno de la EEZ en Granada (España) por su ayuda incondicional para que pudiera avanzar con la tesis y pasar momentos bonitos siempre.

A Oscar Ruíz y a todo su equipo de trabajo del IIB-INTECH (Chascomús), especialmente a Cristian Antonelli, Juan Pedro Ezquiaga y Matías Bailleres. A todos gracias por su valiosa y enorme ayuda en la última fase de mi proyecto.

A Cecilia Creus, Cecilia Videla y sus grupos de laboratorio en el INTA-Balcarce (Buenos Aires) por abrirme las puertas de sus laboratorios con la mejor disposición.

A mi amiga, Sheila Garcia: Gracias por tu amor, por tus consejos, por estar pendiente de mí desde cualquier latitud en la que estabas. Te quiero como a una hermana y agradezco a la vida que nuestra amistad se mantenga a pesar de la distancia. Te abrazo fuerte y te quiero amiga linda.

A mis amigos del alma: Jhon, Diana Arci, Diana H., Gil, Cynthia y Cata, por todos los momentos que pasamos, por las cenas Colombo-Suizo-Paraguay-Argentinas, por los viajes y las fiestas, por todos mis cumpleaños que celebramos muertos de risa. Ustedes fueron fundamentales con su buena energía para que yo pudiera hacer mi doctorado. ¡Los quiero mucho!

A Flor Sgarlatta, por la amistad de construimos y por ser una auténtica maestra en todo sentido. Te agradezco infinitamente por todos estos años compartidos y en donde yo esté te voy a esperar con los brazos abiertos.

A Sole Anzuay y a toda su familia por su amistad y su ayuda incondicional siempre. ¡Todo mi cariño y gratitud para Uds! ¡Los quiero mucho!

A Vani Maguire y Sheila Casanave, porque nuestra amistad y el cariño se quedan para toda la vida. Gracias por ayudarme cada una en lo que pudo, por todas las veces que renegamos y por los buenos momentos que pasamos siempre.

A Jesús Chacón y a mi Pastelito, mi Virgi Olmos, por ser como mis padres, cada uno a su manera y haber hecho mi vida feliz en Granada. Los adoro, son lo más bonito que me dejó España.

A Caro Marconi y las chicas del Taller de Arte Mosaico de la UNRC. Ustedes hacen parte de las cosas lindas y mágicas que me pasaron en Río Cuarto. Son mujeres poderosas, amorosas, que me enseñaron tanto y no se imaginan cuanto significan para mí... Gracias por haber hecho mi vida feliz, llena de arte y de buenos momentos. La quiero infinitamente y espero que el camino del mosaico nos vuelva a reunir.

Y a todos los nombres que se me escapan y a cada persona que estuvo de paso, todo sumó, todo fue de gran ayuda y de todo aprendí. Y sobre todo GRACIAS a cada Argentino que puso un granito de arena, que tributó y sin siquiera saberlo, me ayudó para que yo hubiera vivido esta experiencia. Espero poder retribuir todo su esfuerzo desde mi labor académica y científica.

DEDICATORIA

♥ A mis Padres, a Lina María y a Robert...♥

RESÚMEN

Los gases efecto invernadero (GEI's) son considerados contaminantes atmosféricos y co responsables por el calentamiento global, siendo la agricultura y particularmente la utilización de fertilizantes químicos de origen nitrogenado una de las principales fuentes de emisión en la actualidad. En América del Sur, principalmente en Argentina y Brasil, uno de los cultivos de mayor importancia económica es el de soja, cuyo nivel de fertilización química nitrogenada es bajo (lo que tradicionalmente ha llevado a considerarlo como un pobre emisor de GEIs a la atmósfera); sin embargo, se inocula con rizobacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno atmosférico del género *Bradyrhizobium*, las que dependiendo de sus características bioquímicas a nivel de la ruta de desnitrificación, podrían contribuir con las emisiones de óxido nitroso (N_2O) a la atmósfera. Dado que el N_2O se produce durante la desnitrificación y esta se realiza por acción de los microorganismos, el objetivo de esta investigación fue analizar la actividad desnitrificantes de las cepas más utilizadas para la formulación de inoculantes para soja en América del Sur, E109 and CPAC15 de *B. japonicum*; CPAC7 de *B. diazoefficiens*, SEMIA 587 y SEMIA 5019 de *B. elkanii*, tanto en vida libre como en simbiosis en condiciones semi-controlados y en parcelas experimentales a campo. Los resultados evidenciaron que a nivel *in silico* y molecular la presencia de todos los genes de la desnitrificación para CPAC7 de *B. diazoefficiens* y la ausencia del gen *nosZ* para las cepas de *B. japonicum*; mientras que para las cepas de *B. elkanii* no se encontraron los genes implicados en la ruta. Los análisis en condiciones de vida libre demostraron que todas las cepas presentaron actividad desnitrificante, expresada en la actividad nitrato y nitrito reductasa y la producción de óxido nítrico y óxido nitroso, siendo este último significativamente más alto para SEMIA 5019 y E109. Consecuentemente, los ensayos en cámaras de crecimiento evidenciaron que la producción de N_2O fue más alta en raíces inoculadas con SEMIA 5019 y E109. El ensayo a campo confirmó los hallazgos de las determinaciones *in vitro*: La producción de óxido nitroso demostró que a, excepción de CPAC 7, todas las cepas emiten altas cantidades variables de N_2O , siendo el tratamiento inoculado con E109 el que presentó los mayores flujos de emisión de N_2O , superando significativamente la producción de los tratamientos inoculados con USDA 110 y CPAC 7, respectivamente. Así mismo, en este estudio encontramos que las cepas SEMIA 587 y SEMIA 5019 presentan actividad desnitrificante en condiciones de vida libre y contribuyen con la producción de N_2O , pero no

cuentan con los genes *napA*, *nirK*, *norC* y *nosZ*. Los ensayos de co-inoculación como estrategia mitigadora demostraron que las bacterias desnitrificadoras completas y de vida libre no serían una alternativa biotecnológica para la mitigación, mientras que los resultados más eficientes se encontraron cuando se coinocularon rizobios con desnitrificación completa e incompleta de manera simultánea, siendo la combinación E109 + CPAC 7 las que presentó valores significativamente bajos en los flujos de emisión de N₂O respecto a la inoculación individual de E109.

Palabras Clave: Gases efecto invernadero, desnitrificación, simbiosis, *Bradyrhizobium* sp.

Abstract

Greenhouse gases (GHG) are considered potential atmospheric pollutants co-responsible for global warming, with agriculture being one of the main emission sources. The traditional practice of inoculating soybean crops with the *Bradyrhizobium* genus in South America, might contribute to nitrous oxide (N₂O) emissions into the atmosphere. Since N₂O is produced during denitrification and this is because the action of microorganisms, the objective of this research was to analyze the denitrification activity of strains E109 and CPAC15 of *B. japonicum*; CPAC7 of *B. diazoefficiens*, SEMIA 587 and SEMIA 5019 of *B. elkanii*, both in free-living and in symbiosis under semi-controlled conditions and experimental field plots. The results showed that at the level of silico and molecular analysis it could be the presence of all the genes for CPAC7 of *B. diazoefficiens* and the absence of the *nosZ* gene for strains of *B. japonicum*; while for *B. elkanii* the genes involved in the route were not found. The analysis in free life demonstrated that all the strains had the denitrification activity, expressed as nitrate and nitrite reductase activity and the production of nitric oxide and nitrous oxide, being this last significantly higher for SEMIA 5019 and E109. The field test confirmed the findings of *in vitro* determinations: nitrous oxide production showed that, except CPAC 7, all strains emitted high amounts of N₂O, being the treatment inoculated with E109 the one that presented the highest N₂O fluxes, surpassing the production of treatments inoculated with USDA 110 and CPAC 7, respectively. Likewise, in this study we found the strains SEMIA 587 and SEMIA 5019 presented the denitrifying activity in free life and gained with the production of N₂O, but did not have the genes *napA*, *nirK*, *norC* and *nosZ*. The co-inoculation trials as a mitigating strategy demonstrated that the complete denitrifying bacteria of free life are not alternatives to mitigation, while the most important results were when rizobia are used with complete and incomplete denitrification were used, being the combination E109 + CPAC 7 which showed lower emission rates of N₂O compared to the individual inoculation of E109.

Keywords: Greenhouse gases effect, denitrification, symbiosis, *Bradyrhizobium* sp.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN

ABSTRACT

LISTA DE TABLAS

LISTA DE FIGURAS

1 INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1 Desnitrificación y Gases efecto invernadero.....	2
1.1.1 La desnitrificación.....	3
1.2 Enzimas implicadas en el proceso de desnitrificación.....	4
1.2.1 Nitrato reductasas.....	4
1.2.2 Nitrito reductasas	5
1.2.3 Óxido nítrico reductasa.....	6
1.2.4 Óxido nitroso reductasas.....	7
1.3 Regulación de la desnitrificación	7
1.4 Desnitrificación en bacterias del orden Rhizobiales.....	9
1.4.1 Desnitrificación en <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	10
1.4.1.1 Nitrato reductasa periplásmica.....	10
1.4.1.2 Nitrito reductasa.....	11
1.4.1.3 Óxido nítrico reductasa.	11
1.4.1.4 Óxido nitroso reductasa.....	11
1.5 La importancia del cultivo de soja en la República Argentina.....	12
1.6 <i>B. japonicum</i> E109 y su uso como inoculante para soja en Argentina.....	13
1.7 El cultivo de Soja en Argentina y su papel en la emisión de GEI's.....	14
2. Hipótesis.....	16
3. Objetivos.....	16

3.1 Objetivos generales.	17
3.2 Objetivos específicos.....	17

CAPÍTULO I

RUTA DESNITRIFICANTE DE <i>Bradyrhizobium</i> sp. EN VIDA LIBRE.....	19
4.1 Introducción.....	20
4.2 Materiales y Métodos.....	21
4.3 Resultados.....	27
4.4 Discusión.....	40

CAPITULO II

RUTA DESNITRIFICANTE DE <i>Bradyrhizobium</i> sp. EN SIMBIOSIS.....	46
5.1 Introducción.....	47
5.2 Materiales y Métodos.....	49
5.3 Resultados.....	54
5.4 Discusión.....	63

CAPÍTULO III

ESTRATEGIAS DE MITIGACIÓN DE LA EMISIÓN DE GEIs EN LA SIMBIOSIS SOJA - <i>Bradyrhizobium</i> sp.....	68
6.1 Introducción.....	69
6.2 Materiales y Métodos.....	71
6.3 Resultados.....	73
6.4 Discusión.....	79

CAPÍTULO IV

EMISIÓN DE GEIs EN LA SIMBIOSIS SOJA-*Bradyrhizobium* EN CONDICIONES DE PARCELAS EXPERIMENTALES A CAMPO.....82

7.1 Introducción.....83

7.2 Materiales y Métodos.....85

7.3 Resultados.....89

7.4 Discusión.....104

CONCLUSIONES GENERALES.....114

BIBLIOGRAFÍA.....119

ANEXOS

LISTA DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN GENERAL

- Figura 1. Localización de las proteínas implicadas en el proceso de la desnitrificación en *B. japonicum* (Tomado de Bueno et al. 2008).....10
- Figura 2. Evolución de áreas y rindes de soja en la República Argentina.....13
- Figura 3. Evolución de superficie sembrada de los principales cultivos del país (1990 a 2012). Fuente: Tercera comunicación nacional de la CMNUCC.....15

CAPÍTULO I. ANÁLISIS DE LA RUTA DESNITRIFICANTE DE *Bradyrhizobium* sp. EN VIDA LIBRE

- Figura 4. Vías metabólicas relacionadas al metabolismo del nitrógeno y desnitrificación de acuerdo al diagrama de KEGG (Kanehisha et al. 2004) Las cajas verdes representan las secuencias codificantes identificadas en el genoma de *B. japonicum* E109 y CPAC1.....29
- Figura 5. Vías metabólicas relacionadas al metabolismo del nitrógeno y desnitrificación de acuerdo al diagrama de KEGG (Kanehisha et al. 2004). Las cajas verdes representan las secuencias codificantes identificadas en el genoma de *B. diazoefficiens* USDA 110 y CPAC7.....30
- Figura 6. Vías metabólicas relacionadas al metabolismo del nitrógeno y desnitrificación de acuerdo al diagrama de KEGG (Kanehisha et al. 2004). Las cajas verdes representan las secuencias codificantes identificadas en el draft genome de *B. elkanii* SEMIA 587.....31
- Figura 7. Árbol filogenético concatenado construido a partir de la secuencia de los genes *atpD*, *glnII* y *recA* (1190 bp) de las cepas SEMIA 587, SEMIA 5019, CPAC15, CPAC7 y E109 y especies filogenéticamente relacionadas con el género *Bradyrhizobium*. Los valores de Bootstrap están indicados como porcentaje derivado a partir de 1000 réplicas. Los valores por debajo de 70 no fueron mostrados. La raíz del árbol utilizada fue *Rhizobium etli*.....33
- Figura 8. Productos amplificados de PCR de ADN genómico de las cepas SEMIA 5019 y SEMIA 587 para los genes *napA*, *nirK*, *norC* y *nosZ*.....34
- Figura 9. Curva de crecimiento en condiciones denitrificantes para las cepas de *Bradyrhizobium* en estudio.....35
- Figura 10. Producción de NO en condiciones desnitrificantes a partir de nitrito para *Bradyrhizobium* sp.. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas

en relación a cada variable evaluada de acuerdo a la prueba de Tukey HSD (p<0,05).....37

CAPITULO II. ANÁLISIS DE LA RUTA DESNITRIFICANTE DE *Bradyrhizobium* sp. EN SIMBIOSIS CON SOJA.

Figura 11. Descripción del modelo desnitrificante en la interacción soja-*Bradyrhizobium*. Se describe el proceso de óxido-reducción de los óxidos de nitrógeno (NOx) catalizado en cada paso por una enzima reductasa, la cual está codificada por los genes *napA*, *nirK*, *norC* y *nosZ*, siendo esta última fundamental para definir el producto final de la desnitrificación. (Modelo propuesto por Itakura et al, 2012).....47

Figura 12. Efecto de la adición de nitrato en la producción de óxido nítrico (NO) determinado con microscopía de barrido láser confocal (CLSM) en cortes de nódulos de plantas de soja inoculadas con GRC131 (mutante para el gen *norC* de *B. diazoefficiens* – Control positivo para la producción de NO) y tratadas con DAF2-DA. A y B: Imágenes de CLSM A' y B': Campo claro en CLSM.Las barras representan 500 μm54

Figura 13. Efecto de la incubación previa con cPTIO (NO scavenger) y la producción de óxido nítrico (NO) determinado con microscopía de barrido láser confocal (CLSM) en cortes de nódulos de plantas de soja inoculadas con GRC131 (mutante para el gen *norC* de *B. diazoefficiens* – Control positivo para la producción de NO) y tratadas con DAF2-DA . A y B: Imágenes de CLSM A' y B': Campo claro en CLSM.Las barras representan 500 μm55

Figura 14. Imágenes de la producción de NO determinado con microscopía de barrido láser confocal (CLSM) en cortes de nódulos de plantas de soja inoculadas con las cepas de *B. diazoefficiens* y *B. elkanii* y tratadas con DAF2-DA . A - G: Imágenes de CLSM A' y G': Campo claro en CLSM.Las barras representan 500 μm56

Figura 15. Producción de óxido nitroso (N₂O) por raíces [nmoles.ml⁻¹h⁻¹]. Tratamientos: T1 (Control sin inoculación); T2 (USDA110); T3 (E109); T4 (USDA110, *nosZ*). Cada tratamiento representa el promedio de 3 mediciones independientes (n=3) y 3 réplicas experimentales extemporáneas).....57

Figura 16. Producción de óxido nitroso (N₂O) por los nódulos de soja [nmoles.ml⁻¹h⁻¹]. Tratamientos: T1 (Control sin inoculación); T2 (USDA110); T3 (E109); T4 (USDA110, *nosZ*). Cada tratamiento representa el promedio de 3 mediciones independientes (n=3) y 3 réplicas experimentales extemporáneas).....58

Figura 17. Producción de óxido nitroso (N₂O) de raíces de soja de las variedades Williams 82 (T1, T2 y T3) y Don Mario 4670 (T4, T5 y T6) inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. (T1) USDA110;(T2) E109; (T3) GRZ 3035; (T4) USDA110; (T5) E109; (T6) GRZ3035. Los

valores se expresan como $\text{nmol de N}_2\text{O h}^{-1}\text{g}^{-1}$ y representan la media de 5 repeticiones seguida del error estándar. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas en relación a cada variable evaluada de acuerdo a la prueba de Tukey HSD ($p < 0,05$).....60

Figura 18. Producción de óxido nitroso (N_2O) de raíces noduladas de soja inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. (T1) USDA110; (T2) E109; (T3) SEMIA 5019; (T4) CPAC 15; (T5) CPAC 7; (T6) SEMIA 587; (T7) GRZ3035. Los valores se expresan como $\text{nmol de N}_2\text{O h}^{-1}\text{g}^{-1}$ y representan la media de 5 repeticiones seguida del error estándar. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas en relación a cada variable evaluada de acuerdo a la prueba de Tukey HSD ($p < 0,05$).....64

CAPÍTULO III. MITIGACIÓN DE LA EMISIÓN DE GEIs EN LA SIMBIOSIS SOJA-*Bradyrhizobium* sp

Figura 19. Producción de óxido nitroso (N_2O) de raíces noduladas de soja inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. (T1) USDA110; (T2) E109; (T3) GRZ 3035; (T4) E109 + Az39; (T5) E109 + USDA110; (T6) GRZ 3035 + Az39; (T7) GRZ 3035 + USDA 110. Los valores se expresan como $\text{nmol de N}_2\text{O h}^{-1}\text{g}^{-1}$ y representan la media de 4 repeticiones seguida del error estándar. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas en relación a cada variable evaluada de acuerdo a la prueba de Tukey HSD ($p < 0,05$).....73

Figura 20. Producción de óxido nitroso (N_2O) de raíces noduladas de soja inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. (T1) USDA110 (T2) E109 (T3) SEMIA 5019 (T4) CPAC 15 (T5) CPAC 7 (T6) SEMIA 587 (T7) GRZ 3035 (T8) E109 + USDA110 (T9) E109 + SEMIA 5080 (T10) SEMIA 5019 + USDA110 (T11) SEMIA 5019+ SEMIA 5080 (T12) CPAC 15 + USDA110 (T13) SEMIA 5079 + CPAC 7 (T14) SEMIA 587 + USDA110 (T15) SEMIA 587 + CPAC 7 (T16) GRZ 3035 + USDA110 (T17) GRZ 3035 + CPAC 7. Los valores se expresan como $\text{nmol de N}_2\text{O h}^{-1}\text{g}^{-1}$ y representan la media de 4 repeticiones seguida del error estándar. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas en relación a cada variable evaluada de acuerdo a Tukey HSD ($p < 0,05$).....75

CAPÍTULO IV. EMISIÓN DE GEIs EN LA SIMBIOSIS SOJA-*Bradyrhizobium* sp. EN CONDICIONES DE PARCELAS EXPERIMENTALES A CAMPO.

Figura 21. Distribución a nivel global de los sitios de estudio de emisiones de Gases de Efecto Invernadero (MAGGnet). (Liebig et al . 2016).....83

Figura 22. Diseño experimental del ensayo en parcelas a campo.....86

Figura 23. Cámara de captura de gases (N_2O).....87

Figura 24. Porcentaje de nódulos en raíces de soja inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. Los resultados corresponden al número de nódulos en raíz principal y raíces secundarias que aportan al número total de nódulos por cepa inoculada.....	89
Figura 25. Peso seco de nódulos de raíces de soja inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. Los resultados presentan el peso seco total agrupado por cepa inoculada. Los valores y representan la media de 5 repeticiones seguida del error estándar. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas en relación a cada variable evaluada de acuerdo a la prueba de Tukey HSD ($p < 0,05$).....	90
Figura 26. Peso seco de parte aérea de plantas de soja inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. Los resultados presentan el peso seco agrupado por cepa inoculada. Los valores y representan la media de 5 repeticiones seguida del error estándar. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas en relación a cada variable evaluada de acuerdo a la prueba de Tukey HSD ($p < 0,05$).....	91
Figura 27. Flujos de N_2O desde el suelo en parcelas cultivadas con soja inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. en estadios R7 y R8. Los valores se expresan como $ugmol$ de N_2O $h^{-1}g^{-1}$. Las diferencias estadísticamente significativas Friedman ($p < 0,05$) se muestran para cada muestreo realizado: Letras negras corresponden a R7 y rojas a R8.....	92
Figura 28. Flujos de N_2O acumulado desde el suelo en parcelas cultivadas con soja inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. en estadios R7 y R8. Los valores se expresan como $ugmol$ de N_2O $h^{-1}g^{-1}$. Las diferencias estadísticamente significativas de acuerdo al test de Friedman ($p < 0,05$).....	93
Figura 29. Rendimiento del cultivo de soja inoculada con 6 cepas de <i>Bradyrhizobium</i> sp. en estadio R7. Los valores se expresan en Kg/ha y corresponden al promedio de 3 réplicas experimentales seguidas del error estándar.....	94
Figura 30. Análisis de componentes principales (ACP) de los tratamientos inoculados en parcelas experimentales a campo con <i>Bradyrhizobium</i> sp.. El diagrama de dispersión describe el experimento con componentes PCA1 y PCA2.....	97
Figura 31. Selección de rizobios tentativos teniendo como referencia la cepa madre inoculada en cada parcela.....	99
Figura 32. Amplificación de ERIC-PCR en electroforesis en gel de agarosa para las cepas tentativas de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> E109. El tratamiento fue inoculado con la cepa E109 (Control positivo) y las parcelas inoculadas fueron P4, P10 y P14. La letra C corresponde a las colonias y el respectivo número asignado para identificar cada cepa re aislada.....	100

Figura 33. Amplificación de ERIC-PCR en electroforesis en gel de agarosa para las cepas tentativas de *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 5019. El tratamiento fue inoculado con la cepa SEMIA 5019 (Control positivo) y las parcelas inoculadas fueron P6, P8 y P18. La letra C corresponde a las colonias y el respectivo número asignado para identificar cada cepa re aislada.....101

Figura 34. Amplificación de ERIC-PCR en electroforesis en gel de agarosa para las cepas tentativas de *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587. El tratamiento fue inoculado con la cepa SEMIA 587 (Control positivo) y las parcelas inoculadas fueron P5, P12 y P15. La letra C corresponde a las colonias y el respectivo número asignado para identificar cada cepa re aislada.....101

Figura 35. Perfil de ERIC PCR para cepas tentativas de *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110. El tratamiento fue inoculado con la cepa USDA 110 (Control positivo) y las parcelas inoculadas fueron P2, P9 y P13. La letra C corresponde a las colonias y el respectivo número asignado para identificar cepas re aisladas.....102

Figura 36. Amplificación de ERIC-PCR en electroforesis en gel de agarosa para las cepas tentativas de *Bradyrhizobium japonicum* CPAC15. El tratamiento fue inoculado con la cepa CPAC15 (SEMIA 5079) (Control positivo) y las parcelas inoculadas fueron P3, P7y P17. La letra C corresponde a las colonias y el respectivo número asignado para identificar cada cepa re aislada.....102

Figura 37. Amplificación de ERIC-PCR en electroforesis en gel de agarosa para las cepas tentativas de *Bradyrhizobium diazoefficiens* CPAC7. El tratamiento fue inoculado con la cepa CPAC7 (SEMIA 5080) (Control positivo) y las parcelas inoculadas fueron P1, P11y P16. La letra C corresponde a las colonias y el respectivo número asignado para identificar cada cepa re aislada.....103

LISTA DE TABLAS

CAPÍTULO I. ANÁLISIS DE LA RUTA DESNITRIFICANTE DE *Bradyrhizobium* sp. EN VIDA LIBRE

Tabla 1. Descripción de las cepas de estudio y cepas de referencia utilizadas en este estudio.	21
Tabla 2. Descripción de los primers de oligonucleótidos, tamaño de amplificación y secuencia de los nucleótidos de los genes de la denitrificación (Fernández et al, 2008).	24
Tabla 3. Análisis in silico de los principales genes de la ruta desnitrificante de las cepas E109, CPAC15, SEMIA 587 y CPAC7 de <i>Bradyrhizobium</i> mediante RAST y KEGG.	28
Tabla 4. Identificación de los genes de la desnitricación en <i>B. diazoefficiens</i> USDA 110 (control), SEMIA 5019 y SEMIA 587.	35
Tabla 5. Actividad nitrato reductasa (NR) y nitrito reductasa (NiR) de las cepas de <i>Bradyrhizobium</i> en estudio.	36
Tabla 6. Producción de NO en condiciones desnitrificantes a partir de nitrito para <i>Bradyrhizobium</i> sp.	37
Tabla 7. Producción de óxido nitroso por las cepas en estudio de <i>Bradyrhizobium</i> sp.	38

CAPITULO II. ANÁLISIS DE LA RUTA DESNITRIFICANTE DE *Bradyrhizobium* sp. EN SIMBIOSIS CON SOJA

Tabla 8. Detección de óxido nítrico en nódulos de plantas de soja inoculadas con diferentes cepas de <i>Bradyrhizobium</i> sp.	56
Tabla 9 Correlación entre la presencia/ausencia del gen <i>nosZ</i> y la producción de óxido nitroso en células en vida libre y en simbiosis con soja.	66

CAPÍTULO III. ESTRATEGIAS DE MITIGACIÓN DE LA EMISIÓN DE GASES EFECTO INVERNADERO EN LA SIMBIOSIS SOJA-*Bradyrhizobium* sp.

Tabla 10. Porcentaje de ocupación nodular en condiciones de inoculación o co-inoculación para los 7 tratamientos evaluados.	73
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Tabla 11. Porcentaje de ocupación nodular en condiciones de inoculación o co-inoculación para los 17 tratamientos evaluados.....75

Tabla 12. Resistencia a antibióticos de las cepas USDA110, E109, SEMIA 5019, CPAC 7, CPAC 15 y SEMIA 587.....77

CAPÍTULO IV. EMISIÓN DE GASES EFECTO INVERNADERO EN LA SIMBIOSIS SOJA-*Bradyrhizobium* sp EN CONDICIONES EXPERIMENTALES EN PARCELAS A CAMPO

Tabla 13. Matriz de correlaciones de Pearson (n) entre las variables evaluadas en condiciones experimentales en parcelas a campo.....94

Tabla 14. Aislamientos obtenidos de las parcelas inoculadas con *Bradyrhizobium* sp.....98

LISTA DE ABREVIATURAS

BLAST	- Basic Local Alignment Search Tool
DO	- densidad óptica
DNA	- ácido desoxirribonucleico
EC	- Enzyme Commission
g	- gramo
h	- hora
KEGG	- Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
L	- litro
M	- molar
mg	- miligramo
mL	- mililitro
ng	- nanogramo
NCBI	- National Center for Biotechnology Information
PGPR	- Plant Growth-Promoting Rhizobacteria
RAST	- Rapid Annotation using Subsystem Technology
rpm	- rotación por minuto
UFC	- Unidades formadora de colonia
% p/v	- relación en porcentaje del peso del soluto y el volumen de la solución
µg	- microgramo
µM	- micromolar

Esta investigación de Tesis Doctoral fue desarrollada en el Laboratorio de Fisiología Vegetal y de la Interacción Planta-Microorganismo del Departamento de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Para la realización del proyecto de investigación, la MsC. Obando Castellanos contó con la financiación de las siguientes instituciones, convenios o becas de movilidad:

- **Beca Doctoral del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).** Periodo: desde octubre de 2013 a diciembre de 2018.

- **Estancias doctorales financiadas por el Programa i-COOP+ 2014 del Consejo Superior de Investigaciones Científicas de España [CSIC] Estancias 2015 y 2016** “Actividad desnitrificante y emisión de gases efecto invernadero en plantas de soja inoculadas con cepas de *Bradyrhizobium* sp. utilizadas para la formulación de inoculantes en Sudamérica” Estación Experimental el Zaidín-EEZ- Laboratorio del Metabolismo del Nitrógeno Dr. Eulogio Bedmar.
Períodos: 14 de Marzo al 14 de Julio de 2015 – 18 Abril al 6 de septiembre de 2016.

- **Estancias doctorales financiadas por el Laboratorio de Fisiología Vegetal y de la Interacción Planta-Microorganismo (UNRC)** “Medición de óxido nitroso a partir de suelos cultivados con soja e inoculados con cepas del género *Bradyrhizobium*”. Laboratorio de Biogeoquímica Ambiental II de la EEA INTA- Balcarce.
Períodos: Agosto 2017– Mayo de 2018.

Los resultados presentados en esta investigación de tesis doctoral han sido publicados en revistas internacionales y/o se encuentran en proceso de publicación:

1. Daniela Torres, Santiago Revale, **Melissa Obando Castellanos**, Gastón Paris, Alejandro Peticari, Martín Vazquez, Florence Wisniewski-Dyé, Francisco Martínez-Abarca Pastor and Fabricio Cassán. 2015. Genome sequence of *Bradyrhizobium japonicum* strain E109, a model of nitrogen fixing rizobacteria successfully used in agriculture. Genome Announcement. Febrero 2015 3:e01566-14; doi:10.1128/genomeA.01566-14.
2. **Obando Castellanos, M.**; Donadio, F.; Bedmar, E. **Cassán, F. 2016** Emission of greenhouse gases and *Bradyrhizobium*-soybean interaction. Resumen publicado. Biocell 40 (3): 10. ISSN 1667-5746.
3. **Obando, Melissa**, Correa-Galeote, David, Castellano-Hinojosa, Antonio, Gualpa, José, Hidalgo, Alba, Alché, Juan de Dios, Bedmar, Eulogio J, Cassán, Fabricio. Analysis of the denitrification pathway and greenhouse emissions by *Bradyrhizobium* strains used as biofertilizers in South America. **2018**. Enviado.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Desnitrificación y Gases efecto invernadero

La contaminación derivada de la actividad agrícola, principalmente aquella devenida por el uso intensivo de fertilizantes nitrogenados, ha determinado el enriquecimiento progresivo de nitratos en los suelos y acuíferos, así como la acumulación de gases del efecto invernadero (GEI) en la atmósfera. La aplicación de fertilizantes químicos de origen nitrogenado contribuye a incrementar la emisión de estos gases ya que, mayoritariamente, se originan durante los procesos biológicos de nitrificación y sobre todo de desnitrificación, ambos componentes del ciclo del nitrógeno (N_2) en la biósfera. La desnitrificación es una forma alternativa de respiración, en la que en condiciones de baja tensión de oxígeno, los microorganismos pueden utilizar el nitrato y sus óxidos de nitrógeno derivados (NO_x) como aceptores de electrones en una cadena de transporte hasta la formación de N_2 (Zumft., 1997). Aunque la desnitrificación está muy extendida entre los procariotas y se encuentra presente en varias sub-clases de Proteobacterias y Archeobacterias, la capacidad de desnitrificar no está muy extendida entre los rizobios. La mayoría de los rizobios no son considerados "auténticos desnitrificantes" ya que no reducen el nitrato o nitrito a nitrógeno gaseoso (N_2), por lo que durante la desnitrificación pueden acumular nitrito o liberar gases de tipo óxido nítrico (NO) y óxido nitroso (N_2O) a la atmósfera (Zumft., 1997; Bueno et al., 2012). Argentina es el tercer país productor de soja a nivel mundial. La inoculación de esta leguminosa con *Bradyrhizobium japonicum* es una práctica muy extendida, que se ha venido realizando de manera creciente por más de 40 años en los suelos de nuestro país. Según los datos de la última década, solo un pequeño porcentaje de las cepas de *B. japonicum* aisladas de suelos argentinos son verdaderos desnitrificantes, por lo que si se consideran las vastas extensiones de terreno cultivadas, la soja podría convertirse en una de las principales fuentes de emisión de gases del efecto invernadero a la atmósfera. Puesto que se desconoce la actividad desnitrificante de *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la inoculación de soja en Argentina y de las demás cepas de *Bradyrhizobium* sp utilizadas como inoculantes en suramérica, el propósito de este proyecto es determinar y estudiar la actividad desnitrificante de estas cepas en condiciones de vida libre o en asociación simbiótica con el cultivo de soja y su efecto como potencial emisora de gases del efecto invernadero, con la idea de mejorar la formulación de inoculantes, desde una perspectiva más amigable con el medio ambiente.

1.1 La desnitrificación

Es un proceso respiratorio que consiste en la reducción del nitrato (NO_3) o del nitrito (NO_2) a nitrógeno diatómico (N_2), con el paso intermedio a través de formas oxidadas de óxido nítrico (NO) y nitroso (N_2O) (Sameshima et al. 2003). Estos gases tienen un enorme impacto sobre la atmósfera, ya que intervienen en la formación de la lluvia ácida, destrucción de la capa de ozono y en el calentamiento global de la atmósfera. La desnitrificación tiene, por lo tanto, un gran impacto en la agricultura, medioambiente y en la salud humana (Torres Porrás, 2014).

La capacidad de desnitrificar está muy extendida entre los procariotas y abarca a bacterias que pertenecen taxonómicamente a varias sub-clases de Proteobacterias, y Archeobacterias (Zumft, 1997). Aunque la desnitrificación es una característica propia de las bacterias anaerobias facultativas, y se considera que sólo ocurre en ausencia de oxígeno, se han descrito algunas especies del género *Paracoccus* (antes *Thiobacillus* sp.) capaces de desnitrificar en condiciones aeróbicas (van Spanning et al. 1997). Igualmente, se ha demostrado la existencia de genes implicados en la desnitrificación en bacterias nitrificantes (Di Spirito et al. 1985; Cèbron y Garnier, 2005). Además, algunos hongos, como los del género *Fusarium* tienen capacidad de desnitrificar (Kobayasi et al. 1995).

La reducción del nitrato en condiciones de anaerobiosis ocurre en dos etapas sucesivas: respiración y desnitrificación. En anaerobiosis, el nitrato puede sustituir al oxígeno como aceptor final de electrones para dar lugar a la formación de nitrito, a partir del cual se inicia la desnitrificación, proceso mediante el cual el nitrito se transforma primero en óxido nítrico (NO), luego en óxido nitroso (N_2O) y posteriormente en N_2 .



En el primer paso de este proceso están implicadas, las enzimas nitrato y nitrito reductasa respectivamente. En el caso de la primera reacción, en la que se lleva a cabo la reducción de NO_3 a NO_2 , las enzimas son Nap y Nar; mientras que para el paso de NO_2 a NO , la reacción es catalizada por una nitrito reductasa periplásmica denominada Nir. Por su parte, la reducción de NO a N_2O involucra la formación de un enlace N-N, reacción catalizada por una óxido nítrico

reductasa o Nor y en el último paso de la desnitrificación, que implica la reducción de N_2O a N_2 , la reacción es catalizada por una óxido nitroso reductasa o Nos de localización periplásmica. Las enzimas Nap, Nir, Nor y Nos en *B. japonicum* están codificadas por los genes *napEDABC*, *nirK*, *norCBQD* y *nosRZDFYLX*, respetivamente (Bedmar et al. 2005).

1.2 Enzimas implicadas en el proceso de desnitrificación

1.2.1 Nitrato reductasas

La reducción del nitrato en bacterias se lleva a cabo con al menos tres fines distintos: (1) asimilación (como fuente de nitrógeno para su crecimiento); (2) respiración (obtención de energía cuando el nitrato actúa como aceptor final de electrones) y (3) desasimilación (para la disipación del exceso de poder reductor y optimización del crecimiento en ciertas condiciones metabólicas particulares que se mencionarán posteriormente). En estos tres procesos intervienen tres tipos de nitrato reductasas diferentes: la nitrato reductasa citoplásmica asimilatoria (Nas), la nitrato reductasa respiratoria de membrana (Nar) y la nitrato reductasa periplásmica (Nap). La reducción asimilatoria del nitrato da lugar a nitrito, el cual se reduce posteriormente a amonio, el que vía glutamina sintetasa/glutamato sintasa, da lugar a la formación de aminoácidos y proteínas. Existen dos tipos de nitrato reductasa asimilatorias: las que dependen de NADH y las que dependen de ferredoxina o flavodoxina. El primer grupo está constituido por proteínas formadas por dos subunidades codificadas por los genes *nasA* y *nasC*, y se han identificado en bacterias tales como *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Rhodobacter capsulatus*. Dentro del segundo grupo, se encuentran las nitrato reductasas de *Azotobacter vinelandii* y *Synechococcus* sp. entre otras. (Moreno-Vivián y Flores, 2007; Bueno, 2008). Las Nap han sido estudiadas en *Paracoccus denitrificans* (Sears et al. 1997), *Paracoccus pantotrophus* (Bell et al. 1993), *E. coli* (Grove et al. 1996) y *Pseudomonas putida* (Carter et al. 1995) entre otras bacterias. Las enzimas Nap son heterodímeros formados por una subunidad catalítica de 90 kDa (NapA) y un citocromo C con dos grupos hemo, un tamaño molecular de 15 kDa (NapB) y son codificadas por los genes *napA* y *napB*, respectivamente. Además de las subunidades estructurales, se ha identificado el gen *napC*, que codifica para una proteína del tipo citocromo C unida a membrana, con cuatro grupos hemo y 25 kDa de peso molecular. La proteína NapC se encarga de transferir electrones a la

subunidad NapB (Cartron et al. 2002). En *E. coli*, la máxima expresión de Nap ocurre principalmente en condiciones de baja concentración de oxígeno, y presencia de las proteínas Fnr y NarP (Darwin et al. 1998); mientras que en *P. pantotrophus*, la enzima Nap se expresa en aerobiosis (Bell et al. 1993; Sears et al. 1997).

El papel fisiológico de Nap ha sido propuesto de acuerdo a resultados obtenidos en diferentes trabajos. Se ha demostrado que la enzima participa en la desnitrificación aeróbica y en los procesos de control del balance redox intracelular, disipando el exceso de poder reductor que se genera en ciertas condiciones metabólicas, como el crecimiento fototrófico, o el metabolismo de fuentes de carbono muy reducidas (Sears et al. 2000). Así mismo, se ha descrito que además de esta función, la enzima podría desempeñar una papel similar a la de Nar, acoplando la reducción del nitrato a la producción de ATP, lo que ocurre en *B. japonicum* USDA110 (Delgado et al. 2003).

1.2.2 Nitrito reductasas

Dos tipos de nitrito reductasa han sido caracterizadas en bacterias desnitrificantes: (1) NirS (tipo cd1), una enzima homodimérica con grupos hemo c y hemo d1 y (2) NirK, (tipo Cu), una enzima homotrimérica con átomos de cobre. Ambas, son proteínas localizadas en el periplasma, reciben electrones desde un citocromo C (y/o de una pseudoazurina), y catalizan la reducción monoelectrónica de NO₂ a NO. Las nitrito reductasas de cobre son complejos homotriméricos de 108 kDa que contienen tres centros de cobre azul-verde de tipo I, implicados en la transferencia de electrones desde un donador al sitio activo de la enzima y tres centros de cobre tipo II que forman el centro activo. Esta enzima está codificada por un único gen (*nirK*), el que se ha clonado y secuenciado en las bacterias *Alcaligenes xylosoxidans*, *Achromobacter cycloclastes*, *R. sphaeroides*, *Pseudomonas aureofaciens* (Bedzyk et al. 1999), y algunas especies de rizobios como *Rhizobium sullae* (Toffanin y col, 1996), *Ensifer meliloti* (ex-*Sinorhizobium*) (Barnett et al. 2001) y *B. japonicum* (Velasco et al. 2001). El gen *nirK* suele localizarse aislado en el genoma, sin formar parte de ningún operón y sin que en las proximidades se hallen genes relacionados a la desnitrificación (van Spanning et al. 2005).

1.2.3 Óxido nítrico reductasas

En bacterias desnitrificantes, la enzima responsable para la desintoxicación del NO es la óxido nítrico reductasa (Nor) que cataliza la reducción de dos electrones de dos moléculas de NO a N₂O a través del proceso de desnitrificación. Se han identificado dos tipos de Nor en bacterias desnitrificantes: unas que reciben electrones de un citocromo C (cNor), y otras que reciben electrones de una quinona (qNor).

Las cNors son las mejor estudiadas. Son codificadas por los genes *norCBQD* que reciben electrones de la membrana, citocromos de tipo C solubles o pequeñas proteínas azules de cobre (azurin y pseudoazurin). Los qNors utilizan ubi-hydroquinona (QH₂) o mena-hydroquinona (MQH₂) como donantes de electrones y se encuentran en arqueas y bacterias del suelo. Además, están presentes en microorganismos patógenos no desnitrificantes. El tercer tipo de óxido nítrico reductasas son las qCuANor, hasta ahora se ha encontrado una en la bacteria *Bacillus azotoformans*, que utiliza tanto MQH₂ y un citocromo C específico (c551) como donadores de electrones. Se sugirió que la actividad MQH₂ enlazada con qCuANor tiene un papel desintoxicante y la vía c551 tiene una función bioenergética (van Spanning et al. 2005; de Vries et al. 2007; Zumft, 2005).

Los genes responsables de la síntesis de las enzimas cNor están agrupados en operones como se mencionó anteriormente, y su organización presenta ciertas diferencias entre los organismos desnitrificantes. La organización característica la encontramos en *Nitrosomonas europaea* y *R. sphaeroides*, que presentan el operon *norCBQD* (Bartnikas et al. 1997). Los genes *norC* y *norB* codifican las subunidades NorC y NorB, respectivamente (De Boer et al. 1996). El gen *norQ* codifica una proteína citoplasmática que contiene un motivo de unión a ATP, y *norD* codifica una proteína de función desconocida. Ambas proteínas se requieren para la activación de la enzima Nor. Algunas bacterias desnitrificantes, como *P. denitrificans*, presentan en su organización génica, además los genes *norE* y *norF*, cuyos productos están implicados en la maduración o la estabilidad de la enzima Nor (De Boer et al. 1996).

De acuerdo a la revisión realizada por Bueno et al. (2008), a pesar de que las Nor son proteínas de membrana que intervienen en el transporte de electrones, son incapaces de trasladar protones y crear un gradiente electroquímico necesario para la síntesis de ATP (Bell et al. 1992; Hendriks et al. 2000). Se ha visto además que el sitio catalítico de cNor se

encuentra en la cara periplásmica, en vez de en la cara citoplásmica como en las hemo oxidasas de cobre, las cuales son generadoras de un gradiente electroquímico. Los electrones y protones requeridos para la reducción de NO son tomados del periplasma, lo cual convierte a la enzima en no electrogénica. Además, los residuos aminoacídicos que forman los canales D- y K- que intervienen en la conducción de protones desde el citoplasma al centro dinuclear de la proteína, no están presente.

1.2.4 Óxido nítrico reductasas

La reducción de N_2O a N_2 es una reacción catalizada por la enzima óxido nítrico reductasa (Nos) y representa el último paso del proceso de la desnitrificación. La enzima Nos es periplásmica y ha sido caracterizada bioquímicamente en *P. stutzeri* (Coyle et al. 1985), *P. denitrificans* (Snyder y Hollocher, 1987) y *P. pantotrophus* (Berks et al. 1993). La proteína Nos es un homodímero compuesto por dos subunidades de 65 kDa y contiene cobre en su centro activo. Los genes que codifican esta enzima están organizados en operones, siendo el más estudiado el operón *nosRZDFYLX* de *P. stutzeri* (Braun y Zumft, 1992), *P. denitrificans* (Holloway et al. 1996) y *Ensifer meliloti* (ex-*S. meliloti*) (Chan et al. 1997). NosZ es la subunidad catalítica y los productos de los genes *nosR* y *nosX* presentan cierta identidad con las proteínas NirI y NirX de *P. denitrificans*, respectivamente (Saunders et al. 1999, 2000). NosX parece implicada en el procesamiento de iones cobre y NosR lo está en la activación de la transcripción del promotor de los genes *nos* de *P. stutzeri* (Wunsch y Zumft, 2005). El cobre es poco soluble en condiciones de limitación de oxígeno, por lo que requiere de proteínas que sean capaces de captarlo en el interior celular, procesarlo hasta su estado activo y ensamblarlo a la proteína. Estas funciones corresponden a los productos de los genes *nosDFYL* (Honisch y Zumft, 2003).

1.3 Regulación de la desnitrificación

La expresión de los genes implicados en este proceso está regulada a dos niveles. En primer lugar, existe un control en relación con la tensión de oxígeno, de forma que en aerobiosis, no se activa la síntesis de las enzimas que intervienen en el proceso, lo que se debe a que la respiración oxigénica es un mecanismo más favorable desde el punto de vista energético. En el segundo nivel, se requiere la presencia de nitrato, o un óxido de nitrógeno derivado, puesto

que las enzimas que participan en este proceso actúan de modo secuencial reduciendo cada óxido de nitrógeno, de modo que el producto de una enzima actúa como el sustrato de la siguiente (Bedmar et al. 2005). Debido a que el NO₂ y el NO son tóxicos para la célula, su producción debe controlarse para mantener sus niveles por debajo del nivel de citotoxicidad (De Boer et al. 1994; Zumft, 1997). Las proteínas que intervienen en la regulación a ambos niveles, así como la cooperación entre las mismas, difiere de unos microorganismos desnitrificantes a otros, lo que hace que existan diferencias en los circuitos de control de desnitrificación (Zumft, 1997; 2002; van Spanning et al. 2005).

Mutaciones en los genes *fixL*, *fixJ* y *fixK2* de *B. japonicum* determinaron la incapacidad de la bacteria de crecer anaeróbicamente en presencia de nitrato, lo que sugiere que de alguna forma el sistema FixLJ-FixK2 podría estar implicado en la regulación de la expresión de algunos genes o de todo el proceso de desnitrificación (Nellen-Anthamatten et al. 1998). Así mismo, la utilización de fusiones transcripcionales entre las regiones promotoras de cada uno de los genes *nap*, *nir*, *nor* y *nos* y el gen reportero *lacZ* ha demostrado que la expresión microaeróbica de tales genes depende del sistema regulador FixLJ-FixK2 (Bedmar et al. 2005; Mesa et al., 2002; Delgado et al. 2003; Velasco et al. 2001, 2004; Robles et al. 2006). En la región promotora de todos los genes de la desnitrificación de *B. japonicum* se han localizado secuencias homólogas a la caja FixK (5'-TTGAT-N4-GTCAA-3'), a las que FixK2 podría unirse para activar la transcripción. Bueno et al., (2006) demostraron en un estudio de transcripción *in vitro* que FixK2 activa la transcripción de los genes *nap* y *nirK*. No obstante, no se demostró que FixK2 transcriba directamente los genes *nor*.

Por otro lado, en *B. japonicum*, se ha identificado la presencia del gen *nnrR*, (del inglés, nitrite and nitric oxide respiratory regulator) de la familia Fnr-Crp y una cepa de *B. japonicum* mutante en este gen fue incapaz de crecer en microaerobiosis con nitrato como aceptor final de electrones y careció de actividad nitrato y nitrito reductasa (Mesa et al. 2003). La activación micro-aeróbica de *nnrR* está controlada por FixK2, y en su región promotora se encuentra una secuencia de tipo FixK. La utilización de fusiones transcripcionales entre las regiones promotoras de cada uno de los genes *nap*, *nir*, y *nor* y el gen reportero *lacZ* ha demostrado que la máxima expresión de tales genes depende de la proteína NnrR (Mesa et al., 2003, Robles et al., 2006).

1.4 Desnitrificación en bacterias del orden Rhizobiales

Algunas bacterias de este Orden son bacterias edáficas, gram negativas, agrupadas en numerosos géneros dentro de los cuales se encuentran: *Rhizobium*, *Phyllobacterium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Burkholderia*, *Microvirga*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium*, *Ochrobactrum*, *Cupriavidus*, *Devosia*, *Shinella* y *Bradyrhizobium* (Weir, 2012). Todos ellos se caracterizan por su capacidad para infectar las células corticales de las raíces de las leguminosas y formar nódulos, donde se lleva a cabo el proceso de fijación biológica del nitrógeno. En el interior de los nódulos las bacterias se transforman en bacteroides, que son las células que sintetizan la enzima nitrogenasa, responsable de la catálisis del N₂. A partir del amonio formado resultan compuestos orgánicos nitrogenados esenciales para la nutrición, funcionamiento y desarrollo de las plantas. La capacidad, por lo tanto, de estas bacterias para reducir N₂ en simbiosis es un proceso de enorme importancia agrícola, teniendo en cuenta que las leguminosas, tienen una gran repercusión en la nutrición humana y animal como fuente de proteínas, obtención de aceite, fibras, etc. (Bueno, 2006).

La capacidad de este orden por desnitrificar no es muy frecuente, sólo *B. japonicum* y *A. caulinodans* son capaces de crecer cuando se cultivan en condiciones limitantes de oxígeno y con nitrato como aceptor final de electrones. Entre los rizobios, se han caracterizado genes que codifican enzimas de la desnitrificación (Nirk) en *R. sultae* (Toffanin et al. 1996); *R. etli* (*norCBQD* y *nirK*) (Bueno et al. 2005); *S. meliloti* (genes homólogos a *nap*, *nir*, *nor* y *nos*) (Holloway y col, 1996) y *B. japonicum* (Bedmar et al. 2005).

1.4.1 Desnitrificación en *Bradyrhizobium japonicum*

B. japonicum USDA110 (ahora *B. diazoefficiens* USDA110) es el único rizobio en el que se han aislado y caracterizado los genes de la ruta de desnitrificación *napEDABC* (Delgado et al. 2003); *nirK* (Velasco et al. 2001); *norCBQD* (Mesa et al. 2002) y *nosRZDFYLX* (Velasco et al. 2004), implicados en la síntesis de las enzimas nitrato reductasa periplásmica (Nap), nitrito reductasa (Nir), óxido nítrico reductasa (Nor) y óxido nitroso reductasa (Nos), respectivamente (Bedmar et al. 2005) (Figura 1).

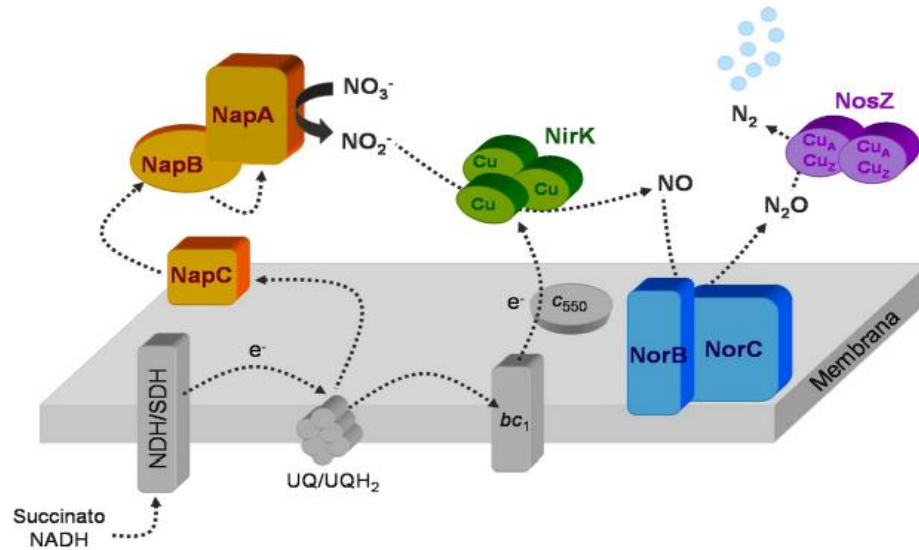


Figura 1. Localización de las proteínas implicadas en el proceso de la desnitrificación en *B. japonicum* (Tomado de Bueno et al. 2008)

1.4.1.1 Nitrato reductasa periplásmica.

En *B. diazoefficiens* USDA110Se identificaron los genes *napE*, *napD*, *napA*, *napB* y *napC*. De acuerdo con el análisis de las secuencias de aminoácidos deducidas de la secuencia de nucleótidos obtenidas del genoma de *B. diazoefficiens* USDA110, NapA es la subunidad catalítica, que contiene un cofactor de molibdopterina y guanina y un centro [4Fe-4S], NapB es un citocromo con dos grupos hemo c que recibe electrones de NapC, un citocromo de membrana con cuatro grupos hemo c. NapE es una proteína transmembrana de función desconocida y NapD es una proteína soluble que podría participar en la maduración del complejo NapAB (Delgado et al. 2003). Estos autores también reportaron que una mutación en el gen *napA* da lugar a una cepa incapaz de producir la proteína NapA y consecuentemente no expresa actividad nitrato reductasa siendo incapaz de crecer micro-aeróbicamente con nitrato. De acuerdo a esto, la enzima nitrato reductasa periplásmica sería la responsable del crecimiento de *B. japonicum* en condiciones desnitrificantes.

1.4.1.2 Nitrito reductasa.

En la misma cepa se ha identificado un gen homólogo a *nirK* que codifica para una proteína del tipo nitrito reductasa de tipo Cu, con un 78 % de similitud a la previamente identificada en *Alcaligenes faecalis* y un 68% de homología con aquella de *R. sphaeroides*. Una cepa mutante para el gen *nirK* de *B. japonicum* fue incapaz de crecer en micro-aerobiosis con nitrato, por lo que se infiere que carece de actividad nitrito reductasa y acumula nitrito en el medio de cultivo, en concordancia con aquello reportado por Velasco et al. (2001). Por otro lado, Bueno et al. (2008), demostraron que el citocromo soluble C550 de *B. japonicum* es el intermediario en el transporte electrónico entre el complejo bc1 y la nitrito reductasa respiratoria NirK.

1.4.1.3 Óxido nítrico reductasa.

Los genes *nor* de *B. diazoefficiens* USDA110 se encuentran organizados en el operon *norCBQD*. La secuencia primaria de NorC y NorB presentan entre el 49% y el 85% de identidad con las secuencias de las enzimas Nor de *P. stutzeri*, *P. aeruginosa*, *P. denitrificans*, y *Alcaligenes faecalis*, entre otras. NorC es un citocromo C asociado a la membrana, capaz de unirse a la proteína NorB que a su vez, es homóloga a la subunidad I (FixN) de la oxidasa terminal *cbb3* de distintas bacterias. Los productos de los genes *norQ* y *norD* tienen funciones desconocidas, aunque han sido implicados en el ensamblaje y maduración de la enzima. La inactivación de uno de los genes *norC* o *norB*, mediante técnicas de mutagénesis dirigida, ha dado lugar a cepas mutantes incapaces de crecer en micro-aerobiosis con nitrato como fuente de energía (Mesa et al. 2002).

1.4.1.4 Óxido nitroso reductasa.

Velasco et al. (2004), reportaron en *B. diazoefficiens* USDA110 se identificaron los genes del operón *nosRZDFYLX*. La secuencia primaria de NosZ presentó entre un 50% y un 77% de identidad con las secuencias NosZ de otros organismos desnitrificantes como *P. stutzeri*, *R. eutropha*, *P. denitrificans*, *S. meliloti* y *Achromobacter cycloclastes*. NosZ contiene dos centros de cobre, CuA y CuZ, de los que el último actúa como centro catalítico. Las proteínas NosDFY constituyen un transportador de tipo ABC que cataliza el transporte de cobre al

interior de la célula. NosL se identificó como una chaperona. NosX posee, en su extremo N-terminal, un motivo de argininas que sugiere que puede plegarse en el citoplasma y adquirir sus co-factores antes de su transporte al periplasma. El gen *nosR* codifica una proteína reguladora con seis regiones transmembrana en cuyo extremo C-terminal se localizan dos agrupaciones de cisteínas, similares a las de algunas ferredoxinas bacterianas que se unen a centros de tipo [4Fe-4S]. Mediante la mutación de los genes *nosR* y *nosZ* de *B. japonicum* y su posterior cultivo en condiciones desnitrificantes, se evidenció que presentaban crecimiento distinto frente a la cepa parental y además se detectó la acumulación de óxido nítrico en estas cepas mutadas.

1.5. La importancia del cultivo de soja en la República Argentina

La soja es el cultivo más importante para la República Argentina, siendo éste país el primer exportador mundial de aceites y derivados provenientes de esta leguminosa (ver Figura 2). En la actualidad, este cultivo ocupa una amplia zona ecológica que se extiende desde los 23° (en el extremo norte del país) a los 39° de latitud sur, concentrándose principalmente en la Región Pampeana, con cerca del 94% de la superficie sembrada y el 95% de la producción total del país. Así Córdoba, Santa Fe y Buenos Aires representan las provincias de dicha región con mayor producción por área sembrada y magnitud de rendimientos (Diaz-Zorita, 2004). Argentina, como tercer productor mundial de soja, en la campaña 2017/18 se espera que alcance de 58,0 millones de toneladas, gracias a los rendimientos superiores a los esperados en la próxima campaña. Debido a que la práctica de fertilización nitrogenada es casi restrictiva para el cultivo por razones económicas y ecológicas, su interacción con *B. japonicum* y los potenciales beneficios derivados de la simbiosis, a nivel de la fijación biológica de nitrógeno, son fundamentales para garantizar un buen crecimiento y desarrollo de la planta, así como una buena productividad del cultivo y una mejor rentabilidad para el productor agropecuario.



Figura 2. Evolución de áreas y rindes de soja en la República Argentina. Fuente: <http://news.agrofy.com.ar/especiales/soja-2016-2017/siembra-soja>.

1.6. *B. japonicum* E109 y su uso como inoculante para soja en Argentina

El cultivo de soja tuvo sus inicios como cultivo expansivo en nuestro país en la década del 70. No obstante, los suelos Argentinos originalmente no contenían rizobios simbioses de esta leguminosa, ya que la misma no era una especie nativa de tales suelos. Así, de la misma forma que en el caso de las semillas, los microorganismos simbióticos asociados a esta especie, fueron introducidos intencionalmente con el cultivo de diferentes bancos de cepas de todo el mundo o no intencionalmente con el manejo agronómico de semillas importadas. La soja establece una relación simbiótica con varias especies de rizobios, dentro de las que se encuentran: *Mesorhizobium thianshanense*, *Ensifer fredii*, *Ensifer xingianjense*, *B. liaoningense*, *B. elkanii*, *B. diazoefficiens* y *B. japonicum*, (Chen et al. 2000; Hungría et al. 2015), siendo esta última la que mejores resultados ha presentado en suelos cultivados con esta planta en nuestro país. A partir de resultados obtenidos luego de un intenso programa de selección y evaluación de cepas de rizobios iniciado en 1980 por el Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA-INTA) de Castelar, se consideró a la cepa E109 de *B. japonicum* (ex-USDA 138, una cepa del tipo USDA 6) como la más recomendable para la inoculación de semillas de soja (Peticari et al.1998; 2005). Desde el momento de su selección hasta la actualidad, esta cepa ha demostrado su capacidad para contribuir con la nutrición y

desarrollo del cultivo de soja, y por ello ha sido adoptada como principio activo de los inoculantes formulados por la mayoría de las empresas nacionales. Estudios recientes han reafirmado su potencial como bacteria promotora del crecimiento de soja y otras especies de no-leguminosas, por lo que se han dilucidado los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal que operan en *B. japonicum* E109, tal como la producción y metabolismo de ciertas fitohormonas del tipo auxinas, giberelinas (GAs) y citocininas (CKs), las que parecerían tener un rol fundamental en los procesos de interacción con la planta, establecimiento de la simbiosis y promoción del crecimiento vegetal (Boiero et al. 2007; Cassán et al. 2009). Considerando este escenario, nuestro grupo de trabajo junto con el Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola del INTA Castelar y la colaboración del Centro de Microbiología y Genética de Plantas de la Universidad Católica de Leuven (CMGP-UKL) y del Instituto de Agrobiotecnología de Rosario (INDEAR) realizó la secuenciación y publicación del genoma de *B. japonicum* E109 (Torres et al. 2015). La información obtenida de este proyecto resultó de gran utilidad para comprender los mecanismos que operan en esta bacteria durante la interacción rizobio-leguminosa y sus futuras potencialidades por el uso y manipulación de los atributos fisiológicos y agronómicos por los que este microorganismo fue seleccionado y utilizado hasta el momento en el sistema de agricultura de nuestro país.

1.7 El cultivo de Soja en Argentina y su papel en la emisión de GEI's.

Es evidente que el cambio climático es un fenómeno no deseado de distintos factores, dentro de los que la actividad o interferencia antropogénica, ha contribuido notablemente y ha determinado el aumento de este fenómeno a nivel global. Como parte de la información generada en el 5° Panel Intergubernamental sobre Cambio Climático (IPCC) del 2015, del total de las emisiones de gases de efecto invernadero a nivel mundial, un 13 % derivan de la actividad agrícola, que a su vez, contribuye con el 60% de las emisiones globales de óxido nitroso globales; el 40% de las emisiones de metano y menos del 1% de las emisiones de dióxido de carbono (CO₂) (Smith et al. 2008).

Según la tercera comunicación nacional de la República Argentina a la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático, la agricultura y ganadería suman el 27,8% de las emisiones totales y las emisiones estimadas de N₂O en este rubro constituyeron el 95% de

las emisiones de este gas, como consecuencia de emisiones provenientes de los suelos agrícolas entre las que se encuentran: las emisiones directas e indirectas por uso de fertilizantes (9,6% del total de emisiones de N₂O en 2012), las emisiones directas de cultivos fijadores (30,7%), el aporte de nitrógeno de residuos de cosecha de cultivos agrícolas (21,9%) y las emisiones directas e indirectas por excretas animales en sistemas pastoriles (31,1%).

Dentro del eslabón agropecuario, la soja es la que prevalece en su aporte total, debido a que es el principal cultivo en Argentina no sólo en producción, sino en superficie ocupada (Fig. 2). En la actualidad representa el 55% de las casi 37 millones de hectáreas que se siembran, seguida muy de lejos por los cultivos de maíz y trigo que en conjunto representan el 26%, menos de la mitad (Fig. 3) (INTA, 2016).

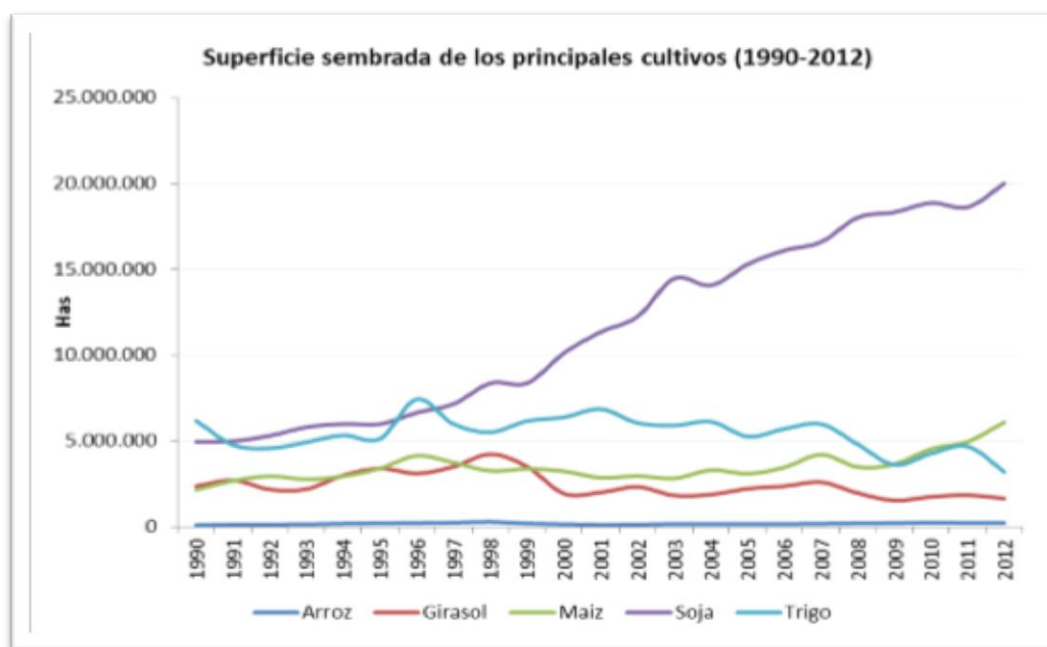


Figura 3. Evolución de superficie sembrada de los principales cultivos del país (1990 a 2012). Fuente: Tercera comunicación nacional a la CMNUCC, 2015.

Aunque no se ha informado su aporte directo en el inventario nacional, esta leguminosa se incluye en el total de emisiones atribuidos a la FBN. Si bien autores como Zhong et al. (2009) afirman que no se han encontrado evidencias de que la fijación biológica de nitrógeno (FBN) *per se* estimule la producción y emisión de N₂O, se han venido reportando importantes aportes en los flujos de emisión de este gas a la atmósfera (O'Hara y Daniel 1985; Inaba et al. 2012). Según Akiyama, (2016) bajo un sistema de rotación con no leguminosas, las emisiones de

GEI's a partir de leguminosas son significativas, especialmente en estadios fisiológicos avanzados (Akiyama, 2016).

Como estrategias de mitigación de GEIs, la tercera comunicación nacional a la CMNUCC, 2015, menciona que se requieren prácticas que permitan mejorar la eficiencia en el uso del nitrógeno, el uso de fijadores biológicos de nitrógeno y las tecnologías de aplicación de fertilizantes las principales barreras son culturales y de información. Puesto que se espera una disminución en la emisión por la actividad agrícola mediante la aplicación de alternativas biológicas, reviste especial interés conocer la actividad desnitrificante de los microorganismos utilizados como principios activos para la formulación de inoculantes en el país y su papel en los flujos de emisión de GEI previo a su recomendación como potenciales atenuadores de emisiones directas de estos gases. En base a éstos antecedentes a continuación, proponemos la siguiente hipótesis y objetivos de trabajo.

2. Hipótesis

2.1 Hipótesis Principal

Los procesos de detoxificación de NO_x en *B. japonicum* E109 podrían presentarse bajo una ruta parcial o incompleta, con lo cual emitiría gases de este tipo, especialmente óxido nitroso, tanto en condiciones de *vida libre* como en simbiosis con la soja.

2.24. Hipótesis alternativa

Los procesos de detoxificación de NO_x en *B. japonicum* E109 podrían presentar la ruta completa y permitirá reducir la producción de estas moléculas en simbiosis con el cultivo de soja y evitará su posterior liberación a la atmósfera como gases del efecto invernadero.

3. Objetivos

En el marco del desarrollo de esta tesis, estudiaremos la capacidad de algunas bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Bradyrhizobium* y otras promotoras del crecimiento vegetal para mitigar la liberación de gases del efecto invernadero, tanto en condiciones simbióticas

con el cultivo de soja [*Glycine max* L. (Merr.)], como en condiciones de *vida libre* en la rizósfera de tales cultivos. Sobre la base de esa idea de trabajo, hemos planteado los siguientes objetivos generales:

3.1 Objetivos generales

1. Analizar el genoma de *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para leguminosas en la República Argentina e identificar aquellos genes relacionados con las funciones metabólicas asociadas a la desnitrificación, catabolismo del óxido nítrico [NO] y otros gases responsables del efecto invernadero.
2. Analizar estrategias biológicas que resulten para mitigar la producción de gases del efecto invernadero emitidos por *B. japonicum* E109 tanto en condiciones de *vida libre* como en simbiosis con el cultivo de soja.

3.2 Objetivos específicos

1. Realizar un análisis bioinformático del genoma de *B. japonicum* E109 sobre los principales mecanismos de mitigación de la producción de gases del efecto invernadero previamente descritos para otras rizobacterias, en condiciones de *vida libre* o en asociación simbiótica con leguminosas. En el caso de la simbiosis se considerarán mecanismos relacionados con la detoxificación del NO y asimilación del nitrato [Ej: nitrato, nitrito y óxido nítrico reductasas].
2. Evaluar y comparar la capacidad de metabolizar gases tipo NO_x y otros gases del efecto invernadero de la cepa salvaje de *B. japonicum* E109 y otras rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal, tanto en cultivos químicamente definidos, como en nódulos de plántulas de soja [*Glycine max* L. (Merr.)] previamente inoculadas.
3. Evaluar la capacidad de metabolizar gases NO_x *B. japonicum* E109 en combinación con rizobacterias promotoras del crecimiento previamente seleccionadas por su capacidad detoxificante, tanto en cultivos químicamente definidos como en nódulos de plántulas de soja [*Glycine max* L. (Merr.)].

4. Evaluar la capacidad de metabolizar óxido nitroso de *B. japonicum* E109 y de otras rizobacterias promotoras del crecimiento y su correlación con parámetros agronómicos del cultivo de soja [*Glycine max* L. (Merr.)] en condiciones de parcelas de campo.

CAPÍTULO I

4. ANÁLISIS DE LA RUTA DESNITRIFICANTE DE *Bradyrhizobium* sp. EN VIDA LIBRE

4.1 Introducción

La desnitrificación es una ruta respiratoria alternativa con la cual los microorganismos pueden utilizar el nitrato y sus derivados de óxidos de nitrógeno como aceptores finales de la cadena transportadora de electrones. El producto final del proceso completo es el nitrógeno diatómico (N_2) (Sameshima et al. 2003). No obstante, cuando el proceso se realiza parcialmente los productos finales son formas parcialmente oxidadas del nitrógeno (NO_x). Estas formas oxidadas tienen serios impactos en la atmósfera debido a que intervienen en la formación de la lluvia ácida, la destrucción de la capa de ozono y el calentamiento global (Sameshima et al. 2003). Además, la desnitrificación tiene un impacto significativo en la agricultura, el medio ambiente y la salud humana (Meakin et al. 2006). Los fertilizantes de síntesis química utilizados indiscriminadamente en la agricultura son potenciales contaminantes de las capas freáticas y la acumulación del nitrato en los suelos, los cuales son utilizados por microorganismos desnitrificantes que despiden gases tipo NO_x como producto final. La desnitrificación está muy extendida entre los procariotas y está presente en varias subclases de Proteobacteria y Archeobacteria (Zumft, 1997); sin embargo, los rizobios no son considerados auténticos desnitrificantes porque acumulan nitrito o emiten gases intermedios como el NO y el N_2O a la atmósfera (Fernández et al. 2008). Hasta el momento, *B. diazoefficiens* USDA110 es la bacteria modelo para el proceso de desnitrificación completa, ya que todos los genes de esta ruta han sido aislados y caracterizados. Estos genes son *napEDABC* (Delgado et al. 2003); *nirK* (Velasco et al, 2001); *norCBQD* (Mesa et al. 2002) y *nosRZDFYLX* (Velasco et al. 2004), los cuales están directamente involucrados en la síntesis de las siguientes enzimas, respectivamente: Nap, Nir, Nor y Nos (Bedmar et al. 2005; Robles et al. 2006).

La soja establece relaciones simbióticas con un gran número de especies de rizobios, entre ellas: *Mesorhizobium thianshanense*, *E. fredii*, *E. xingianjense*, *B. liaoningense*, *B. elkanii*, *B. diazoefficiens* y *B. japonicum* (Lodeiro, 2015). El cultivo de soja ha sido una práctica extensiva en Sudamérica por más de 40 años, principalmente en Argentina y Brasil, y como resultado se han introducido poblaciones de rizobios no nativos en el suelo (Campos et al. 2001). La cepas naturalizadas que son comúnmente encontradas son: E109 (Torres et al. 2015) y CPAC15 (antes SEMIA 5079) de *B. japonicum*; CPAC 7 (antes SEMIA 5080) de *B. diazoefficiens* (Siqueira et al. 2014); SEMIA 587 y SEMIA 5019 de *B. elkanii* (Hungría et al. 1998), entre otras.

Investigaciones recientes han evidenciado la existencia de emisiones de N₂O a partir del suelo y raíces noduladas con *Bradyrhizobium* sp. (Meakin et al. 2006; Parkin and Kaspar 2006; Inaba et al. 2009; Itakura et al. 2013; Hirayama et al. 2011). No obstante, no se cuenta con información en nuestro continente respecto a la actividad desnitrificante de los rizobios, tanto en vida libre como en simbiosis con soja. Las vastas extensiones cultivadas con soja en nuestro continente podrían ser una de las principales fuentes de emisión de gases efecto invernadero a la atmósfera (Obando et al. 2016).

Durante el desarrollo de este trabajo fueron secuenciados y publicados los genomas de las cepas E109 (Torres et al. 2015), CPAC 15 y CPAC 7(Siqueira et al. 2014), por lo que, contamos con información preliminar sobre la actividad desnitrificante a nivel *in silico* de tales microorganismos. Por otro lado, las cepas SEMIA 587 y SEMIA 5019 no presentan genomas secuenciados y su actividad desnitrificante no ha sido reportada, por lo que en éste caso el abordaje experimental fue particular. El objetivo principal de este capítulo fue estudiar a nivel *in silico*, molecular y bioquímico la actividad desnitrificantes de estas cepas en condiciones de vida libre y determinar su potencial como emisoras de gases tipo NO_x en condiciones de baja tensión de oxígeno.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Material biológico y condiciones de cultivo.

Las cepas utilizadas en este capítulo y a lo largo de toda la investigación, se describen a continuación en la tabla 1.

Tabla 1. Descripción de las cepas de estudio y cepas de referencia utilizadas en este estudio.

Cepa	Especie	Observaciones
USDA110	<i>B. diazoefficiens</i>	Cepa de referencia
GRK308	<i>B. diazoefficiens</i>	Mutante de la cepa USDA110, deficiente para la expresión de <i>nirK</i>
GRC131	<i>B. diazoefficiens</i>	Mutante de la cepa USDA110, deficiente para la expresión de <i>norC</i>

GRZ3035	<i>B. diazoefficiens</i>	Mutante de la cepa USDA110, deficiente para la expresión de <i>nosZ</i>
CPAC7	<i>B. diazoefficiens</i>	Cepa nombrada anteriormente SEMIA 5080
E109	<i>B. japonicum</i>	-
CPAC15	<i>B. japonicum</i>	Cepa nombrada anteriormente SEMIA 5079
SEMIA 5019	<i>B. elkanii</i>	-
SEMIA 587	<i>B. elkanii</i>	-
Az39	<i>Azospirillum brasilense</i>	-
ATCC17588	<i>Pseudomonas sutzeri</i>	-

Se utilizaron como cepas de estudio las cepas E109, CPAC15, CPAC7, SEMIA 5019 y SEMIA 587, que se encuentran registradas y autorizadas para la formulación de inoculantes en la República Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay. Como cepas de referencia se utilizaron las cepas USDA110 de *Bradyrhizobium diazoefficiens* y sus mutantes nulas para la ruta desnitrificante GRK308, GRC131, GRZ 3035 y fueron provistas por el Prof. Eulogio Bedmar del Laboratorio de Metabolismo del Nitrógeno, CSIC-EEZ, Granada (España).

Para el crecimiento y mantenimiento de los cultivos bacterianos en condiciones de vida libre se utilizó de manera rutinaria el medio PSY suplementado con 0,1% de arabinosa (Regensburger y Hennecke 1983). Los antibióticos que se adicionaron en este medio de cultivo fueron: cloranfenicol (15 µg ml⁻¹); dihidrocloruro de espectinomicina (200 µg ml⁻¹), sulfato de estreptomina (200 µg ml⁻¹) y vancomicina (25 µg ml⁻¹).

4.2.2 Análisis funcional *in silico* de la ruta de la desnitrificación por RAST y KEGG

Se analizaron las rutas de la desnitrificación de las cepas en estudio y se comparó con las rutas de las cepas USDA 110 (Kaneko et al. 2010), utilizando los previamente mencionados KEGG [<http://www.genome.jp/kegg/>] y RAST [<http://rast.nmpdr.org/>].

4.2.3 Caracterización molecular de las cepas del género *Bradyrhizobium*

4.2.3.1 Amplificación del gen 16S rRNA

La caracterización molecular se llevó a cabo utilizando métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El gen 16S rRNA se amplificó utilizando los oligonucleótidos fD1 y rD1 que son específicos para rizobios. Los productos de amplificación fueron suplementados con solución de carga (40% sacarosa, 0,25% azul de bromofenol) y Gel Red (20 µl/ml). Para la preparación de los geles se utilizó agarosa al 0,7% preparados en solución tampón TBE (trizma base, 10 g/l; ácido bórico 5,5 g/l y EDTA, 0,90 g/l, pH 8.5). Como marcador de peso molecular se utilizó el denominado Molecular Marker III (Roche). En los geles se comprobó la presencia de una banda de ADN de tamaño molecular aproximado de ~ 1.500 pares de bases (pb) y se evidenció este resultado con fotografía en luz UV. La electroforesis se realizó empleando una corriente continua de 70 V.

4.2.3.2 Análisis génico múltiple (MLSA): Amplificación de los genes *atpD*, *recA* y *glnII*

Puesto que la elevada similitud de las secuencias de los genes 16S rRNA de las especies de *Bradyrhizobium* no permiten, con frecuencia, establecer su filogenia con claridad, los estudios de identificación molecular se completaron con la amplificación y secuenciación de los genes esenciales *atpD*, *recA* y *glnII* utilizando las parejas de oligonucleótidos *atpD* 255F/*atpD* 782R, *recA*41F/640R, y *glnII*12F/689R, respectivamente (Vinuesa et al. 2005). Los productos de la amplificación se verificaron mediante electroforesis en geles de agarosa (1%), comprobándose la presencia de una banda de ADN de tamaño molecular aproximado de 550 pb, de 700 pb y de 600 pb que corresponden a los tamaños moleculares de los productos de los genes *atpD*, *glnII* y *recA*, respectivamente. Estos productos se purificaron mediante el producto comercial QIAquick PCR Product Purification Kit (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante y, finalmente, se cuantificaron utilizando un espectrofotómetro de tipo Nanodrop.

4.2.3.3 Secuenciación de ADN y análisis bioinformático de las secuencias

El producto de PCR obtenido se secuenció en un secuenciador automático del Servicio de Secuenciación de ADN de la Estación Experimental del Zaidín (Agencia Estatal CSIC). Las secuencias parciales obtenidas del gen 16S rRNA se compararon con las depositada en el EzTaxon-e (Kim et al. 2012) y la búsqueda de secuencias similares a las de los genes *atpD*, *glnII* y *recA* se realizaron con la ayuda de los programas informáticos disponibles a través de Internet utilizando los servicios del NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) y del EBI

(<http://www.ebi.ac.uk/>). El programa Clustal W (Thompson et al. 1997) se utilizó para el alineamiento de la secuencias y para evaluar las distancias filogenéticas se empleó el modelo de dos parámetros de Kimura (1980). Los árboles filogenéticos se infirieron usando el método de máxima homología (ML) (Felsenstein, 1981) utilizando Mega5 (Tamura et al. 2011).

4.2.4 Identificación molecular de los genes *napA*, *nirK*, *norC* y *nosZ* en las cepas SEMIA 587 y 5019 de *B. elkanii*.

El aislamiento de ADN se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Fernández et al. (2008), después de cultivar las bacterias en el medio adecuado y se cuantificó su concentración utilizando un espectrofotómetro del tipo Nanodrop. Se realizó la amplificación de los genes *napA*, *nirK*, *norC* y *nosZ* de las cepas en estudio, utilizando oligonucleótidos específicos descritos por Correa Galeote et al. (2013). Los genes de la desnitrificación se amplificaron mediante el empleo de oligonucleótidos específicos diseñados a partir de las secuencias de los genes *napEDABC* (Delgado et al. 2003), *nirK* (Velasco et al. 2001), *norCBQD* (Mesa et al. 2002) y *nosRZDYFLX* (Velasco et al. 2004) que codifican las enzimas nitrato, nitrito-óxido nítrico- y óxido nitroso reductasa, respectivamente (Bedmar et al. 2005). El programa del termociclador de ADN (Thermo A 20 E9FU15R) se ajustó a las siguientes condiciones: (1) 95 °C / 5 min; (2) 5 ciclos de 95°C/1 min, comenzando con una temperatura de hibridación de 58°C/ 1 min, que se redujo en 1 ° C cada ciclo, 72°C durante 2 min; (3) 30 ciclos de desnaturalización a 95°C/ 1 min, primer annealing a 53°C/1min, luego 72°C/2 min;(4) una etapa de extensión final a 72°C/10 minutos. Las mezclas de reacción y las condiciones de PCR se ajustaron empleando ADN de *B. diazoefficiens* USDA110 como molde. El genoma de esta bacteria se ha secuenciado (Kaneko et al. 2012) y está disponible en Internet en diferentes bases de datos (ver en (<http://genome.microbedb.jp/rhizobase/>)). Las secuencias de los oligonucleótidos empleados se describen a continuación en la tabla 2.

Tabla 2. Descripción de los primers de oligonucleótidos, tamaño de amplificación y secuencia de los nucleótidos de los genes de la denitrificación (Fernández et al, 2008).

Gen de interés	Secuencia del primer	Tamaño esperado (bp)
<i>napA</i>	(5')-CATCATGACACGTTACCCG(3')	3000
	(5')-CATCGAAACCGCCTGATG(3')	

<i>nirK</i>	(5')-CGTCTAGTTGGTGTGGC(3')	1500
	(5')-CACTGCATCCCGTCATCAAA(3')	
<i>norC</i>	(5')-GCGCTCAACCGGCCTTATT(3')	500
	(5')-CGACAGGAATCAACCGGA(3')	
<i>nosZ</i>	(5')-GCTCCCGATCAGACCGATT(3')	2000
	(5')-CATGAGCGACAGCGACAA(3')	

4.2.5 Determinación de la actividad nitrato reductasa (NR) y nitrito reductasa (NiR) de *Bradyrhizobium* sp.

4.2.5.1 Curva de crecimiento en condiciones desnitrificantes.

Previo a las determinaciones de la actividad desnitrificante, se realizó una curva de crecimiento en condiciones de microaerobiosis. Esto se realizó con el objetivo de confirmar que los rizobios en estudio podrían crecer bajo estas condiciones, puesto que la cepa modelo (USDA 110) es capaz de desnitrificar en condiciones anaeróbicas y microanaeróbicas (Torres et al. 2011). La curva se realizó en tubos de ensayo de 17 ml con 3 ml de medio PSY (Regensbrugger y Hennecke, 1983) suplementado con 0,1% de L-arabinosa y se agregó la suspensión bacteriana con DO₆₀₀ inicial: 0,1, se sellaron herméticamente con tapones de goma y gasearon con nitrógeno al 98%. Posteriormente se llevaron a incubación a 30°C y se mantuvieron en agitación a 170 rpm determinando la densidad óptica (DO₆₀₀) de los cultivos cada 24 horas hasta alcanzar la fase estacionaria.

4.2.5.1 Actividad nitrato y nitrito reductasa.

Se determinó mediante la detección colorimétrica del nitrito producido (actividad nitrato reductasa) o consumido (actividad nitrito reductasa) siguiendo la metodología descrita en Sánchez et al. (2010) después de cultivar las bacterias en condiciones desnitrificantes (adición de 10 mM de nitrato y limitación de oxígeno al 1%). La detección de nitrito se llevó a cabo mediante la reacción colorimétrica de diazotación (Nicholas y Nason, 1957).

4.2.5.1.1 Determinación de actividad nitrato reductasa (NR)

La determinación de actividad nitrato reductasa se realizó mezclando 200 μ l de suspensión celular (0,3-0,5 mg de proteína) y 250 μ l de mezcla NR (40 ml de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5); 20 ml de KNO₃ 100 mM, 20 ml de metil viológeno 2 mM y 20 ml de agua destilada). Luego se inició la reacción adicionando 50 μ l de ditionito sódico 46 mM en Tris/HCl 500 mM pH 7,5 (8 mg.ml⁻¹). Se mezcló suavemente e inmediatamente se incubó a 30 °C durante 15-30 minutos. Los controles se obtuvieron agitando las mezclas de reacción vigorosamente en el momento de la adición del ditionito sódico hasta la completa desaparición del color azul producido por éste.

4.2.5.1.2 Determinación de actividad nitrito reductasa (NiR)

La determinación de actividad nitrito reductasa se realizó determinando la desaparición de nitrito en el medio de reacción, Para ello se mezclaron 200 μ l de suspensión celular (0.3-0.5 mg de proteína) y 250 μ l de mezcla NIR (40 ml de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), 20 ml de KNO₂ 1 mM, 20 ml de metil viológeno 2 mM y 20 ml de agua destilada). Luego se inició la reacción adicionando 50 μ l de ditionito sódico 144 mM disuelto en NaHCO₃ 300 mM (30 mg/ml). Se mezcló suavemente e inmediatamente incubó a 30 °C manteniendo la reacción por 15-30 minutos. Los controles se obtuvieron agitando las mezclas de reacción vigorosamente en el momento de la adición del ditionito sódico hasta la completa desaparición del color azul producido por éste. Para la valoración del nitrito se utilizó la reacción de diazotación de Griess-Yllosway que emplea la sulfanilamida y el ácido N-naftil-etilén-diamino (NNEDA) como reactivos. La cuantificación se realizó determinando la absorbancia a 540 nm de longitud de onda. La curva patrón de nitrito se preparó a partir de concentraciones conocidas de KNO₂ en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5).

4.2.6 Producción de óxido nítrico (NO) de *Bradyrhizobium* sp.

La producción de NO por las diferentes cepas de *Bradyrhizobium* sp. en las células cultivadas en condiciones desnitrificantes (condiciones descritas ítem 4.2.5.1) se evaluó por la utilización de un electrodo específico de NO (Apolo 4000, World Precision Instruments, Inc.,

EE.UU.) con un baño termostatzado a 30°C y agitación magnética. El electrodo de membrana cubierta se situó en la parte inferior de la cámara por encima del agitador. Para los ensayos la cámara se llenó con 1,8 ml de solución tampón y 100 µl de suspensión celular concentrada (2-3 mg.ml⁻¹ de proteína). Después de que las células se habían consumido el oxígeno presente, se añadieron a la cámara con una jeringa Hamilton 90 µl de succinato sódico 1 M, 30 µl de NaNO₂ 100 mM y así se determinó la producción de NO.

4.2.7 Producción de N₂O

Se cuantificó a partir de cultivos en medio líquido PSY libre de fuente de nitrato dispuestos en botellas de 100 ml PYREX®. Para garantizar condiciones de anaerobiosis, las botellas fueron selladas herméticamente con tapón de goma y gasearon con nitrógeno al 98%. Para el ensayo se emplearon cultivos con una densidad óptica inicial de 0,1 y se tomaron alícuotas del espacio de cabeza de cada frasco con jeringa de 1ml de capacidad e inyectadas en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard modelo 5890 (Agilent Technologies, S.L.) equipado con un detector de conductividad térmica y una columna Molecular Sieve 5A con temperaturas de inyector y detector de 110°C y 60°C, respectivamente. La cuantificación de este gas se realizó cada 72 horas hasta obtener una producción constante. Para calcular la concentración de N₂O se realizó una curva de calibración y se determinó la cantidad de proteína, de acuerdo con las condiciones descritas por Sánchez et al. (2010).

4.3 Resultados

4.3.1 Análisis *in silico* de la ruta de la desnitrificación de *Bradyrhizobium* mediante las herramientas RAST y KEGG

La representación de las vías metabólicas relacionadas al metabolismo del nitrógeno y desnitrificación de RAST y KEGG para *B. japonicum* E109, CPAC15; para el draft genome de *B. elkanii* SEMIA 587 y para *B. diazoefficiens* USDA 110 y CPAC7 se resumen en la Tabla 3 y se esquematizan en las Figuras 4, 5 y 6.

Tabla 3. Análisis *in silico* de los principales genes de la ruta desnitrificante de las cepas E109, SEMIA 5019, SEMIA 587 y CPAC7 de *Bradyrhizobium* mediante RAST y KEGG.

Cepa	Gen			
	<i>napA</i>	<i>nirK</i>	<i>norC</i>	<i>nosZ</i>
<i>B. diazoefficiens</i> USDA 110	+	+	+	+
<i>B. diazoefficiens</i> CPAC7	+	+	+	+
<i>B. japonicum</i> E109	+	+	+	-
<i>B. japonicum</i> CPAC15	+	+	+	-
<i>B. elkanii</i> SEMIA 587*	-/*	-/*	-/*	-/*

(+) Presencia; (-) Ausencia

* Análisis de acuerdo al draft Genome para SEMIA 587 anotado en la plataforma RAST

-/* Ausente o secuencia no anotada por no tener secuenciado el genoma completo.

Las Figuras 4, 5 y 6 describen las posibles rutas y las secuencias codificantes encontradas para cada cepa, representadas como cajas verdes en el flujo metabólico. Para el proceso de la desnitrificación, se puede observar que para el paso inicial de la reducción de nitrato a nitrito, la cepas cuentan con la secuencia que codifica para la actividad de la enzima nitrato reductasa (E.C. 1.7.99.). Así mismo, la gráfica muestra que a partir del nitrito y por medio de la enzima nitrito reductasa (conteniendo cobre) (E.C 1.7.2.1) se obtiene el óxido nítrico. Sin embargo, se puede apreciar que el modelo no presenta secuencias codificantes para completar el proceso hasta llegar a nitrógeno (N₂) (Caja 1.7.2.4 sin color verde), por lo que inicialmente puede representar que estas cepas emiten, al menos en vida libre, NO y N₂O pues no puede realizar la desnitrificación completa. Estos resultados también fueron encontrados en la plataforma en el draft genome anotado para SEMIA 587. Para el caso de SEMIA 5019 no se encontraron secuencias anotadas disponibles.

En contraste se observaron todos los genes que codifican para la ruta desnitrificante para la cepa de referencia USDA110 y para CPAC7, incluyendo la enzima óxido nítrico sintasa (E.C 1.7.2.4 en color verde) y obteniendo como producto final el nitrógeno; siendo las únicas cepas de este estudio que presentaron a nivel *in silico* la ruta completa.

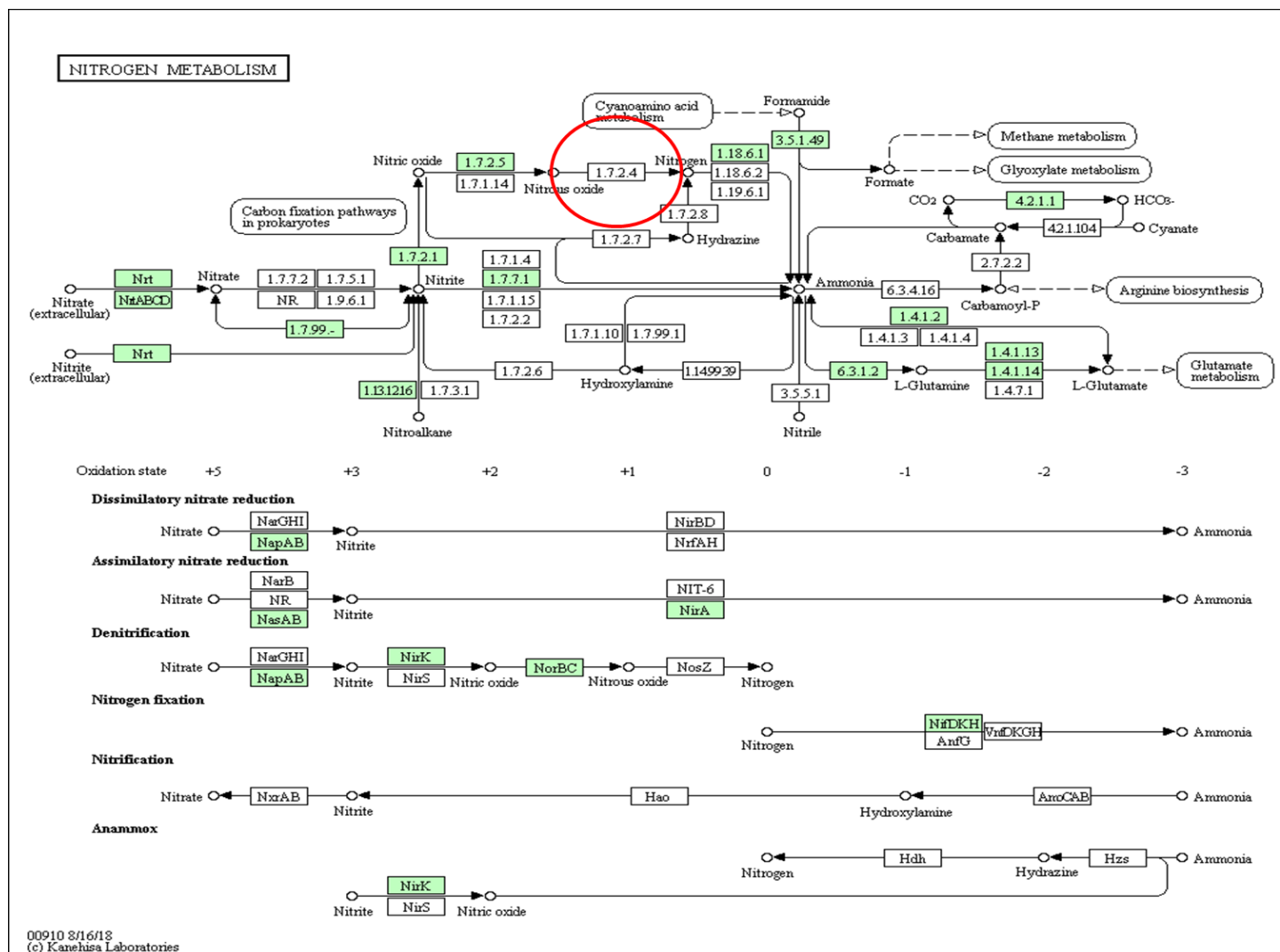


Figura 4. Vías metabólicas relacionadas al metabolismo del nitrógeno y desnitrificación de acuerdo al diagrama de KEGG. Las cajas verdes representan las secuencias codificantes identificadas en el genoma de *B. japonicum* E109 y CPAC 15.

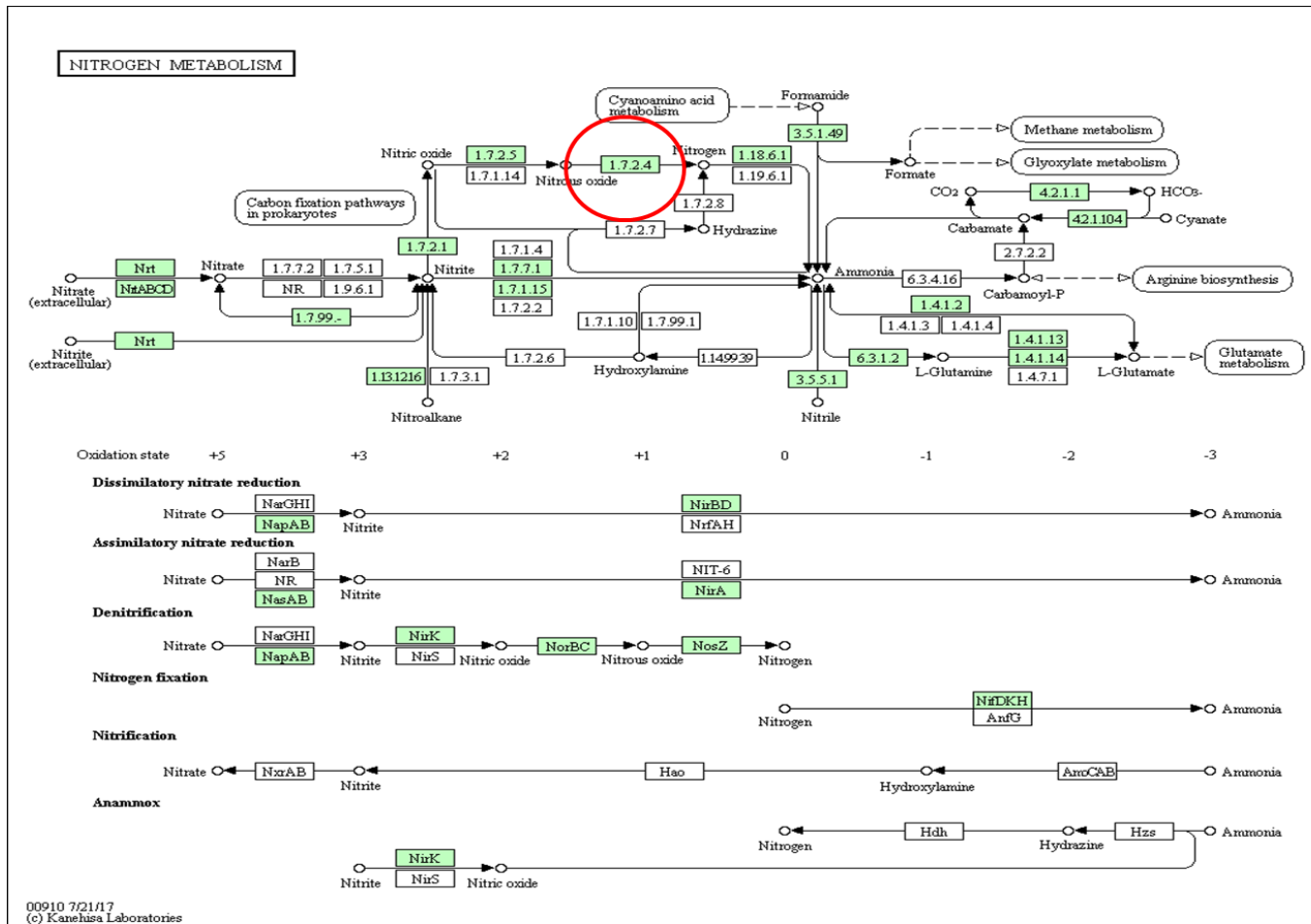


Figura 5. Vías metabólicas relacionadas al metabolismo del nitrógeno y desnitrificación de acuerdo al diagrama de KEGG. Las cajas verdes representan las secuencias codificantes identificadas en el genoma de *B. diazoefficiens* USDA 110 y CPAC7

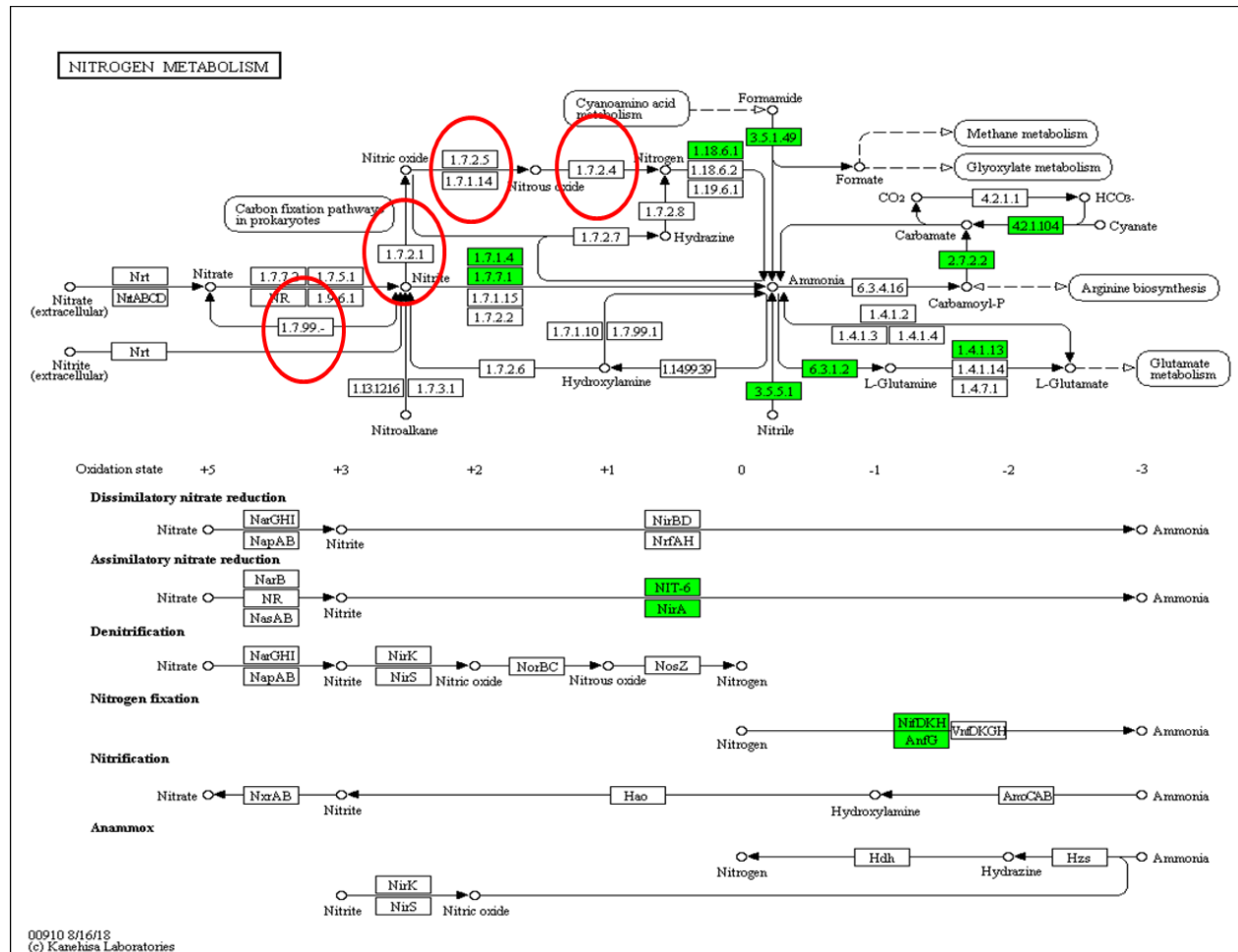


Figura 6. Vías metabólicas relacionadas al metabolismo del nitrógeno y desnitrificación de acuerdo al diagrama de KEGG. Las cajas verdes representan las secuencias codificantes identificadas en el draft genome de *B. elkanii* SEMIA 587.

4.3.2 Caracterización molecular de *Bradyrhizobium* sp.

4.3.2.1 Amplificación del gen 16S rRNA

El genoma de la cepa E109 de *B. japonicum* fue publicado nuestro grupo (Torres et al. 2015); mientras que los genomas de las cepas CPAC7 y CPAC 15 de *B. diazoefficiens* y *B. japonicum* respectivamente, fueron secuenciados un año antes por Siquiera et al. (2014). Por lo anterior, se realizó la caracterización molecular de estas cepas con el propósito de reconfirmar su identidad y se realizó la identificación de los genes de la desnitrificación para confirmar los datos obtenidos a nivel *in silico* y su correlación con la expresión de los genes ya mencionados. El empleo de los cebadores fD1 y rD1 permitió amplificar el gen 16S rRNA. La cepas SEMIA 587 y SEMIA 5019 presentaron 100% de similitud con *Bradyrhizobium elkanii* strain CCBAU 65727 y *Bradyrhizobium elkanii* strain CCBAU 65727; las cepas E109, SEMIA 5079 y SEMIA 5080 presentaron 100% de similitud con sus respectivos genomas (ver Anexo 1).

4.3.2.2 Amplificación de los genes *atpD*, *recA* y *glnII*

4.3.2.2.1 Análisis concatenado de secuencias amplificadas de los genes *atpD*, *recA* y *glnII* (MLSA)

El empleo de los cebadores *atpD* 273F y *atpD* 771R; *recA* 41F y *recA* 640R y *glnII* 12F y *glnII* 689R permitieron amplificar los genes *atpD*, *recA* y *glnII* de los rizobios en estudio. Los valores de similitud entre las secuencias de esta cepa con cepas del género *Bradyrhizobium* se muestran en la figura 7. La E109 99.15% de similitud con *B. japonicum* SEMIA 5079, de acuerdo a la amplificación de este gen. SEMIA 5080 se observa en un clado independiente entre *B. japonicum* y *B. diazoefficiens* USDA110. Por su parte, las cepas SEMIA 587 y SEMIA 5019 comparten un 100% de homología con *B. elkanii* USDA 76 T (AY599117). El análisis combinado de los tres genes housekeeping permitió confirmar la posición taxonómica de las cepas en estudio. Un árbol filogenético construido con las secuencias de *atpD*, *recA* y *glnII* se muestra en la figura 7 y en él se puede observar los valores de similitud para cada caso.

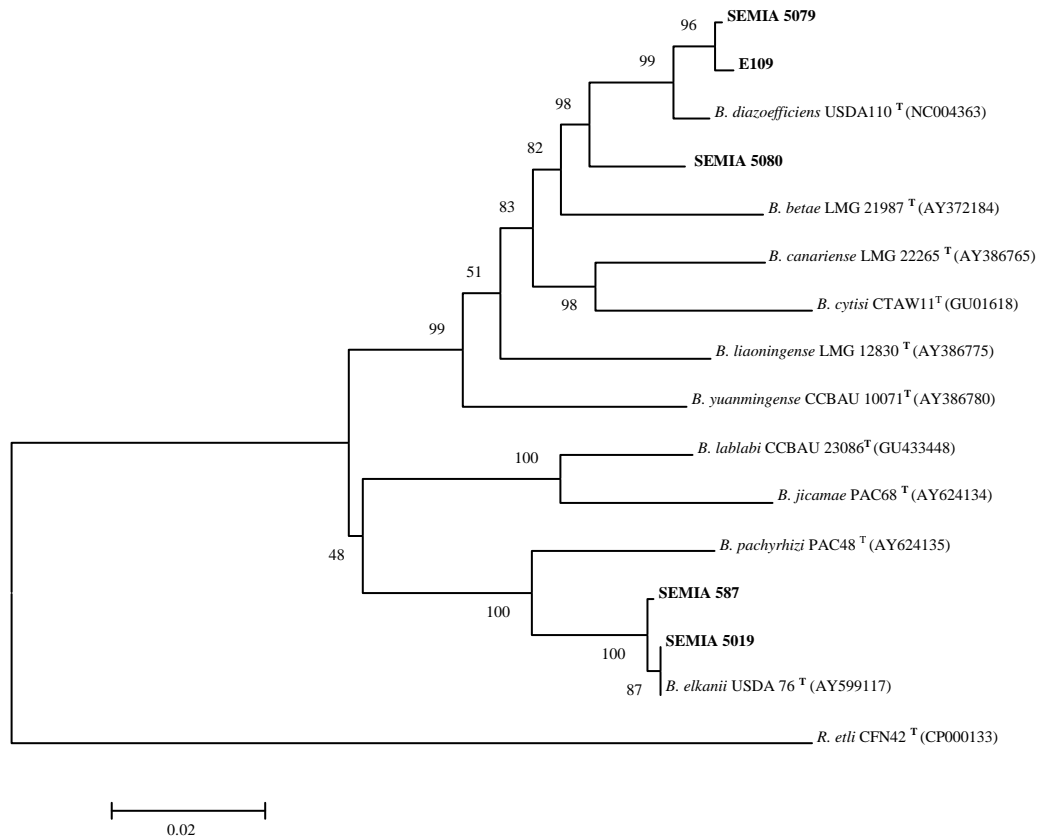


Figura 7. Árbol filogenético concatenado construido a partir de la secuencia de los genes *atpD*, *glnII* y *recA* (1190 bp) de las cepas SEMIA 587, SEMIA 5019, SEMIA 5079, SEMIA 5080 y E109 y especies filogenéticamente relacionadas con el género *Bradyrhizobium*. Los valores de Bootstrap están indicados como porcentaje derivado a partir de 1000 réplicas. Los valores por debajo de 70 no fueron mostrados. La raíz del árbol utilizada fue *Rhizobium etli*.

4.3.3 Identificación de los genes de la desnitrificación

4.3.3.1 Identificación de los genes *napA*, *nirK*, *norC* y *nosZ* de SEMIA 587 y 5019

Durante el desarrollo de este trabajo se secuenciaron y publicaron los genomas de las cepas SEMIA 5079 de *B. japonicum* y SEMIA 5080 de *B. diazoefficiens* a las que se las ha denominado CPAC 15 y CPAC 7 respectivamente (Siqueira et al. 2014), así como el de E109 de *B. japonicum* (Torres et al. 2015). A partir de esta información se conoce que sólo la cepa CPAC 7 presenta todos los genes de la ruta desnitrificante, mientras que CPAC 15 y E109 carecen del gen *nosZ*. Teniendo en cuenta este importante avance, en nuestro proyecto realizamos la identificación *in silico* de los genes de cada uno de estos genomas e *in vitro* de

los genes de las cepas de las que no se cuenta con el genoma secuenciado (SEMIA 5019 y SEMIA 587) (figura 8). Como un control positivo de la presencia de los genes de la desnitrificación se utilizó *B. diazoefficiens* USDA 110.

El empleo de los oligonucleótidos de fragmentos de los genes *napA*, *nirK* y *nosZ* de *B. diazoefficiens* cepa USDA 110 (Fernández et al. 2015) permitió amplificar y secuenciar los genes de la desnitrificación *napA*, *nirK* y *nosZ* de la cepa control (Figura 8). Para el caso de las cepas SEMIA 587 y 5019 no se observaron bandas de los productos de PCR amplificadas.

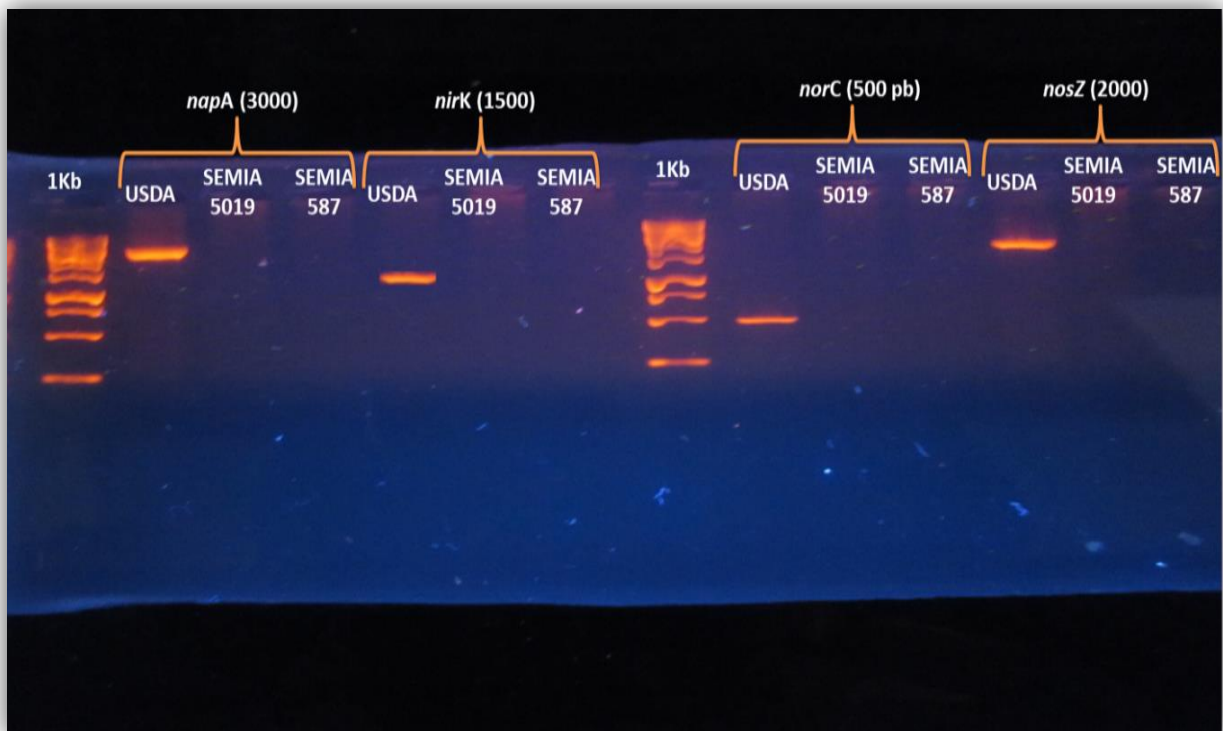


Figura 8. Productos amplificados de PCR de ADN genómico de las cepas SEMIA 5019 y SEMIA 587 para los genes *napA*, *nirK*, *norC* y *nosZ*

La Tabla 4 resume los resultados obtenidos para la identificación molecular de los genes *napA*, *nirK* y *norC* y *nosZ* en ambas cepas de *B. elkanii*.

Tabla 4. Identificación de los genes de la desnitrificación en *B. diazoefficiens* USDA 110 (control), SEMIA 5019 y SEMIA 587.

Cepa	Genes de la desnitrificación*			
	<i>napA</i>	<i>nirK</i>	<i>norC</i>	<i>nosZ</i>
<i>B. diazoefficiens</i> USDA 110	+	+	+	+
<i>B. elkanii</i> SEMIA 5019	-	-	-	-
<i>B. elkanii</i> SEMIA 587	-	-	-	-

*(+) Presencia; (-) Ausencia

Los resultados demostraron que las cepas SEMIA 5019 y SEMIA 587 de *B. elkanii* no presentarían los genes *napA*, *nirK*, *norC* y *nosZ*. Por lo tanto inferimos que bajo nuestras condiciones y de acuerdo a los resultados previos obtenidos a nivel *in silico*, estas cepas no presentan las secuencias de los principales genes implicados en la desnitrificación.

4.3.4 Curva de crecimiento en condiciones desnitrificantes de *Bradyrhizobium*

Como se muestra en la Figura 9, SEMIA 587, 5019, CPAC7, CPAC15 y E109 fueron inoculadas con una DO inicial (DO₆₀₀):0,01 y después de 7 d las cepas alcanzaron DO₆₀₀: 1,30.

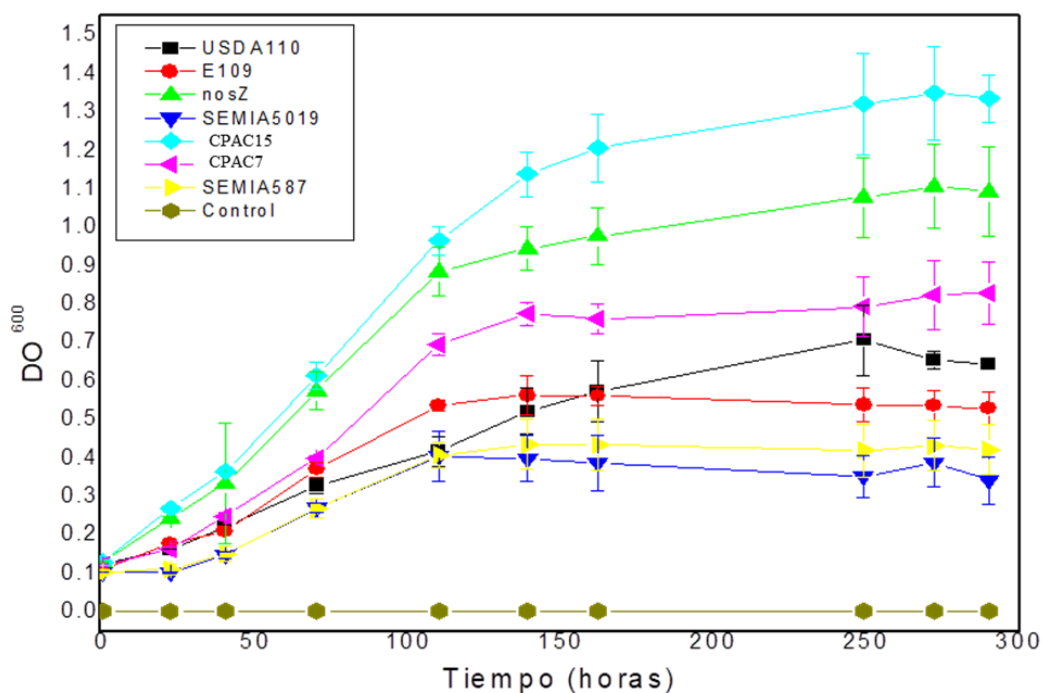


Figura 9. Curva de crecimiento en condiciones desnitrificantes para las cepas en estudio.

El crecimiento óptimo de las cepas en todos los casos permite inferir que bajo condiciones anaeróbicas (2% de oxígeno) las cepas de *Bradyrhizobium* en estudio pueden crecer utilizando el nitrato como única fuente de nitrógeno.

4.3.5 Determinación de la Actividad Nitrato Reductasa (NR) y Nitrito Reductasa (NiR)

Las actividades nitrato reductasa y nitrito se muestran a continuación en la Tabla 5.

Tabla 5. Actividad nitrato reductasa (NR) y nitrito reductasa (NiR) de las cepas en estudio.

Cepa	Nitrato Reductasa (nmol NO ₂ producido. h ⁻¹ / mg proteína)	Nitrito Reductasa (nmol NO ₂ ⁻ consumido . h ⁻¹ / mg proteína)
USDA 110*	5.52 ± 0.4	1.34 ± 0.2
E109	2.52 ± 0.5	1.23 ± 0.3
CPAC 15	7.04 ± 0.4	1.42 ± 0.2
CPAC 7	4.05 ± 0.3	1.10 ± 0.1
SEMIA 587	7.05 ± 0.4	0.92 ± 0.1
SEMIA 5019	4.05 ± 0.6	0.93 ± 0.1

Las actividades nitrato reductasa y nitrito reductasa fueron detectadas en todas las cepas. No obstante, se observó una mayor inducción de NR que de NiR (ver tabla 4). Para la actividad nitrato reductasa los valores oscilaron entre 2.52 ± 0.5 a 7.05 ± 0.4 nmol NO₂ producido x h⁻¹ x mg proteína⁻¹ para las cepas E109 y SEMIA 587, respectivamente. Los rangos de NiR estuvieron entre 0.92 ± 0.1 a 1.42 ± 0.2 nmol NO₂⁻ consumido/h x mg proteína para SEMIA 587 y CPAC15, respectivamente. Estas determinaciones indican que la expresión de los genes *napA* y *nirK* y la capacidad de metabolizar nitrato y nitrito en anaerobiosis están activos en todas las cepas estudiadas.

4.3.6 Producción de óxido nítrico (NO)

La producción de óxido nítrico por *Bradyrhizobium* sp. en medio líquido de cultivo y condiciones de *vida libre* se describe a continuación en la Tabla 6 y la Figura 10.

Tabla 6. Producción de NO en condiciones desnitrificantes a partir de nitrito.

Producción de óxido nítrico [nmol NO/mg.prot.hora ⁻¹]*	
Cepa	Producción
USDA 110	22,20 (f) ± 1,02
E109	61,94 (d) ± 0,95
SEMIA 5019	1665,59 (b) ± 16,12
CPAC15	11,28 (g) ± 0,54
CPAC7	33,35 (e) ± 1,21
SEMIA 587	7,85 (h) ± 0,17
GRZ3035	411,00 (c) ± 0,67
GRC131	3353,59 (a) ± 40,41*

*Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas en relación a cada variable evaluada de acuerdo a la prueba de Tukey HSD (p<0.05).

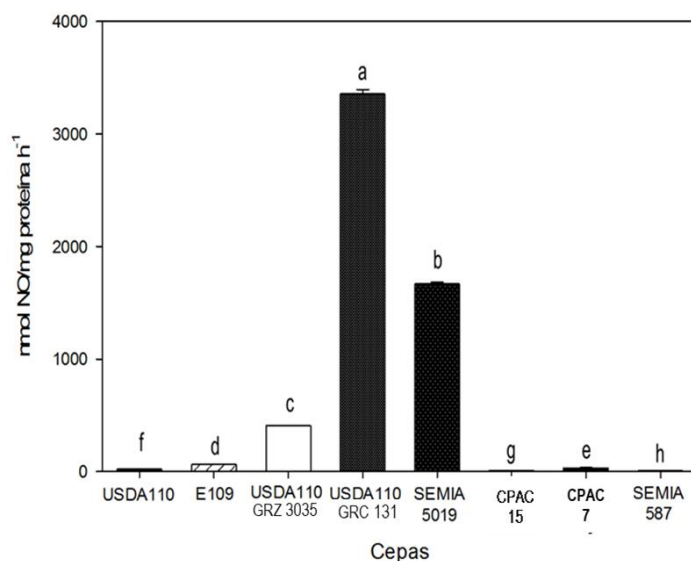


Figura 10. Producción de NO en condiciones desnitrificantes a partir de nitrito para *Bradyrhizobium*. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas en relación a cada variable evaluada de acuerdo a la prueba de Tukey HSD (p<0,05).

Como se observa en la Figura 10, la cepa control USDA110 presentó diferencias significativas respecto a las demás cepas evaluadas, mostrando muy poca producción de óxido nítrico ($22,20 \text{ nmol/mg.prot.hora}^{-1}$) en comparación con la cepa E109 quién produjo tres veces más NO ($61,94 \text{ nmol/ mg.prot.hora}^{-1}$). Para el caso de la mutante GRZ3035, produjo 18 veces más NO que la cepa control con $411,0 \text{ nmol/ mg.prot.hora}^{-1}$. Por su parte la producción de NO fue considerablemente mayor, con diferencias significativas para la cepa GRC131 ($3353,59 \text{ nmol/ mg.prot.hora}^{-1}$), la cual mutante nula para este mismo gen, por lo que permite inferir que es un gen esencial para la detoxificación del óxido nítrico en USDA 110.

4.3.7 Producción de óxido nítrico

La producción de óxido nítrico fue mayor en la cepa E109 y los valores más bajos fueron obtenidos por la cepa de referencia USDA 110. Los resultados de tales experimentos se muestran a continuación en la Tabla 7.

Tabla 7. Producción de óxido nítrico por las cepas en estudio de *Bradyrhizobium* sp.

Cepa	Acumulación de óxido nítrico ($\text{nmol N}_2\text{O h}^{-1}/\text{mg proteína}^{-1}$)
USDA 110*	0.15 ± 0.01
E109	41.42 ± 2.4
CPAC 15	12.59 ± 0.7
CPAC 7	0.19 ± 0.01
SEMIA 587	5.99 ± 0.06
SEMIA 5019	4.36 ± 0.01

La acumulación de óxido nítrico (N_2O) fue detectada después de 7 días de incubación. De las cepas en estudios los valores más bajos fueron 0.19 ± 0.01 para CPAC 7 y el más alto fue $41.42 \pm \text{nmol N}_2\text{O h}^{-1}/\text{mg proteína}^{-1}$ para E109. Como se mencionó anteriormente, el valor

obtenido para la cepa modelo (USDA 110) fue el más bajo en comparación con todas las cepas en estudio. No obstante, en la Tabla 6 se puede corroborar que las cepas con desnitrificación completa (USDA 110 y CPAC 7) mostraron valores mínimos de producción de N₂O, mientras que las cepas con desnitrificación incompleta (E109 y CPAC 15) presentaron previsiblemente los valores más altos de producción del gas. Nuevamente se encontró que las cepas SEMIA 5019 y SEMIA 587 produjeron óxido nitroso (NO), a pesar que la identificación molecular mostrara la ausencia de todos los principales genes de la ruta, estas cepas mostraron actividad en todas las pruebas realizadas.

4.4 Discusión

A nivel de la *amplificación del gen 16S rRNA* y *amplificación de los genes atpD, recA y glnII*: La secuenciación parcial del gen 16S rRNA, su alineamiento múltiple con las secuencias de las especies tipo de *Bradyrhizobium* depositadas en el EZTaxon-e (Kim et al. 2012), entre otras bases de datos, confirmó que todas las cepas pertenecen al género *Bradyrhizobium*, y las cepas con genoma secuenciado presentaron con un 100% de similitud con sus respectivos genomas. Para el caso de SEMIA 5019 y SEMIA 587 sus homologías fueron correspondientes con cepas de referencia para *Bradyrhizobium elkanii*. La filogenia del gen 16S de las especies de *Bradyrhizobium* está muy conservada por lo que, en general, su secuenciación no permite discernir entre especies (Vinuesa et al. 2005; Steenkamp et al. 2008; Chahboune et al. 2011). Los estudios de identificación molecular se completaron con la amplificación y secuenciación de los genes esenciales “housekeeping” *atpD, recA, glnII* (Vinuesa et al. 2005), los que constituyen una herramienta fundamental para encontrar las relaciones taxonómicas entre especies del género *Bradyrhizobium* (Rivas et al. 2004). La secuenciación de estos genes y su análisis concatenado destacó una especificidad mucho mayor en comparación con el análisis individual con 16S rRNA, confirmando su relación taxonómica y su especie para cada caso.

Análisis de la ruta de desnitrificación *in silico* a través de *RAST* y *KEEG*: De acuerdo a la información obtenida por RAST, en la que se describe el modelo metabólico de las cepas USDA 110, E109, CPAC 7 y CPAC 15 y el draft genome de SEMIA 587 se encontraron secuencias codificantes en toda la ruta para USDA110 y CPAC 7, mientras que para la cepa E109 y CPAC15 se evidenció que no presentan secuencias codificantes para el último paso de este proceso, mientras que para SEMIA 587 no se encontraron secuencias de la ruta. Para el

caso de KEEG, la información de las vías metabólicas de la desnitrificación confirmó lo obtenido mediante RAST. Con lo cual se infiere que E109 y CPAC 15 no pueden llegar a metabolizar el N_2O a N_2 , mientras que para SEMIA 587 y SEMIA 5019 se espera que no pueda metabolizar ningún subproducto de la ruta porque carece de la batería enzimática para reducir gases tipo NO_x .

Identificación de los genes de la desnitrificación. La amplificación se realizó mediante el empleo de oligonucleótidos específicos para *Bradyrhizobium*, diseñados a partir de las secuencias de los genes *napA*, *nirK*, *norC* y *nosZ*. Los resultados obtenidos confirmaron lo que se obtuvo preliminarmente a nivel *in silico*, pues sólo la cepa control USDA 110 y CPAC 7 presentan todos los genes de la ruta, mientras que CPAC 15 y E109 carecen del gen *nosZ*. Para el caso de las cepas SEMIA 5019 y SEMIA 587 se obtuvo que nivel molecular y a nivel *in silico* – para SEMIA 587, con draft genome disponible- que ambas cepas no presentaron los principales genes de la ruta. De acuerdo a estos resultados se observa claramente que a nivel de especie se presentó un patrón de presencia/ ausencia de algunos o todos los genes: para *B. diazoefficiens* se encuentran todos los genes; para *B. japonicum* todos excepto *nosZ* y para *B. elkanii* están ausentes todos los genes implicados en la ruta. La desnitrificación en los rizobios es escasa y cuando estos microorganismos llevan a cabo este proceso, muchos lo realizan de forma parcial o incompleta. Así mismo, la desnitrificación entre los rizobios es poco común y sólo algunas especies, entre ellas *B. diazoefficiens*, una microsimbionte de semillas de soja, se ha demostrado que reduce el nitrato a nitrógeno molecular (Bedmar et al. 2005). Se han descrito bacterias del Orden rizobiales y otros no rizobiales que sólo llevan a cabo una desnitrificación parcial o incompleta, ya que no poseen, o no expresan, el equipo enzimático necesario para llevar a cabo la desnitrificación. Por ejemplo, Monza et al. (2006) han descrito que en varios biotipos de *Mesorhizobium loti* se ha encontrado variación en el contenido de los genes de la desnitrificación, de manera que algunas sólo contienen genes *nir*, otras sólo genes *nor* y, unas terceras, sólo genes *nos*. Por su parte, *S. meliloti* 1021 no crece en microaerobiosis con nitrato o nitrito como aceptores finales de electrones aun cuando se han localizado genes homólogos de *nap*, *nir*, *nor* y *nos* de otras bacterias desnitrificantes. Otro reporte describe que *R. etli* CFN42 carece de los genes *nap* y *nos*, por lo que es incapaz de crecer en microaerobiosis con nitrato como único aceptor de electrones, y carece de actividad

nitrito reductasa (Bueno et al. 2005). Por su parte, *Chromobacterium violaceum*, *Pseudomonas aerofaciens* son bacterias carentes de óxido nítrico reductasa; *Wollinella succinogenes* posee óxido nítrico y óxido nítrico reductasas y *Campylobacter fetus* sólo contiene óxido nítrico reductasa (Zumft, 1997). De acuerdo a estos antecedentes reviste importancia caracterizar los genes implicados en este proceso y su posible expresión en las actividades enzimáticas involucradas en este proceso respiratorio.

Curva de crecimiento en condiciones desnitrificantes: La cepa USDA 110 presentó mayor adaptación a las condiciones microaerofilia junto con GRZ3035. No obstante, la cepa E109 creció satisfactoriamente bajo estas condiciones, es decir, estas bacterias pueden sobrevivir y asimilar el nitrato o nitrito del medio como aceptor final de electrones, lo que implica, que existe inducción de la expresión de los genes de la desnitrificación bajo estas condiciones para llevar a cabo el proceso de asimilación (Bedmar et al. 2005). La desnitrificación es una forma de respiración alternativa en ausencia o condiciones limitantes de oxígeno. En este proceso, los microorganismos pueden utilizar el nitrato y sus óxidos de nitrógeno derivados (NO_x) como aceptores de electrones en una cadena de transporte hasta la formación de nitrógeno molecular (N₂). La reducción de los NO_x está acoplada a la producción de ATP, lo que permite a la célula crecer en ausencia de oxígeno (Sánchez et al. 2010). Se ha demostrado la existencia de genes implicados en la desnitrificación en bacterias nitrificantes y se han descrito algunas especies del género *Paracoccus* capaces de desnitrificar en condiciones aeróbicas (Van spanning et al., 1997). Además, algunos hongos, como los del género *Fusarium* tienen también capacidad de desnitrificar (Kobayasi et al. 1996; Takaya, 2002).

Determinación de actividad nitrato reductasa (NR) y nitrito reductasa (NiR). En condiciones desnitrificantes se puede observar que la actividad nitrato reductasa fue mayoritariamente inducida en comparación con la actividad nitrito reductasa. La actividad nitrato reductasa se detectó en todas las cepas, teniendo una mayor actividad en la cepa modelo, que duplicó la actividad de la cepa E109. Por su parte, la cantidad de nitrito consumido fue inducida en todas las cepas, siendo los valores más altos para USDA 110, seguido de E109, GRZ 3035, SEMIA 587 y CPAC15. Sánchez et al. (2010), reportaron que las actividades NR y NiR dependientes de metil viológeno en condiciones desnitrificantes fueron hasta 10 veces más altas que las

observadas en ensayos en condiciones aeróbicas, encontrando que un 88% y 93% de la actividad NR y NiR fueron detectadas en condiciones de tensión de oxígeno y correspondió directamente a las actividades de las enzimas Nap y NirK, respectivamente, con lo cual se infiere que la producción y consumo de nitrito observado en nuestros experimentos expresan una inducción y activación de los genes *napA* y *nirK*.

Entre las enzimas principalmente implicadas en la síntesis de óxido nitroso dependiente de nitrito, se encuentran la nitrato reductasa y la nitrito reductasa (Besson-Bard et al. 2008), codificadas por los genes *napA* (Robles et al. 2006) y *nirK* (Sanchez et al. 2010). Por lo anterior, la determinación de estas actividades enzimáticas permite inferir la presencia de estos genes en todas las cepas en estudio. La reducción de nitrato a nitrito es catalizada por la enzima nitrato reductasa y codificada por el gen *napA* en *B. diazoefficiens* USDA 110 y células en vida libre mutadas en el gen *napA* fueron incapaces de reducir nitrato (Delgado et al. 2003, Hirayama et al. 2011).

Según Velasco et al. (2001), se ha demostrado que en *B. diazoefficiens* cepa USDA110, el gen *nirK* se requiere para la respiración en condiciones de anaerobiosis. En su estudio se demostró que la cepa mutante para este gen fue incapaz de crecer bajo condiciones anaeróbicas y con nitrato como única fuente de nitrógeno.

De acuerdo a esto y al análisis *in silico* para las cepas E109, CPAC 7 y CPAC 15 se podría deducir la presencia de este gen en el genoma de la bacteria. La habilidad para consumir el nitrito (actividad NiR) también evidencia la presencia de *norC*, como lo reporta Mesa et al. (2002), quienes demostraron que esta es una sub-unidad estructural para la reducción de NO a N₂O en *B. diazoefficiens* USDA 110. Así mismo, este grupo demostró que los mutantes nulos de la cepa USDA110 para el gen *norC* son defectuosos en condiciones de crecimiento anaeróbico por nitrato (NO₃⁻) y acumulan NO, lo que sugiere que este gen es fisiológicamente importante para la desintoxicación bacteriana del NO, al menos en condiciones de cultivo *in vitro*. Correlacionando el análisis *in silico*, la amplificación del gen *norC* y la actividad nitrito reductasa puede considerarse la presencia de este gen en todas las cepas analizadas.

A nivel de la *producción de NO y N₂O por las cepas de Bradyrhizobium sp.* Aunque la reducción del nitrato se considera como el sustrato iniciador de la desnitrificación, la

reducción del nitrito a NO se considera la reacción clave que define este proceso, ya que la reducción del nitrato puede ocurrir en microorganismos no desnitrificantes (Sánchez et al. 2010). Zumft, (1997), informó que el proceso de desnitrificación es la vía principal para la producción de óxido nítrico en bacterias de vida libre. Bajo nuestras condiciones experimentales, todas las cepas acumularon NO después de la adición de nitrito dentro de la cámara (ver Tabla 5 y Figura 10). La identificación de los genes y la producción de óxido nítrico por células de *Bradyrhizobium* sp. son una prueba confirmativa de la presencia y expresión de la enzima óxido nítrico reductasa (*norC*) y la acumulación excesiva de la cepa GRC131 (mutante para la expresión del gen *norC*) confirma que es un paso vital para la continuación del proceso desnitrificante. Con respecto a la alta producción de NO por la cepa GRC 131, se ha reportado que las células de *B. diazoefficiens* USDA 110, mutantes para los genes *nirK* o *norC* acumularon nitrito y óxido nítrico, respectivamente, cuando se cultivaron en condiciones anaeróbicas con nitrato como fuente de nitrógeno (Velasco et al. 2001). En todos los casos, hubo una activación de la enzima nitrito reductasa (Nir) y el gen *nirK* codificó esta actividad. Por otro lado, el óxido nítrico se ha descrito como un gas requerido para el establecimiento óptimo de la interacción simbiótica, dado su rol como segundo mensajero (Hichri et al. 2015).

Con respecto al óxido nitroso, la emisión de este gas confirma la presencia del gen *norC* y la expresión de la enzima óxido nítrico reductasa, que cataliza la reducción de NO a N₂O. La cepa USDA110, una cepa de desnitrificación completa, presentó los valores más bajos de producción de N₂O. Las cepas CPAC15 y E109 mostraron los valores más altos de producción de N₂O, excediendo hasta tres veces la producción por USDA110 e indicando la ausencia del gen *nosZ* (ver tabla 6). Sameshima-Saito et al. 2004, evaluaron la capacidad de desnitrificación de 65 cepas de *Bradyrhizobium* sp. de suelos japoneses mediante la metodología de detección de N₂ marcado con ¹⁵N y encontraron que más del 50% de los aislamientos no eran desnitrificadores completos. Sameshima-Saito et al. (2006), evaluaron la conversión de ¹⁵N-N₂O a ¹⁵N-N₂ y la actividad enzimática para la reducción del N₂O en USDA 110 y mutantes nulas para *nosZ* de USDA110, encontrando que la cepa wild type mostró actividad N₂O reductasa, mientras que el mutante *nosZ* no lo hizo. Por lo tanto, se infiere que la emisión de este gas por la mayoría de las cepas se ve directamente relacionada con la ausencia del gen *nosZ*. Por otro lado, Fernández et al. (2008), describieron la capacidad

de desnitrificación de los aislamientos de *Bradyrhizobium* sp. de cinco suelos cultivados con soja en Argentina. Este estudio mostró que 41 de los 250 aislados exhibieron un comportamiento típico de desnitrificadores respiratorios verdaderos. Este patrón se ha correlacionado con la desnitrificación completa y no es común en las cepas de rizobios, que carecen de la enzima óxido nítrico reductasa.

Como se observó a lo largo de todas las determinaciones, las cepas SEMIA 587 y SEMIA 5019 de *B. elkanii* presentaron actividades NR, NiR, producción de NO y N₂O. En contraste, el análisis *in silico* del draft genome y de la cepa USDA 76 de *B. elkanii* con genoma secuenciado y nuestros análisis moleculares (ver Figura 8) son concordantes y muestran la ausencia de los principales genes de la ruta desnitrificante en todos los casos. Nuestros resultados para estas dos cepas fueron realizados varias veces, con un número estadísticamente representativo de réplicas técnicas y acompañados de la cepa control. Los resultados de la actividad desnitrificante de estas dos cepas nos permiten inferir que los primers utilizados, aunque siendo específicos para el género *Bradyrhizobium*, no serían específicos para las secuencias de la ruta que presenta la especie *Bradyrhizobium elkanii*, por lo cual nos propusimos verificar su actividad desnitrificante en simbiosis con plantas de soja para corroborar estos resultados.

CAPÍTULO I I

5. ANÁLISIS DE LA RUTA DESNITRIFICANTE DE *Bradyrhizobium* sp. EN SIMBIOSIS CON SOJA

5.1 Introducción

La simbiosis soja- *Bradyrhizobium* es considerada una de las más eficientes en la fijación del N_2 y probablemente la más importante en importancia económica en todo el mundo (Hungria y Mendes 2015). La inoculación de soja ha sido una práctica agrícola común y extensiva en América del Sur durante más de 40 años, principalmente en Argentina y Brasil. Debido a que la especie es considerada exótica para nuestro país, junto con las semillas de soja, también se produjo la introducción de especies de *Bradyrhizobium* en el suelo (Ramos et al., 1987; Campos et al., 2001) y actualmente, las cepas más comúnmente encontradas en suelos sometidos a prácticas de cultivo son: *B. japonicum* E109 y CPAC15; *B. diazoefficiens* CPAC7 y *B. elkanii* SEMIA 587 y SEMIA 5019.

Las legumbres, un gran grupo de plantas capaces de crecer bajo diferentes condiciones edáficas y climáticas, forman una amplia familia llamada Fabaceae (Leguminosae) que comprende alrededor de 20.000 especies y 750 géneros con representantes en casi todos los biomas terrestres en la Tierra (Lewis et al. 2005). Junto con las plantas actinorrizales, las leguminosas son únicas entre las plantas superiores debido a su capacidad para establecer asociaciones simbióticas con bacterias del suelo fijadoras de N_2 , denominadas colectivamente como rizobios. La soja (*Glycine max* L.) es una leguminosa de alto interés agrícola, cultivada en todo el mundo, siendo Brasil y Argentina el segundo y tercer productor de soja a nivel global (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos). En 2017, ambos países fueron responsables de alrededor del 47% de la producción mundial total de soja, con un área sembrada en la temporada 2016/2017 de 33,9 y 19,6 millones de hectáreas, respectivamente (datos de la Bolsa de Cereales de Buenos Aires y la Compañía Nacional de Abastecimiento do Brasil, 2017). Se espera un aumento gradual en estas cifras en las temporadas futuras.

La soja establece asociaciones simbióticas con numerosos miembros del orden Rhizobiales. Estas asociaciones ocurren principalmente con especies del género *Bradyrhizobium*, aunque también se ha demostrado que *Ensifer* sp. y *Mesorhizobium* sp. son microsimbiontes de esta leguminosa (Peix et al. 2015). Muchas cepas bacterianas que nodulan leguminosas no realizan una desnitrificación completa. Hasta ahora, solo *B. diazoefficiens* (que anteriormente incluían algunas cepas de *B. japonicum*) ha demostrado contener y expresar el conjunto completo de genes de desnitrificación que conducen a la reducción de nitrato a N_2 (Bedmar et al. 2005; Bueno et al. 2012).

De acuerdo con los resultados previamente descritos en el Capítulo 1 de ésta tesis, todas las cepas excepto CPAC7 son desnitrificadoras incompletas y productoras significativas de N_2O . En este sentido Itakura et al, (2013), mencionaron que paulatinamente se ha esclarecido que los nódulos ocupados por cepas con desnitrificación incompleta podrían aumentar las emisiones de óxido nítrico y que la producción y acumulación de este gas es un proceso dominante a nivel nodular, especialmente en nódulos senescentes. Éste y múltiples reportes han soportado la evidencia de que existe una correlación directa en el aumento de las emisiones de este gas cuando las plantas de soja han sido inoculadas con rizobios carentes del gen *nosZ* (Duxbury et al. 1982; Bedmar et al. 2005; Okada et al. 2005, Sameshima-Saito et al. 2006b; Inaba et al. 2009; Hirayama et al. 2011, Itakura et al. 2012 entre otros) (Fig. 11).

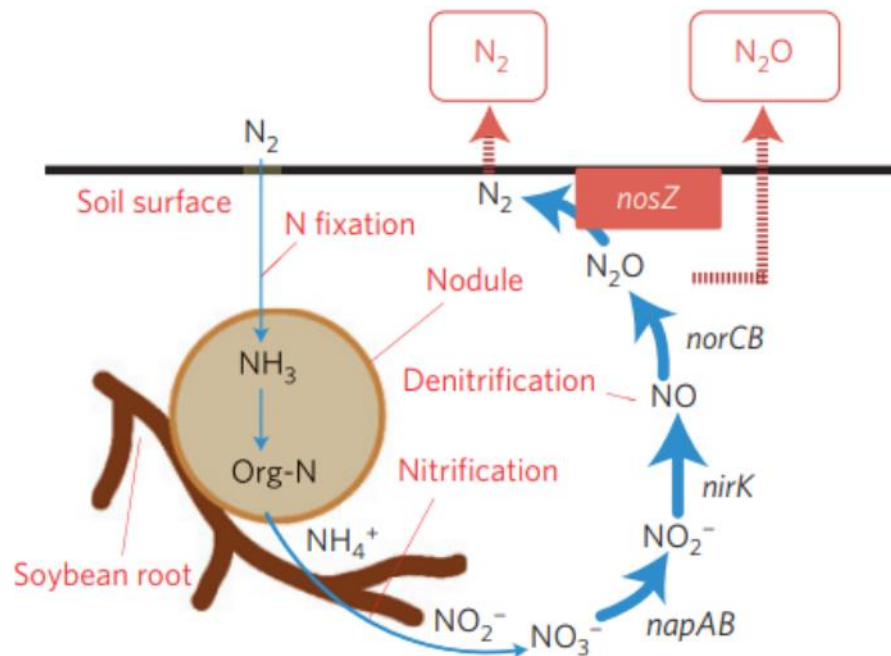


Figura 11. Descripción del modelo desnitificante en la interacción soja-*Bradyrhizobium*. Se describe el proceso de óxido-reducción de los óxidos de nitrógeno (NO_x) catalizados en cada paso por una enzima reductasa, la cual está codificada por los genes *napA*, *nirK*, *norC* y *nosZ*, siendo esta última fundamental para definir el producto final de la desnitrificación. (Modelo propuesto por Itakura et al. 2012)

El objetivo de trabajo mas importante incluido en este capítulo se relacionó con el análisis de la emisión de gases tipo NO_x por las cepas E109, CPAC 15, CPAC 7, SEMIA 587 y SEMIA 5019 en asociación simbiótica con plantas de soja y verificar si existe una correlación entre la capacidad desnitrificante, la especie bacteriana utilizada para la inoculación y las emisiones de gases que contribuyen con el calentamiento global.

5.2 Materiales y Métodos

Condiciones de cultivo bacteriano

Para el crecimiento y mantenimiento de los cultivos bacterianos, así como para el recuento y aislamiento de bacterias a partir de nódulos de soja inoculados con las diferentes cepas de *Bradyrhizobium* sp. se utilizó de manera rutinaria el medio PSY suplementado con 0,1% de arabinosa (Regesburger y Hennecke 1983). Los antibióticos que se adicionaron en este medio de cultivo fueron: cloranfenicol (15 µg ml⁻¹); dihidrocloruro de espectinomicina (200 µg ml⁻¹) y sulfato de estreptomicina (200 µg ml⁻¹); vancomicina (25 µg ml⁻¹). En el caso de *A. brasilense* Az39 se utilizó el medio Luria Bertani (LB) (Bertani et al. 1951) y el antibiótico utilizado fue ampicilina en una concentración de 100 µg ml⁻¹.

5.2.1 Producción de óxido nítrico (NO) de nódulos de plantas inoculadas con *Bradyrhizobium* sp.

Este ensayo se realizó con el objetivo de determinar la incidencia de inoculación de rizobios con desnitrificación completa e incompleta en relación con la fertilización nitrogenada a nivel de la producción de NO en nódulos de plantas de soja.

5.2.1.1 Condiciones de cultivo vegetal y diseño experimental

La variedad de soja utilizada fue Williams-82. Las semillas de soja se desinfectaron superficialmente usando etanol al 70% durante 1 minuto y peróxido de hidrógeno al 50% durante 7 minutos. Posteriormente, se lavaron con abundante agua destilada estéril, se colocaron en placas Petri que contenía agar agua al 1% y se incubaron en oscuridad a 30 °C durante 3-4 días hasta conseguir semillas con radículas de 1 cm de longitud aproximadamente. Las semillas pregerminadas se sembraron en jarras Leonard (3 semillas/jarra) rellenas de vermiculita y se inocularon de forma independiente con 1 mL (aproximadamente 10⁸

células/mL) de cada una de las cepas en estudio y se emplearon las cepas USDA 110 y GRC131 de *B. japonicum* como control. La parte inferior de las jarras Leonard contenía solución mineral de Rigaud y Puppo (1975) suplementada o no con 4 mM de KNO_3 y por ello denominados tratamientos fertilizados o no fertilizados con nitrato. Las jarras se mantuvieron en una cámara de cultivo de plantas bajo las siguientes condiciones: fotoperiodo de 16/8 h de luz/oscuridad, 26 °C/18 °C de temperatura día/noche y una humedad relativa del 70-75%. La parte inferior de las jarras que contiene la solución nutritiva se rellenó de acuerdo a las necesidades de crecimiento. A los 35 días de cultivo (10% de floración) las plantas se sacaron de las jarras y las raíces se lavaron con abundante agua estéril. Posteriormente, se separó la parte aérea de la raíz de cada planta, se secaron a 60 °C durante 48 h y se determinó el peso seco por planta.

El diseño experimental constó de dos partes: 1) Una puesta a punto para determinar *in situ* la incidencia de la presencia del nitrato en la cantidad de NO en el nódulo y la autofluorescencia nodular, y 2) Una determinación semicuantitativa de la producción neta de NO proveniente únicamente de los simbiosomas del nódulo (ver tabla 8).

5.2.1.2 Determinación de producción de NO *in situ* a nivel de los nódulos

Una vez que los nódulos se separaron de la raíz, se sumergieron en una solución secuestrante de óxido nítrico de c-PTIO conforme a la metodología de Shimoda et al. (2009). Para la detección de NO se utilizó el fluoróforo 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluoresceína (DAF-FM, Invitrogen). Los nódulos se incubaron en una solución diluida (1000x) de DAF-FM y 15 minutos de incubación a 25°C en oscuridad, y se analizó la fluorescencia de la solución en un fluorómetro (QM200, Photon Technology International). Se analizó la presencia *in situ* mediante un microscopio laser con focal (CLSM, por sus siglas en inglés) y se fotografiaron los nódulos según los siguientes tratamientos:

T1: Inoculación con la cepa modelo USDA 110 + Fertilización con 4mM KNO_3

T2: Inoculación con la cepa modelo USDA 110 + Fertilización sin 4mM KNO_3

T3: Inoculación con la cepa GRZ 3035 + Fertilización con 4mM KNO_3

T4: Inoculación con la cepa GRZ 3035 + Fertilización sin 4mM KNO_3

T5: Inoculación con la cepa E109 + Fertilización con 4mM KNO_3

- T6:** Inoculación con la cepa E109 + Fertilización sin 4mM KNO₃
- T7:** Inoculación con la cepa SEMIA 5019 + Fertilización con 4mM KNO₃
- T8:** Inoculación con la cepa SEMIA 5019 + Fertilización sin 4mM KNO₃
- T9:** Inoculación con la cepa SEMIA 587 + Fertilización con 4mM KNO₃
- T10:** Inoculación con la cepa SEMIA 587 + Fertilización sin 4mM KNO₃
- T11:** Inoculación con la cepa CPAC 15 + Fertilización con 4mM KNO₃
- T12:** Inoculación con la cepa CPAC15 + Fertilización sin 4mM KNO₃
- T13:** Inoculación con la cepa CPAC 7 + Fertilización con 4mM KNO₃
- T14:** Inoculación con la cepa CPAC7 + Fertilización sin 4mM KNO₃

5.2.2 Producción de N₂O

Producción de N₂O por la interacción soja-*B. japonicum* E109.

Los ensayos 5.2.2.1 y 5.2.2.2 se realizaron como parte de la puesta a punto de la medición de óxido nitroso en la interacción soja- *Bradyrhizobium*. Se utilizó la cepa E109 para estandarizar las condiciones y se realizó una curva de producción de N₂O, la cual determinará la máxima producción del gas y el tiempo estimado para llegar a esta emisión.

5.2.2.1 Producción de óxido nitroso por las raíces de soja.

Para la estimación de la producción de este gas se realizó un diseño experimental aleatorio en condiciones semi-controladas, el cual fue planteado con los siguientes tratamientos:

- T1:** Tratamiento sin inoculación rizobial (Control negativo)
- T2:** Inoculación con la cepa modelo USDA 110 (Control positivo)
- T3:** Inoculación con la cepa E109
- T4:** Inoculación con la cepa GRZ 3035 (Cepa USDA 110-mutante del gen *nosZ*)

5.2.2.1.1 Siembra e Inoculación.

Para este ensayo se utilizó la variedad de soja Williams 82. Las semillas de soja se desinfectaron superficialmente usando etanol al 70% durante 1 minuto y peróxido de hidrógeno al 50% durante 7 minutos. Posteriormente, se lavaron con abundante agua destilada estéril, se colocaron en placas Petri que contenían agar agua al 1% y se llevaron a incubación a 30°C/3-4 días hasta obtener semillas germinadas con 1 cm de radícula aprox. Se sembraron

por triplicado en jarras Leonard provistas de vermiculita/perlita en su parte superior y en la parte inferior una solución mineral (Rigaud y Puppo, 1975) con fuente de nitrato (NO_3K) a 4 mM. Las plantas se inocularon individualmente al momento del trasplante. El raleo se realizó a los 7 días, dejando 2 plantas por jarra. Las condiciones de la cámara de crecimiento fueron: fotoperiodo de 16/8 h de luz/oscuridad, 26 °C/18 °C de temperatura día/noche y una humedad relativa del 70-75%. La parte inferior de las jarras se rellenó de acuerdo a las necesidades del cultivo.

5.2.2.1.2 Determinación de la producción de N_2O en raíces noduladas de soja.

Las plantas se mantuvieron en la cámara hasta alcanzar el inicio de la floración (aprox. 35 días). Posteriormente se sacaron de las jarras y se lavaron y separó la parte aérea de la raíz de cada planta. Las raíces noduladas se transfirieron a botellas de 100 ml PYREX® y para garantizar condiciones de anaerobiosis, las botellas fueron selladas herméticamente con un tapón de goma con faldón de caucho. Las muestras fueron analizadas en un cromatógrafo de gases (Hewlett Packard 5890 Series II) provisto con una columna empacada a 60°C, temperatura del inyector 35°C y un detector de captura de electrones ^{63}Ni a 300°C. Se utilizó una mezcla de Argón-Metano al 5% como gas portador. La cuantificación de N_2O se realizó cada 72 horas hasta obtener una producción constante. Los resultados obtenidos (ppm) fueron utilizados como base de cálculo del contenido de nitroso expresado en $\mu\text{gN-N}_2\text{O/m}^2\cdot\text{h}$. Para ello se tuvo en cuenta el cambio en la concentración de N_2O con el tiempo, usando la ecuación:

$$f = (\Delta Q / \Delta t) \times (PV / RT) \times (1/A)$$

Donde: f es el flujo de gas ($\mu\text{g m}^{-2} \text{h}^{-1}$ en N_2O), Q es la cantidad de gas en la cámara al momento del muestreo (μg en N_2O), P es la presión atmosférica en la cámara (atm), V es el volumen de la cámara (L), R es la constante de gases ideales (0.08205 atm L mol⁻¹ K⁻¹), T es la temperatura de la cámara al momento del muestreo (°K) y A es el área de la cámara (m²). La pendiente dQ/dT podrá ser calculada usando regresión lineal o la ecuación de Hutchinson y Mosier (1981), según el comportamiento de cada caso particular.

5.2.2.2 Producción de óxido nítrico por los nódulos de soja.

Para la estimación de la producción de este gas se realizó un diseño experimental aleatorio en condiciones semi-controladas de acuerdo al descrito en el apartado 5.2.2.1.. En esta determinación se tomaron cuidadosamente los nódulos, se separaron de las raíces y se dispusieron en viales de 20 ml (SUPELCO®), se sellaron herméticamente y se realizó la cuantificación mediante cromatografía de gases, en la metodología descrita en el apartado 5.2.2.1.

5.2.2.3 Comparación de la emisión de N₂O en raíces noduladas de dos variedades de soja inoculadas con *Bradyrhizobium* sp.

Este ensayo se realizó para comparar la emisión de éste gas en la variedad de soja utilizada en ese momento en la investigación (var. Williams 82) utilizada mayoritariamente en América del Norte, con una variedad tradicionalmente utilizada a nivel agronómico en la República Argentina (var. Don Mario 4670).

Las condiciones de crecimiento bacteriano y la esterilización, siembra e inoculación de las semillas de soja se realizó de acuerdo a la metodología descrita en los ítems 5.2 y 5.2.1. Para el ensayo se realizó un diseño experimental aleatorio y en condiciones semi-controladas de cámara de cultivo, con 5 unidades experimentales por tratamiento, el cual fue planteado de acuerdo a los siguientes tratamientos:

T1: Inoculación de soja var. Williams 82 con *B. diazoefficiens* USDA 110.

T2: Inoculación de soja var. Williams 82 con *B. japonicum* E109.

T3: Inoculación de soja var. Williams 82 con *B. diazoefficiens* GRZ 3035.

T4: Inoculación de soja var. Don Mario 4670 con *B. diazoefficiens* USDA 110.

T5: Inoculación de soja var. Don Mario 4670 con *B. japonicum* E109.

T6: Inoculación de soja var. Don Mario 4670 con *B. diazoefficiens* GRZ 3035.

5.2.2.4 Producción de óxido nítrico de plantas inoculadas con *Bradyrhizobium*

Previa estandarización de las condiciones (ítems 5.2.2.1 y 5.2.2.2), se realizó la cuantificación de la producción de N₂O por las cepas objeto de estudio: CPAC7, CPAC15, E109, SEMIA 5019 y SEMIA 587. Las condiciones de crecimiento bacteriano y la esterilización, siembra e

inoculación de las semillas de soja se realizó de acuerdo a la metodología descrita en los ítems 5.2 y 5.2.1. Para el ensayo se realizó un diseño experimental aleatorio y en condiciones semi-controladas de cámara de cultivo, con 5 unidades experimentales por tratamiento, el cual fue planteado de acuerdo a los siguientes tratamientos:

T1: Inoculación con *B. diazoefficiens* USDA 110

T2: Inoculación con *B. japonicum* E109

T3: Inoculación con *B. elkanii* SEMIA 5019

T4: Inoculación con *B. japonicum* CPAC 15

T5: Inoculación con *B. diazoefficiens* CPAC 7

T6: Inoculación con la cepa *B. elkanii* SEMIA 587

T7: Inoculación con *B. diazoefficiens* GRZ 3035

5.3 Resultados

5.3.1. Detección de NO en nódulos de plantas inoculadas con *Bradyrhizobium* sp.

En plantas tratadas con nitrato, la detección fluorométrica de NO mostró que la emisión de fluorescencia por nódulos producidos por las cepas bradyrizobiales era variable, oscilando entre valores de $70 \pm 5,02$ a 787 ± 69 unidades de intensidad de fluorescencia relativa (UIFR) detectadas en las cepas USDA110 y la mutante GRC131, respectivamente (Tabla 8). Excepto por la cepa SEMIA 587, los valores de intensidad de fluorescencia por nódulos de las cepas restantes fueron más altos que los encontrados en los nódulos formados por USDA110 y más bajos que los del mutante GRC 131. La detección de óxido nítrico en nódulos de plantas de soja inoculadas con las cepas de *Bradyrhizobium* sp. anteriormente mencionadas se describe a continuación en las Figuras 12, 13 y 14 y en la Tabla 7 respectivamente.

La Figura 12 muestra el efecto de la adición de nitrato en la producción de óxido nítrico (NO) en nódulos de plantas de soja inoculadas con *Bradyrhizobium*, determinado con microscopía de barrido láser confocal (CLSM, por su siglas en inglés)

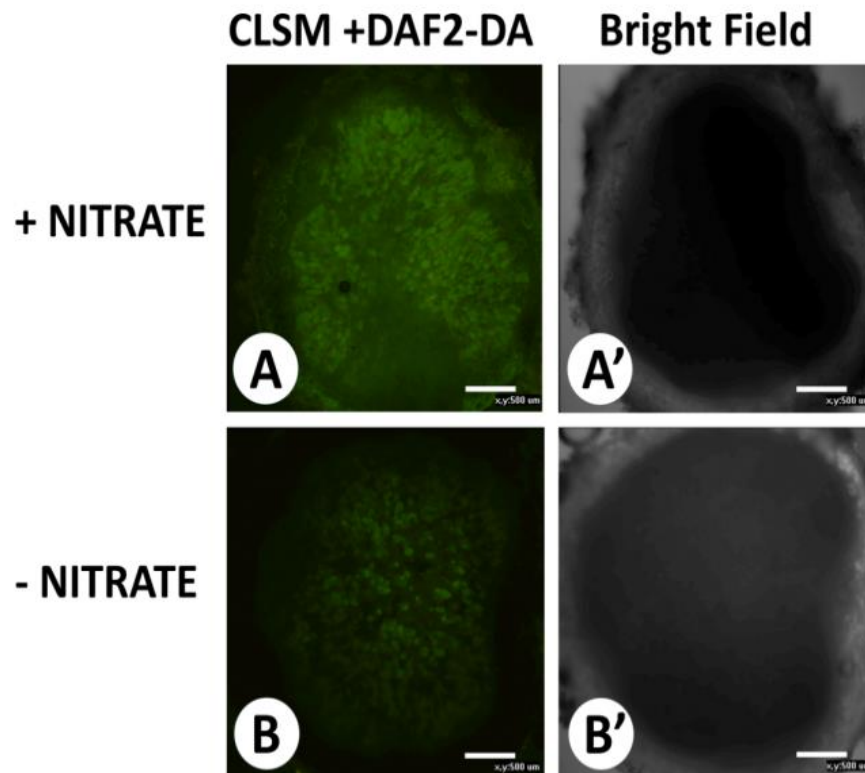


Figura 12. Efecto de la adición de nitrato en la producción de óxido nítrico (NO) determinado con microscopía de barrido láser confocal (CLSM) en cortes de nódulos de plantas de soja inoculadas con GRC131 (mutante para el gen *norC* de *B. diazoefficiens* – Control positivo para la producción de NO) y tratadas con DAF2-DA. A y B: Imágenes de CLSM A' y B': Campo claro en CLSM. Las barras representan 500 μm .

De acuerdo a la Figura 12, se observa la producción de óxido nítrico en cortes de nódulos de plantas de soja previamente inoculadas con cepa GRC131. La mayor producción de NO fue mayor cuando la planta tuvo fuente de nitrato en la fertilización (4mM de KNO_3)

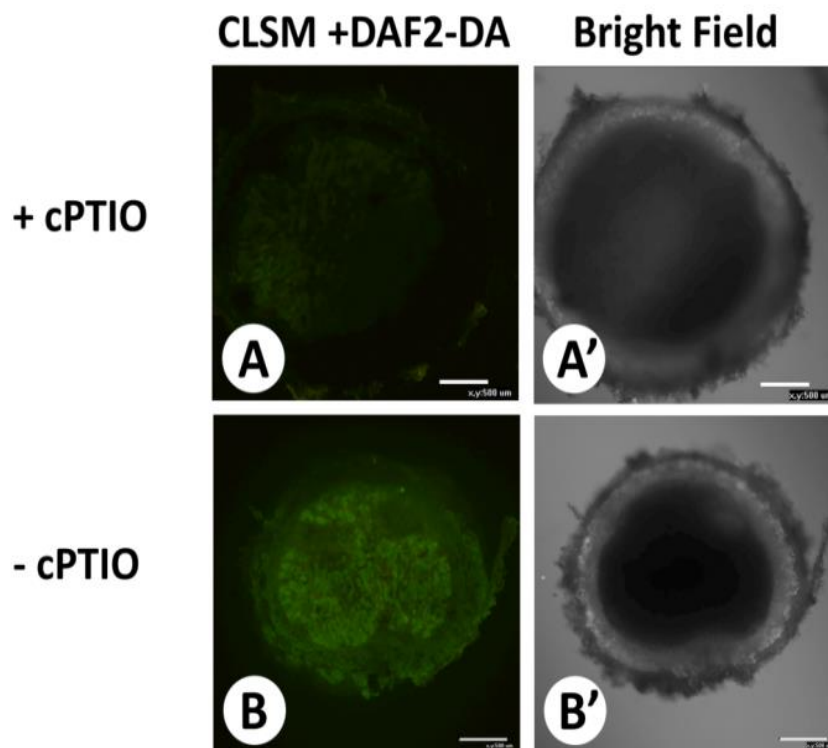


Figura 13. Efecto de la incubación previa con cPTIO (NO scavenger) y la producción de óxido nítrico (NO) determinado con microscopía de barrido láser confocal (CLSM) en cortes de nódulos de plantas de soja inoculadas con GRC131 (mutante para el gen *norC* de *B. diazoefficiens* – Control positivo para la producción de NO) y tratadas con DAF2-DA . A y B: Imágenes de CLSM A' y B': Campo claro en CLSM.Las barras representan 500 μ m. Nota: El valor de autofluorescencia fue descontado de todos los tratamientos y se discutirá sobre el valor neto obtenido.

En la Figura 13, se observa que en nódulo sometidos a incubación con cPTIO, producción de NO es más baja. Es decir, la autofluorescencia es capturada por el cPTIO y la producción propia de la interacción simbiótica se observa en la Figura 13A.

Tabla 8. Detección de óxido nítrico en nódulos de plantas de soja inoculadas con diferentes cepas de *Bradyrhizobium* sp.

TRATAMIENTO/CEPA INOCULADA*	Producción de óxido nítrico unidades de intensidad de fluorescencia relativa [UIFR]
USDA 110	70 ± 5,02
E109	148 ± 0,95
SEMIA 5019	447 ± 16,12
CPAC 15	114 ± 5,4
CPAC 7	298 ± 1,21
SEMIA 587	76 ± 4,3
<i>norC</i> GRC131	787 ± 69,2

*Los datos corresponden a la producción de NO para los tratamientos sin adición de nitrato y con DAF2-DA. Para los controles positivo y negativo se trataron con cPTIO (NO scavenger) y este valor se tuvo en cuenta para restar la autofluorescencia del nódulo en los demás tratamientos analizados.

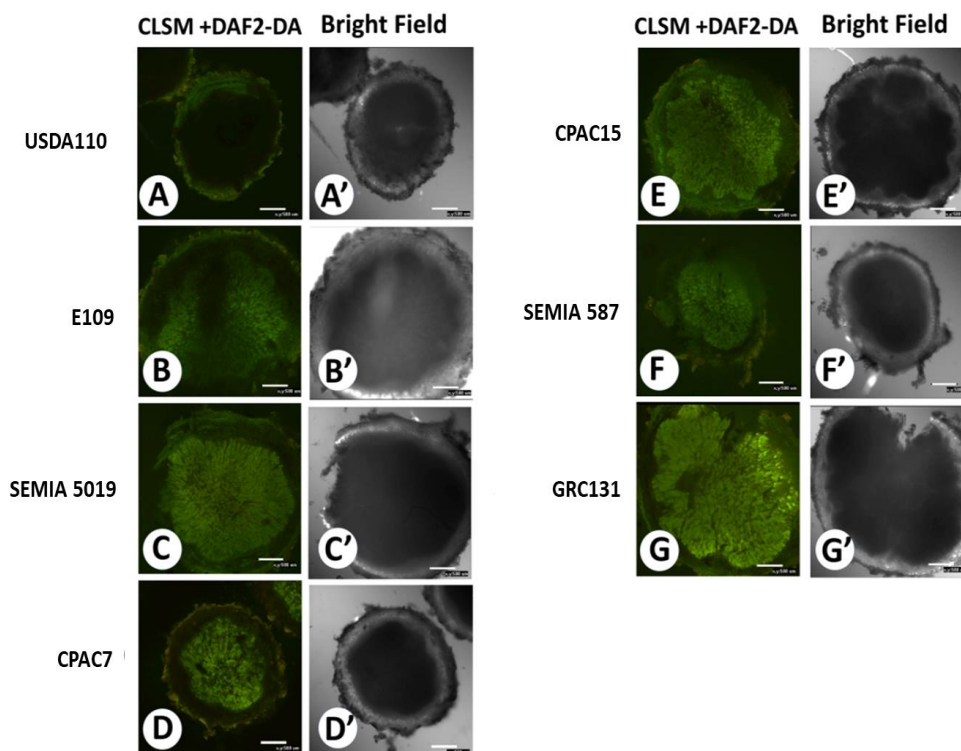


Figura 14. Imágenes de la producción de NO determinado con microscopía de barrido láser confocal (CLSM) en cortes de nódulos de plantas de soja inoculadas con las cepas de *B.*

diazoefficiens y *B. elkanii* y tratadas con DAF2-DA. A-G: Imágenes de CLSM A' y G': Campo claro en CLSM. Las barras representan 500 μm .

A modo de resumen y como se observa en las Figuras 12, 13 y 14, la producción de NO por parte de la cepa GRC131 presentó diferencias significativas respecto al resto de las cepas. Así mismo, se observó una importante producción en los cortes de nódulos de plantas inoculadas con la cepa SEMIA 5019, que también presentó los mayores valores de producción de NO en condiciones de *vida libre* en comparación con las demás cepas en estudio. Los cortes provenientes de plantas con inoculación de CPAC 7, E109, SEMIA 587 en su orden, presentaron valores de producción más bajos.

5.3.2. Producción de óxido nitroso (N_2O) en la interacción soja- *B. japonicum* E109

5.3.2.1 Producción de óxido nitroso por las raíces de soja.

La producción de óxido nitroso por las raíces de soja inoculadas con *B. japonicum* E109 en comparación con otras cepas de *Bradyrhizobium* sp. se describe a en la Figura 15.

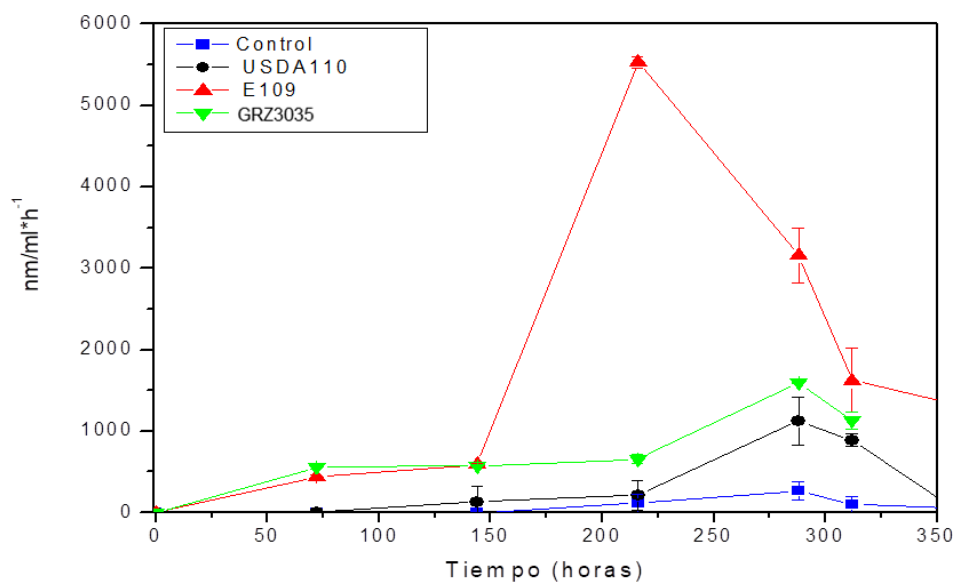


Figura 15. Producción de óxido nitroso (N_2O) por las raíces de soja [$\text{nmol}/\text{ml}\cdot\text{h}^{-1}$]. Tratamientos: T1 (Control sin inoculación); T2 (USDA110); T3 (E109); T4 (GRZ3035). Cada tratamiento representa el promedio de 3 mediciones independientes ($n=3$) y 3 réplicas experimentales extemporáneas).

Como se observa en la Figura 15, la producción de óxido nitroso tuvo los valores más altos en toda la curva en las raíces de plantas inoculadas con la cepa E109, la cual tuvo una producción máxima de $5,53 \times 10^3$ nmoles/ml.h a las 216 horas. Las raíces del tratamiento inoculado con GRZ3035 presentaron los valores máximos subsiguientes a las 288 horas con $1,60 \times 10^3$ nmoles/ml.h. Para el caso de USDA110 produjo a las 288 horas un valor máximo de emisión de $1,12 \times 10^3$ nmoles/ml.h⁻¹ siendo el tratamiento que menos valores de producción presentó a lo largo de la curva, junto con el control sin inoculación (planta sin formación de nódulos), la cual emitió valores entre $1,00 \times 10^2$ y $2,67 \times 10^2$ nmoles/ml.h, respectivamente.

5.3.2.2 Producción de óxido nitroso por los nódulos de soja.

La producción de óxido nitroso por las raíces de soja inoculadas con *B. japonicum* E109 en comparación con otras cepas de *Bradyrhizobium* sp. se describe en la Figura 16.

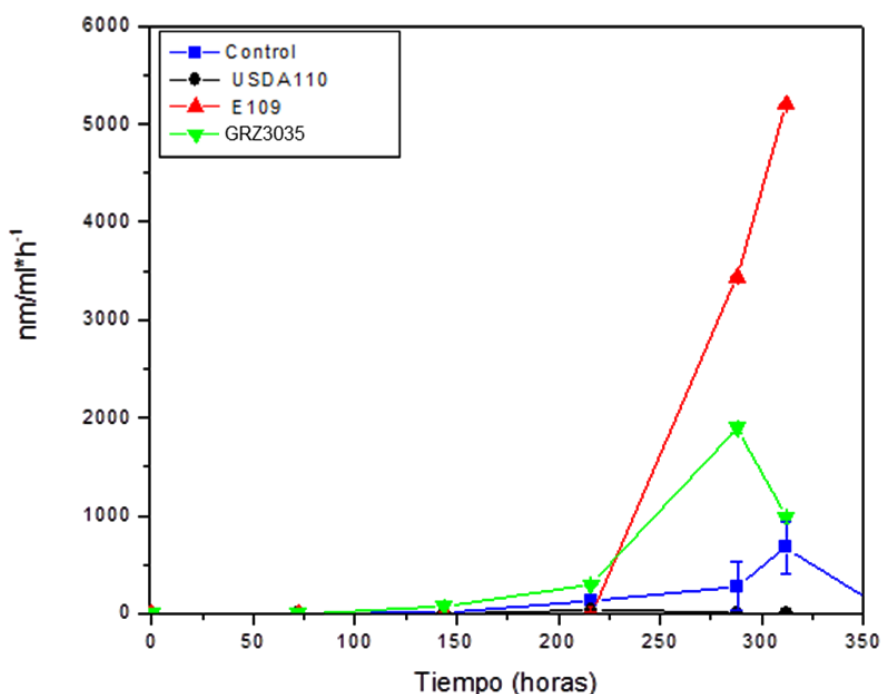


Figura 16. Producción de óxido nitroso (N₂O) por los nódulos de soja [nmoles/ml*h⁻¹]. Tratamientos: T1 (Control sin inoculación); T2 (USDA110); T3 (E109); T4 (GRZ3035). Cada tratamiento representa el promedio de 3 mediciones independientes (n=3) y 3 réplicas experimentales extemporáneas).

Como se observa en la Figura 16, y al igual que ocurrió a nivel de la cuantificación en raíces, la producción de óxido nitroso por los nódulos de soja tuvo los valores más altos en toda la curva en las raíces de plantas inoculadas con la cepa E109, produciendo un valor de producción de $5,20E+03$ nmoles/ml.h⁻¹ a las 312 horas. Aunque la producción respecto a los demás tratamientos comienza de manera tardía, los picos de producción son mucho más altos en los tres tiempos de muestreo. Seguidamente, las raíces del tratamiento inoculado con GRZ3035 (T4) presentaron los valores máximos a las 288 horas con $1,90E+03$ nmoles/ml.h⁻¹. Para el caso de USDA110 produjo a las 216 horas un valor máximo de emisión de $4,04E+01$ nmoles/ml.h⁻¹ siendo el tratamiento que menos valores de producción presentó a lo largo de la curva. Para el tratamiento control, se tomaron trozos de raíces sin nodulación, y la emisión máxima fue de $6,77E+02$ nmoles/ml.h⁻¹ a las 312 horas, atribuyendo su baja producción a la ausencia de nódulos en las raíces de soja de este tratamiento.

Con los resultados obtenidos en estos experimentos se pudo estandarizar el diferencial del tiempo en el que se produce la máxima cantidad de N₂O y se pudo inferir las tendencias de emisiones de los rizobios con posible desnitrificación completa o incompleta, de acuerdo a cada caso.

5.3.3. Producción de N₂O en nódulos de plantas de soja (Variedad Williams 82 y Don Mario) inoculadas con *Bradyrhizobium* sp.

En la Figura 17 se observa la producción de óxido nitroso de raíces noduladas de dos variedades de soja inoculadas con la cepa E109, un control positivo (GRZ3035) y un control negativo (USDA 110). Los resultados indican que hubo mayor producción de N₂O del tratamiento T5, el cual presentó la mayor producción de N₂O de todos los tratamientos analizados. Los tratamientos T2 y T6 presentaron el siguiente valor más alto de emisión y no presentaron diferencias significativas entre sí. T3, T1 y T4, en su orden, presentaron los siguientes valores más bajos en la producción de óxido nitroso.

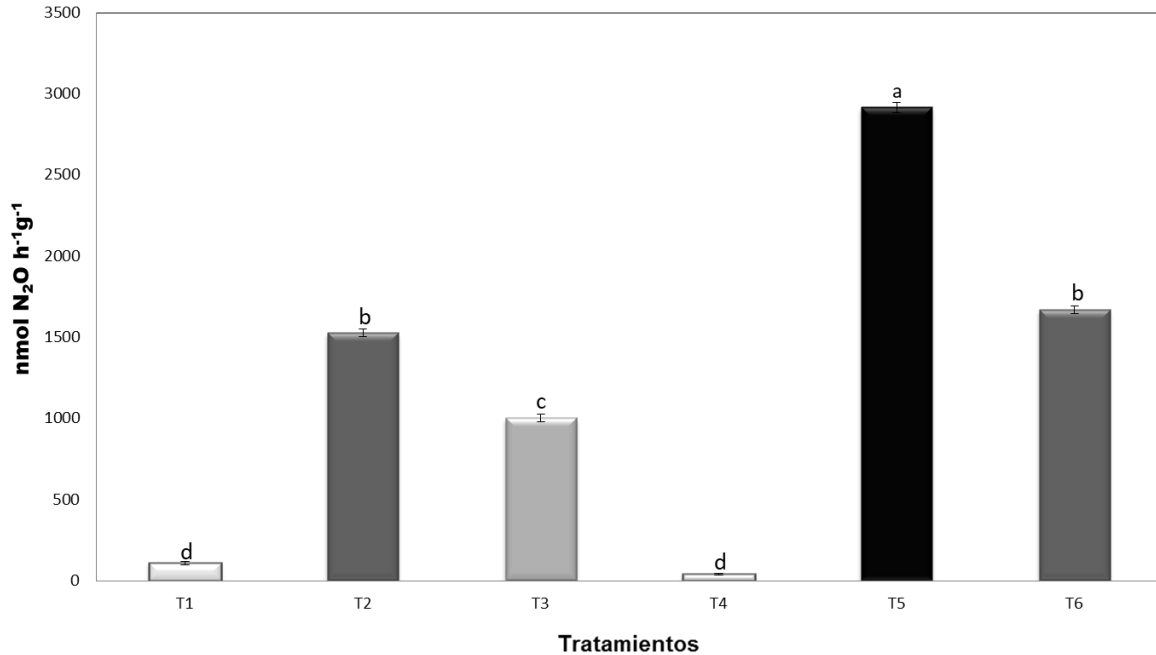


Figura 17. Producción de óxido nitroso (N₂O) de raíces de soja de las variedades Williams 82 (T1, T2 y T3) y Don Mario 4670 (T4, T5 y T6) inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. (T1) USDA110;(T2) E109; (T3) GRZ 3035; (T4) USDA110; (T5) E109; (T6) GRZ3035. Los valores se expresan como nmol de N₂O h⁻¹g⁻¹ y representan la media de 5 repeticiones seguida del error estándar. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas en relación a cada variable evaluada de acuerdo a la prueba de Tukey HSD (p<0.05).

Analizando la inoculación de cada rizobio frente a cada variedad empleada, se observa que los tratamientos inoculados con USDA110 no presentaron diferencias significativas en la emisión, mientras que la producción aumentó en raíces noduladas de plantas de soja de la variedad Don Mario tanto con inoculación con la cepa E109 (T5) como con la cepa GRZ3035 (T6). El objetivo de este experimento fue verificar si bajo las condiciones del presente estudio, la producción de N₂O de raíces de soja en las dos variedades inoculadas con E109 presentaría diferencias relevantes. Teniendo en cuenta que en la República Argentina se usa tradicionalmente la variedad de soja Don Mario y que la producción de este gas en ambas variedades estuvo dentro de los más altos (tratamientos T5 y T2). Se concluyó que la inoculación de la cepa E109 y el uso de la variedad Williams 82 (utilizada en el laboratorio donde se realizó esta parte de la tesis) sí permiten estimar la producción de GEI y que los

experimentos realizados con esta variedad aportan información significativa del papel de la cepa en su interacción con la soja.

5.3.4. Producción de óxido nitroso de plantas inoculadas con *Bradyrhizobium*

La producción de óxido nitroso en plantas inoculadas evidenció que existen diferencias en la producción de este gas cuando hubo inoculación con bacterias con desnitrificación completa e incompleta. Del mismo modo, se presentaron diferencias significativas en la producción de óxido nitroso de raíces noduladas inoculadas con la cepa control (USDA 110) y los demás tratamiento en estudio. Los resultados se muestran a continuación en la Figura 18.

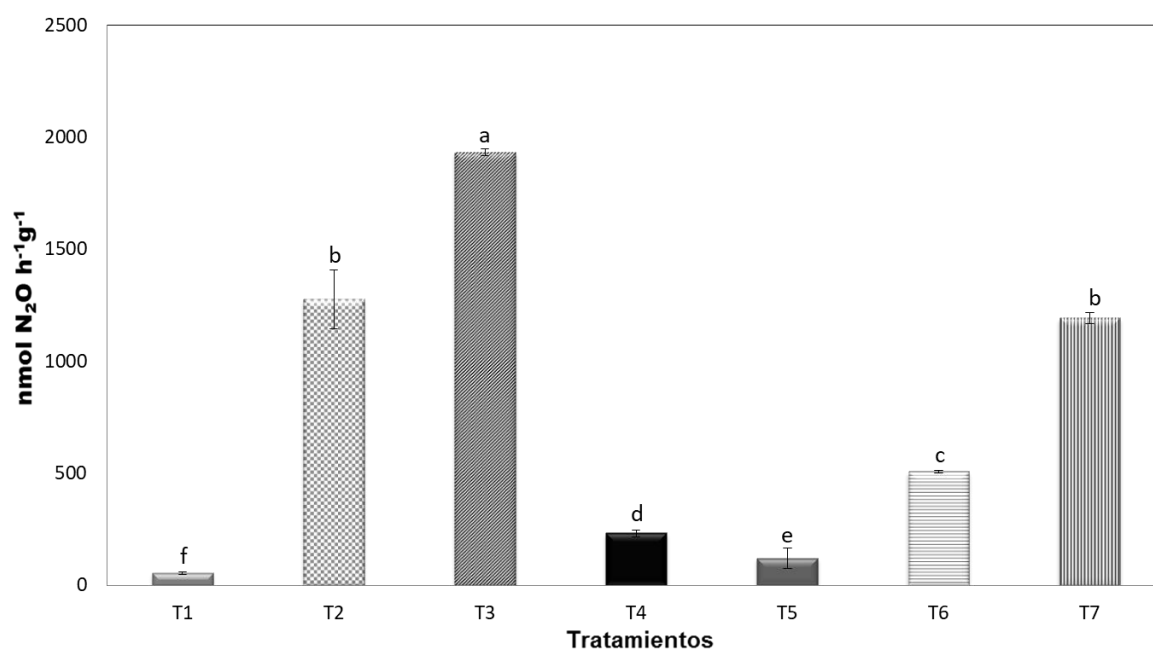


Figura 18. Producción de óxido nitroso (N₂O) de raíces noduladas de soja inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. (T1) USDA110; (T2) E109; (T3) SEMIA 5019; (T4) CPAC 15; (T5) CPAC 7; (T6) SEMIA 587; (T7) GRZ3035. Los valores se expresan como nmol de N₂O h⁻¹g⁻¹ y representan la media de 5 repeticiones seguida del error estándar. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas en relación a cada variable evaluada de acuerdo a la prueba de Tukey HSD (p<0.05).

En la Figura 18 se muestra que el tratamiento T3 presentó diferencias significativas en la producción de óxido nitroso (1933,32 nmol N₂Oh⁻¹g⁻¹) frente a los demás tratamientos

evaluados. Los valores más bajos fueron para T1 y T5, las cuales fueron inoculadas con las cepas USDA 110 y CPAC 7 de *B. diazoefficiens*, las cuales presentan desnitrificación completa. Como se demuestra en la figura 18. El tratamiento T7 inoculado con la mutante nula para el gen *nosZ* de USDA 110 presentó la segunda mayor producción del gas junto con la cepa E109, lo cual evidencia que la ausencia de este gen está directamente relacionado con el aumento de la producción de óxido nitroso.

5.4 Discussion

A nivel de la *producción de óxido nitroso por raíces y nódulos de diferentes variedades de soja*. La producción en ambas variedades de soja presentaron diferencias notables. Particularmente cuando se inoculó la variedad Don Mario 4670. Sin embargo, los resultados mantienen una tendencia similar cuando se utilizó la var. Williams-82, en donde se ha encontrado que la cepa E109 establece simbiosis y presenta valores mayores de emisión frente a USDA 110. En numerosos reportes se ha utilizado esta cepa de referencia y sus mutantes en diferentes variedades de soja y se ha evaluado la emisión de óxido nitroso en condiciones similares a las del presente estudio. Por ejemplo, se han realizado determinaciones similares en *Glycine max* cv. Enrei (Sameshima-Saito et al. 2006a; Hirayama et al. 2011) *Glycine max* L. (Yang y Cai. 2005) *Glycine max* L. Merr., cv. Williams (Delgado et al. 1994 y en *Glycine max* L. Merr., cv. Don Mario del presente estudio, entre otros). Por lo anterior, se puede considerar que los datos obtenidos utilizando la variedad Williams 82 son una medida estimativa que nos aporta información significativa sobre el comportamiento de la cepa E109 inoculada en otras variedades de soja (y las demás cepas evaluadas) en la emisión de gases tipo NO_x en simbiosis con soja.

A nivel de la *producción de óxido nítrico (NO) y óxido nitroso (N₂O) en la interacción soja-Bradyrhizobium*. Para obtener información sobre la producción de NO en secciones de nódulos de soja, utilizamos una señal de fluorescencia de NO en presencia de c-PTIO como secuestrante, y encontramos una producción representativa de NO atribuida a la desnitrificación del bacteroide. Como se mencionó anteriormente, todas las cepas fueron productores de NO, especialmente GRC 131 (787UIFR) y CPAC15 (447 UIFR). Resultados previos demostraron la presencia de óxido nítrico en las raíces en diferentes etapas de

desarrollo de nódulos en *L. albus* (Cueto et al. 1996), *Medicago truncatula* (Baudouin et al. 2006) y *Lotus japonicus* (Fukudome et al. 2016). Se han propuesto varios mecanismos por los cuales el NO podría producirse durante las interacciones planta-rizobio (Pauly, 2006). Sin embargo, la correlación entre la producción de NO y su reducción al óxido nitroso no está clara hasta el momento. Numerosas vías alternativas de reducción de NO a través de la conversión enzimática o no enzimática se han encontrado en plantas (Gupta et al. 2011; Mur et al. 2013) y bacterias (Zumft, 1997). La vía bacteriana se ha informado como la ruta principal para la producción de NO y se produce tanto en bacterias de vida libre en condiciones microóxicas como en nódulos (Melihoc et al. 2011). Por lo tanto, tanto la planta como los simbiontes bacterianos deben considerarse como posibles fuentes de NO (Hichri et al. 2015). El óxido nítrico se ha descrito como el gas requerido para establecer la interacción simbiótica ((Hichri et al. 2015). Sin embargo, varios autores han informado que el óxido nítrico podría ser un inhibidor de la enzima nitrogenasa, que es un factor esencial en la fijación simbiótica de nitrógeno (Sánchez et al. 2010). Como se puede observar en la Figura 14, en nuestras condiciones la detección fluorométrica mostró cierta acumulación endógena de NO en nódulos de la mutante deficiente para el gen *norC* (GRC131) de plantas que no fueron tratadas con nitrato. Además, la presencia de nitrato en la solución mineral incrementó la producción de NO (Figura 12). Sin embargo, nuestros resultados contrastan con lo reportado por Sánchez et al. (2010), que no pudieron detectar diferencias en la acumulación de NO en nódulos de raíces de plantas inoculadas con *B. diazoefficiens* USDA110 o GRC131 en presencia de nitrato. Este grupo logró la detección del óxido nítrico acumulado al someter las planta a condiciones de anegamiento, principalmente en nódulos de GRC131, y que estimuló la producción de NO por USDA 110.

El óxido nitroso (N₂O) es uno de los tres principales gases de efecto invernadero biogénicos (GEI), y la agricultura representa cerca del 30% de las emisiones totales de N₂O (Tortosa et al. 2015). Varios autores han informado que las plantas leguminosas asociadas a *Bradyrhizobium* sp. puede fijar nitrógeno de la atmósfera pero también emitir N₂O (Duxbury et al. 1998; Inaba et al. 2009, entre otros). Como se ha reiterado, USDA110 es la única cepa con una vía de desnitrificación totalmente caracterizada que se utiliza como cepa modelo para rizobios. En el presente estudio, esta cepa junto con CPAC 7 produjeron valores de producción de N₂O muy bajos en comparación con todas las otras cepas utilizadas, que se consideran desnitrificadores

incompletos por carecer del gen *nosZ* (tabla 9). En este sentido, numerosos reportes sugieren que el gen *nosZ* es esencial para la reducción de óxido nitroso. Itakura et al. 2013, informaron que en cultivos puros y en experimentos semicontrolados en maceta, la emisión de N₂O fue menor en cepas *nosZ*⁺ y *nosZ*⁺⁺ (mutantes con actividad sobreexpresada para la enzima óxido nitroso reductasa) de *Bradyrhizobium japonicum* que en las cepas *nosZ*⁻ (mutantes que carecen de actividad reductora de óxido nitroso).

La producción de óxido nitroso tuvo los valores más altos a lo largo de toda la curva en las raíces de plantas inoculadas con la cepa E109 en la puesta a punto y en la comparación de las emisiones en dos variedades de soja inoculadas con este rizobio. Así mismo, cuando se realizó la cuantificación de N₂O en plantas de soja inoculadas con todas las cepas en estudio, se encontró que los flujos de N₂O fueron mayores para los tratamientos CPAC15, E109 y SEMIA 587. Todo este grupo se utiliza comercialmente como ingrediente activo en la formulación de bioproductos para la soja [*Glycine max* L. (Merr.)] en Argentina y Brasil. Debido a esto, los genomas de CPAC15 y E109 se han secuenciado, y nuestros resultados pueden confirmar que son rizobios desnitrificantes incompletos. Al respecto, varios autores han informado que varias cepas de *Bradyrhizobium* que carecen de *nosZ* producen óxido nitroso como producto final de desnitrificación, y este tipo de bacterias se encuentran en suelos agrícolas (Sameshima et al. 2003; Fernández et al. 2008). Las poblaciones naturales de *Bradyrhizobium* que carecen del gen *nosZ* y la actividad N₂O reductasa a menudo son dominantes en los suelos de los campos de soja (Chèneby et al., 2008; Sameshima-Saito et al. 2006b). Considerando la gran extensión del suelo cultivado con soja en Sudamérica, el óxido nitroso puede ser emitido por las raíces de soja noduladas, y la simbiosis leguminosa-*Bradyrhizobium* podría jugar un papel importante en las emisiones de óxido nitroso, contribuyendo así al calentamiento global (IPCC, 2006).

A nivel de la *actividad desnitrificante de B. elkanii: SEMIA 5019 y SEMIA 587*. Como muestran nuestros resultados, aunque las cepas SEMIA 5019 y SEMIA 587 no tienen los principales genes de desnitrificación monitoreados en nuestro estudio, sí tienen actividad de Nar y NiR y producen óxido nítrico y óxido nitroso (ver tabla 5 capítulo 1 y tabla 9 del presente capítulo). Respecto a la producción de N₂O de estas cepas, nuestros resultados contrastan con un único reporte relacionado con la producción de N₂O por las cepas, CPAC7,

SEMIA 587 y USDA 110, en donde se encontró que la cepa SEMIA 587 produjo valores inferiores a USDA110 y CPAC7 N₂O (Nascimento et al. 2011 citado por Alves et al. 2016). Este grupo mencionó que la mayoría de las cepas de *B. elkanii* no tienen algunos genes involucrados en la vía de desnitrificación. Bajo nuestras condiciones, encontramos que SEMIA 587 y SEMIA 5019 no presentan ninguno de los genes de la desnitrificación pero presentan una actividad desnitrificante activa. Además, las bases de datos de RAST y KEEG muestran que el genoma parcialmente secuenciado de *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587, así como los genomas completamente secuenciados de esta especie: USDA 76, CCBAU 05737 y WSM1741, entre otros, comparten la misma información con respecto a la ausencia de genes de desnitrificación.

Debido a que nuestros resultados están en contraste con la informada entre los genes de desnitrificación reportado y su papel como codificantes en la actividad enzimática en la ruta desnitrificante, verificamos nuestros experimentos cuidadosamente con cepas de *B. elkanii* a nivel *in silico*, *in vitro* y a nivel molecular. La actividad de desnitrificación siempre se encontró en todos los casos y los genes *napA*, *nirK*, *norC* y *nosZ* están ausentes. La actividad enzimática y la producción de N₂O en *B. elkanii* demostraron que esos genes o genes de desnitrificación similares podrían codificar activamente estas actividades. (Fernández et al. 2008) informaron que no se detectaron todos los genes de desnitrificación en aislamientos de *Bradyrhizobium*, pero la cromatografía de gases, como ya hemos mencionado, reveló que estas cepas producían N₂O. Estas reacciones de amplificación ineficientes pueden haber ocurrido debido a las diferencias entre las secuencias de nucleótidos de los iniciadores y las secuencias genéticas de las enzimas entre las bacterias desnitrificantes (Chèneby et al. 1998; Fernández et al. 2008). Sin embargo, de acuerdo con Nascimento et al. 2011 y de acuerdo con nuestros resultados, el análisis molecular se ha realizado correctamente utilizando oligonucleótidos específicos para *Bradyrhizobium* sp.. Futuras investigaciones podrían revelar los posibles mecanismos y genes involucrados en la ruta desnitrificante y en la producción de gases efecto invernadero.

Tabla 9. Correlación entre la presencia/ausencia del gen *nosZ* y la producción de óxido nitroso en células en vida libre y en simbiosis con raíces de plantas de soja.

Cepa/Cepa inoculada	Genes (<i>in vitro</i> e <i>in silico</i>)				Referencia	Producción de óxido nitroso ^b		Referencia
	<i>napA</i>	<i>nirK</i>	<i>norC</i>	<i>NosZ</i>		Vida libre	Raíces noduladas de soja	
<i>B. diazoefficiens</i> USDA 110	+	+	+	+	Bedmar et al. (2005)	Bajo	Bajo	Meakin et al. (2006)
<i>B. diazoefficiens</i> CPAC7	+	+	+	+	Este estudio	Bajo	Bajo	Este estudio
<i>B. japonicum</i> E109	+	+	+	-	Este estudio	Alto	Alto	Este estudio
<i>B. japonicum</i> CPAC15	+	+	+	-	Este estudio	Alto	Alto	Este estudio
<i>B. elkanii</i> SEMIA 5019 ^a	-/* ^C	-/*	-/*	-/*	Este estudio	Medio	Alto	Este estudio
<i>B. elkanii</i> SEMIA 587 ^a	-/*	-/*	-/*	-/*	Este estudio	Medio	Medio	Este estudio

(+) Presencia (-) Ausencia

^a Genoma secuenciado incompleto (SEMIA 587) o no está secuenciado (SEMIA 5019)

^b Comparación de niveles de N₂O con respect a la cepa de referencia (USDA 110)

^c No amplificó o no presenta el gen.

CAPÍTULO I I I

6. ESTRATEGIAS DE MITIGACIÓN DE LA EMISIÓN DE GEIs EN LA SIMBIOSIS SOJA-*Bradyrhizobium*

6.1 Introducción

En la República Argentina, el sector agrícola es responsable del 64,5% de las emisiones de este N_2O , siendo el 31,5% emitido desde suelos agrícolas (Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sustentable, 2015). Estos datos determinan la importancia de invertir esfuerzos para mitigar las emisiones agrícolas de N_2O en donde el cultivo de la soja es cultivado extensivamente en nuestro país. Adicionalmente, se ha evidenciado ampliamente que la inoculación de leguminosas con rizobios con desnitrificación incompleta aumentan las emisiones de gases tipo NO_x (Okada et al. 2005; Sameshima-Saito et al. 2006; Inaba et al. 2009; Hirayama et al. 2011, Itakura et al. 2012 entre otros).

Thomson et al. (2012), en el ensayo que tuvo como título: 'Óxido nitroso (N_2O) el gas de efecto invernadero olvidado', realizaron una revisión de estrategias para mitigar las emisiones de N_2O , bajo tres aspectos claves (i) gestión de química del suelo y microbiología, (ii) ingeniería de plantas de cultivo para fijar nitrógeno, y (iii) intensificación agrícola sostenible. Dentro del aspecto clave (i) se han venido proponiendo numerosas alternativas biotecnológicas. Por ejemplo, se ha reportado que la introducción de microorganismos como *Azospirillum* sp., *Herbaspirillum* sp. y otras bacterias de vida libre con desnitrificación completa, en pasturas y otras no leguminosas, han resultado en aumentos del contenido de carbono y nitrógeno y simultáneamente se ha mitigado la emisión de N_2O (Nishizawa et al. 2014; Luo et al. 2010; Nan Gao et al. 2016, entre otros).

Así mismo, diversos estudios han planteado intercalar cultivos entre leguminosas y no leguminosas para mitigar las emisiones, como lo reportaron Hauggaard-Nielsen et al. (2003), quienes encontraron que la rotación de leguminosas de grano con cereales puede reducir los niveles de nitrógeno mineral en el suelo y además reducir los niveles de emisión de óxido nitroso. Sin embargo, se ha reportado que en algunos casos la rotación no influye y en algunos casos incrementa los niveles de N_2O emitidos, como lo reportaron Brozyna et al. (2013) quienes afirmaron que las dosis de fertilizante o la adición de estiércol no influyeron en la emisión de N_2O , mientras que las rotaciones de papa o trigo de invierno con el cultivo de trébol aumentaron los flujos de N_2O acumulados. También encontraron que la labranza reducida redujo los niveles de N_2O producidos.

Respecto a la labranza reducida, esta ha sido otra de las estrategias planteadas como alternativa mitigadora. Badagliacca et al. (2018), reportaron que en condiciones mediterráneas

semiáridas, a menor labranza en el cultivo de poroto (*Vicia faba* L.) se aumentó el contenido de carbono orgánico y el rendimiento, al mismo tiempo que se redujeron los flujos de N₂O emitidos. Krauss et al. (2017), reportaron que la labranza convencional aumentó los niveles de óxido nitroso y que la labranza orgánica resulta beneficiosa para reducir los niveles de N₂O emitidos por los cultivos de maíz y trigo y un cultivo intercalado de avena y trébol. Las alternativas de optimización de las prácticas de labranza también han encontrado resultados contrastantes a los mencionados anteriormente. Tian et al. (2013), evaluaron la productividad y la emisión de N₂O en un sistema rotativo de trigo y maíz y encontraron que el tipo de suelo afecta directamente los niveles de emisión, determinando que bajo un suelo de textura gruesa en sistemas agrícolas bajos en nitrógeno el impacto de la labranza en la emisión de gases efecto invernadero (GEI) es muy bajo y que el ciclo de barbecho dentro de una rotación de cultivos no es una estrategia útil para reducir las emisiones de GEI.

Respecto a las alternativas de reducción de gases NO_x en leguminosas se ha planteado el uso de rizobios con desnitrificación completa, ya sea por presencia natural del gen *nosZ*, por inserción o sobreexpresión del mismo. Itakura et al. (2008; 2013), demostraron que las emisiones de N₂O de nódulos senescentes de raíces de soja se pueden mitigar mediante la inoculación de cepas no modificadas genéticamente, pero con actividad óxido nitroso reductasa (N₂OR) sobreexpresada. De acuerdo a lo anteriormente expuesto, las estrategias de mitigación han sido planteadas y aún representan un desafío no resuelto. En el caso de nuestro país, algunas de las alternativas planteadas son poco viables de implementar, ya que no es probable en la actualidad utilizar microorganismos modificados genéticamente para reducir el impacto de las emisiones. Es por esto que en este capítulo abordamos posibles estrategias desde una arista biotecnológica, que puedan tener aplicabilidad a corto plazo y que permitan aprovechar los inoculantes comerciales objeto de esta investigación.

El objetivo de este capítulo fue evaluar el comportamiento a nivel de la producción de N₂O de diferentes tipos de microorganismos (con desnitrificación completa e incompleta coinoculados en plantas de soja y en condiciones controladas de cámaras de crecimiento) como una posible alternativa biotecnológica para la mitigación de la emisión de GEIs a la atmósfera.

6. 2 Materiales y Métodos

6.2.1 Flujos de óxido nitroso en experimentos en condiciones semicontroladas

6.2.1.1 Flujos de N₂O en raíces noduladas de soja co-inoculadas con *Bradyrhizobium* sp.

Este ensayo se realizó con el objetivo de evaluar la mitigación de óxido nitroso en nódulos de plantas con inoculación mixta con bacterias con desnitrificación completa e incompleta, utilizando los rizobios empleados en esta investigación. Para la estimación de la producción de este gas se realizó un diseño experimental aleatorio en condiciones semi-controladas de cultivo, de acuerdo a los experimentos 1 y 2 que serán detalladas a continuación.

a) Experimento 1: Se realizó un ensayo preliminar con el objetivo de conocer la influencia de la co-inoculación con bacterias con capacidad de llevar a cabo el proceso de desnitrificación incompleta junto a bacterias con capacidad de realizar la desnitrificación completa. En este ensayo se incluyeron los siguientes tratamientos:

T1: Inoculación con *B. diazoefficiens* USDA 110

T2: Inoculación con *B. japonicum* E109

T3: Inoculación con *B. diazoefficiens* GRZ 3035

T4: Co-inoculación *B. japonicum* E109 + *A. brasilense* Az39

T5: Co-inoculación *B. japonicum* E109 + *B. diazoefficiens* USDA 110

T6: Co-inoculación *B. diazoefficiens* GRZ 3035 + *A. brasilense* Az39

T7: Co-inoculación *B. diazoefficiens* GRZ 3035 + *B. diazoefficiens* USDA 110

b) Experimento 2: En base a los resultados obtenidos en el Experimento 1, se tuvieron en cuenta aquellos microorganismos más eficientes para el proceso de desnitrificación completa en combinación con otras cepas de *Bradyrhizobium* sp. mayoritariamente utilizadas en América del Sur para la formulación de inoculantes, de acuerdo a los siguientes tratamientos:

T1: Inoculación con *B. diazoefficiens* USDA 110

T2: Inoculación con *B. japonicum* E109

T3: Inoculación con *B. elkanii* SEMIA 5019

- T4:** Inoculación con *B. japonicum* CPAC 15
- T5:** Inoculación con *B. diazoefficiens* CPAC 7
- T6:** Inoculación con la cepa *B. elkanii* SEMIA 587
- T7:** Inoculación con *B. diazoefficiens* GRZ 3035
- T8:** Co-Inoculación con *B. japonicum* E109 + *B. diazoefficiens* USDA 110
- T9:** Co-Inoculación con *B. japonicum* E109 +CPAC 7
- T10:** Co-Inoculación con *B. elkanii* SEMIA 5019 + *B. diazoefficiens* USDA 110
- T11:** Co-Inoculación con *B. elkanii* SEMIA 5019 + *B. diazoefficiens* CPAC 7
- T12:** Co-Inoculación con *B. japonicum* SEMIA 5079 + *B. diazoefficiens* USDA 110
- T13:** Co-Inoculación con *B. japonicum* SEMIA 5079 + *B. diazoefficiens* CPAC 7
- T14:** Co-Inoculación con *B. elkanii* SEMIA 587 + *B. diazoefficiens* USDA 110
- T15:** Co-Inoculación con *B. elkanii* SEMIA 587 + *B. diazoefficiens* CPAC 7
- T16:** Co-Inoculación con *B. diazoefficiens* GRZ 3035 + *B.diazoefficiens* USDA 110
- T17:** Co-Inoculación con *B. diazoefficiens* GRZ 3035 + *B.diazoefficiens* CPAC 7

Al término de ambos ensayos: Para determinar la concentración de cada microorganismo reaislado a partir de los nódulos de soja se realizaron recuentos en placa de células viables (cfu.ml⁻¹) en medios selectivos y diferenciales suplementados con antibióticos y con arabinosa (1%) de acuerdo a la combinación seleccionada. Los medios de cultivo y antibióticos, fueron descritos en el ítem 5.2.1 (Condiciones de cultivo bacteriano). Así mismo, las condiciones de crecimiento bacteriano y la esterilización, siembra e inoculación de las semillas de soja se realizaron de acuerdo a la metodología descrita en los ítems 5.2.. La determinación de la producción de N₂O mediante cromatografía gaseosa de la manera descrita en el apartado 5.2.2. del Capítulo 2.

Para el análisis y procesamiento de la información de parámetros agronómicos, se utilizó el análisis de varianza uni-variante (UNIANOVA) y la comparación de medias se realizó por el Test de Tukey al 5% de probabilidad utilizando el software SAS 9.0 para Windows.

6.3 Resultados

6.3.1 Experimento 1. Flujos de N₂O en raíces noduladas de plantas de soja co-inoculadas con *Bradyrhizobium* sp.

En la Figura 19 se observa que los tratamientos T3, T4 y T6 presentaron diferencias estadísticamente significativas frente a los demás tratamientos evaluados, seguidos de T2 y T5 y los valores de producción de óxido nitroso más bajo se encontraron en T7 y en el control negativo (T1). Así mismo, se observa que las mezclas con la cepa USDA 110 (T5 y T7) presentan valores más bajos que cuando se realizan co-inoculaciones individuales para cada tratamiento (T2 y T3). Mientras que en tratamientos donde se realizó inoculación mixta con la cepa Az39 no se observa disminución en la producción de N₂O frente a las raíces noduladas inoculadas individualmente (T2 y T3).

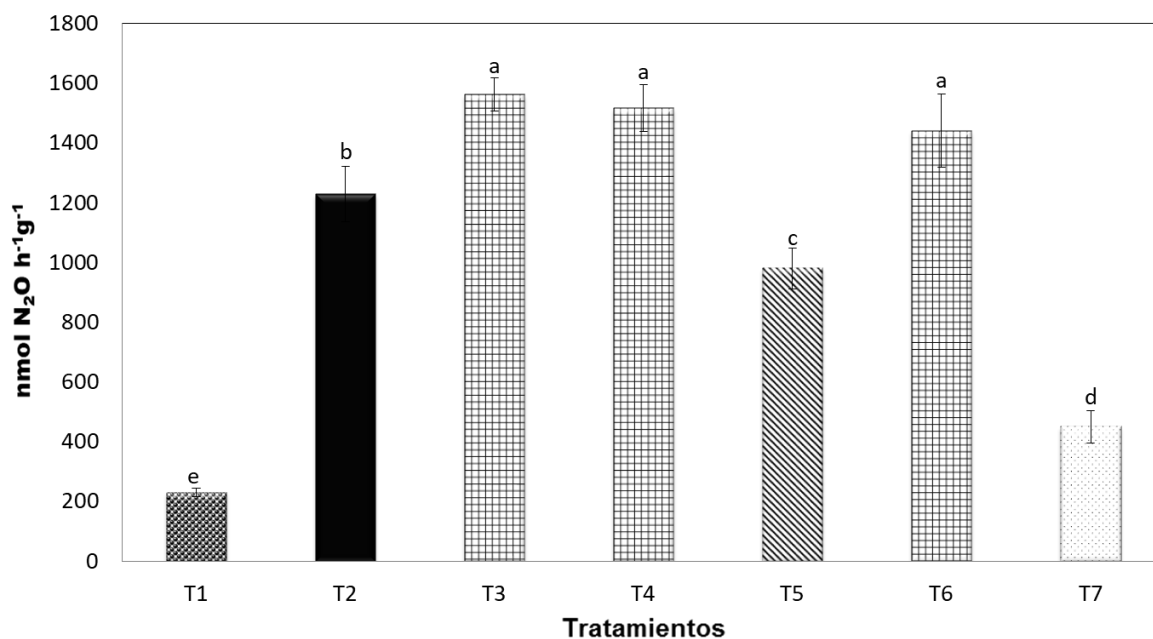


Figura 19. Producción de óxido nitroso (N₂O) de raíces noduladas de soja inoculadas con *Bradyrhizobium* sp.: (T1) USDA110; (T2) E109; (T3) GRZ 3035; (T4) E109 + Az39; (T5) E109 + USDA110; (T6) GRZ 3035 + Az39; (T7) GRZ 3035 + USDA 110. Los valores se expresan como nmol de N₂O h⁻¹ g⁻¹ y representan la media de 4 repeticiones seguida del error estándar. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas en relación a cada variable evaluada de acuerdo a la prueba de Tukey HSD (p<0.05).

En la Tabla 10 se observan los recuentos (ufc/ml) realizados a todos los tratamientos descritos en la Figura 23. Se observó que no hubo crecimiento de la cepa Az39 en ningún tratamiento. Para el caso del recuento de E109, se evidencia que la ocupación del nódulo es mayoritariamente de la cepa USDA 110, mientras que la GRZ3035 presenta una proporción similar de unidades formadoras de colonias frente a su cepa *wild type* (USDA 110), como se observa para T6.

Tabla 10. Porcentaje de ocupación nodular en condiciones de inoculación o co-inoculación para los 7 tratamientos evaluados.

TRATAMIENTO	Ocupación del nódulo (%)*
T1 (USDA110)	100
T2 (E109)	100
T3 (GRC3035)	100
T4 (E109+USDA110)	(33 + 67)
T5 (E109+AZ39)	(100 + nd)
T6 (GRZ3035 + USDA110)	(41 + 59)
T7 (GRZ3035 + AZ39)	(100 + nd)

* Promedio obtenido a partir de nódulos de raíces de 5 réplicas experimentales por cada tratamiento. El valor de 100% se infiere como medida de tendencia de ocupación del nódulo. nd: no determinado.

La correlación porcentaje de ocupación en el nódulo y la producción de óxido nitroso, se encontró que para T1, T2 y T3, la emisión corresponde presuntivamente a cada microorganismo inoculado. Por su parte, los tratamientos T4 y T6 presentaron una disminución en la emisión y el porcentaje de ocupación en el nódulo es representativo para ambos tratamientos, especialmente para T6 (Tabla 10). Para el caso de T5 y T7 no se presentó crecimiento en las placas con medio específico para Az39, con lo cual se infiere que la producción viene mayoritariamente de las cepas rizobiales inoculadas en cada caso (E109 y GRZ3035). De acuerdo a los resultados obtenidos, se continuaron los experimentos utilizando una combinación de microorganismos incluyendo bacterias capaces de llevar a cabo el proceso

de desnitrificación completa, tales como USDA110 y CPAC7. En el caso particular de la última cepa, podemos ver que el análisis *in silico* realizado en el transcurso del proyecto nos determinó que CPAC7 es un bradyrizobio con capacidad de llevar a cabo el proceso de desnitrificación completa y es utilizado como inoculante en Brasil, por lo que consideramos la posibilidad de evaluar su papel como posible cepa mitigadora para la liberación de N₂O en el cultivo de soja.

6.3.2. Experimento 2: Flujos de N₂O en raíces de plantas de soja co-inoculadas con *Bradyrhizobium* sp.

Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 20 y en la Tabla 11. En la Figura 20 se determina que el tratamiento T3 presentó diferencias significativas en la producción de óxido nitroso (2174,25 nmol N₂O h⁻¹g⁻¹) frente a los demás tratamientos evaluados. El tratamiento T2 también presentó la segunda emisión estadísticamente más alta (1527,80 nmol N₂O h⁻¹g⁻¹) y luego le siguen los subgrupos, T8 y T11. Los valores más fueron para T1, T5, T16 y T17. Como se demuestra en la figura 24, dos tratamientos con inoculación individual con bacterias desnitrificantes incompletas son las que más alta emisión presentaron (T2 y T3).

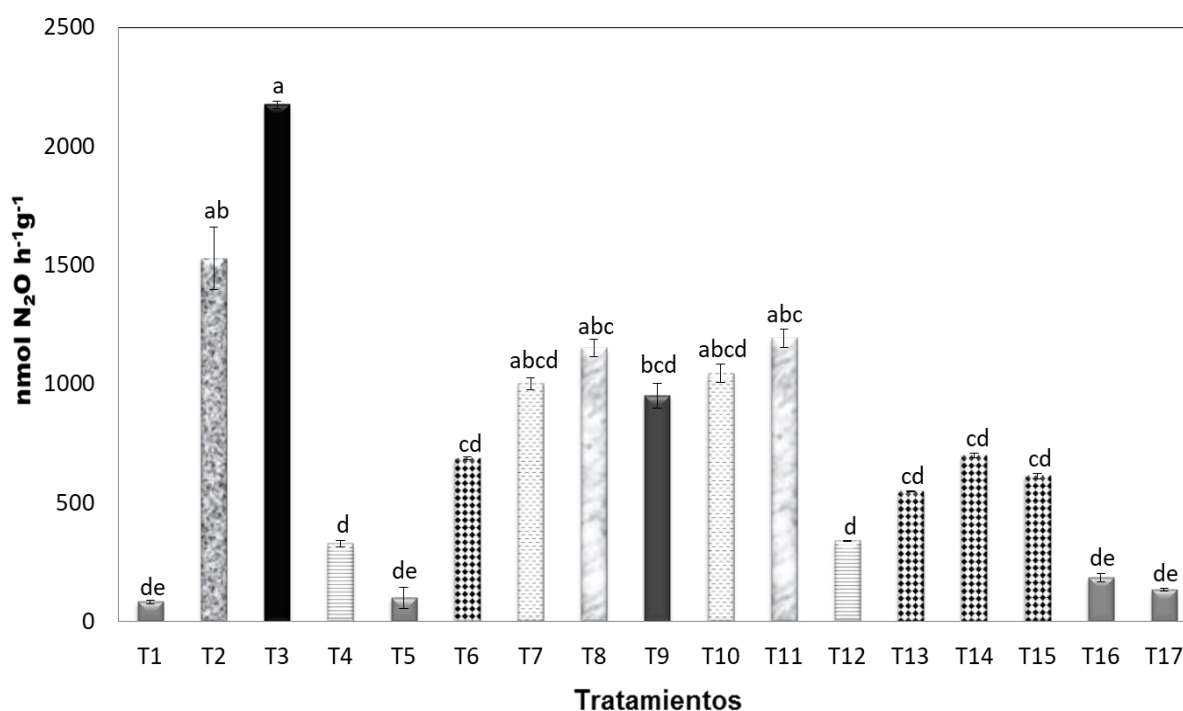


Figura 20: Producción de óxido nitroso (N₂O) de raíces noduladas de soja inoculadas con *Bradyrhizobium* sp.: (T1) USDA110 (T2) E109 (T3) SEMIA 5019 (T4) CPAC 15 (T5) CPAC 7 (T6) SEMIA 587 (T7) GRZ 3035 (T8) E109 + USDA110 (T9) E109 + SEMIA 5080 (T10) SEMIA 5019 + USDA110 (T11) SEMIA 5019+ SEMIA 5080 (T12) CPAC 15 + USDA110 (T13) SEMIA 5079 + CPAC 7 (T14) SEMIA 587 + USDA110 (T15) SEMIA 587 + CPAC 7 (T16) GRZ 3035 + USDA110 (T17) GRZ 3035 + CPAC 7. Los valores se expresan como nmol de N₂Oh⁻¹g⁻¹ y representan la media de 4 repeticiones seguida del error estándar. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas en relación a cada variable evaluada de acuerdo a la prueba de Tukey HSD (p<0.05).

Por otro lado, se encontró que en varios casos, las combinaciones presentan valores en promedio mucho más bajo que los tratamientos con inoculación individual de rizobios con desnitrificación incompleta (ver tratamientos: T2 frente a sus tratamientos coinoculados T8 y T9; T3 frente a la disminución en T10 y T11 y T7 frente a T16 y T17; T6 frente a la disminución en T14 y T15). El valor más bajo de producción fue para el control negativo (USDA110) para la producción de óxido nitroso (T1) con 82,9 nmol N₂Oh⁻¹g⁻¹. En la Tabla 11 se observan los recuentos (ufc/ml) realizados a todos los tratamientos descritos en la figura 10. Se observó que hubo competencia en la ocupación del nódulo en los tratamientos T10, T11, T13, T14 y T17. Por su parte los tratamientos T8, T9, T15 y T16 presentaron valores de recuento ligeramente bajos de la cepa con desnitrificación incompleta en comparación con el tratamiento co-inoculado (desnitrificante completo).

Tabla 11. Porcentaje de ocupación nodular en condiciones de inoculación o co-inoculación para los 17 tratamientos evaluados.

TRATAMIENTO	Ocupación del nódulo (%)¹
T1 (USDA110)	(100) ²
T2 (E109)	(100) ²
T3 (SEMIA 5019)	(100) ²
T4 (CPAC 15)	(100) ²

T5 (CPAC 7)	(100) ²
T6 (SEMIA 587)	(100) ²
T7 (GRZ3035)	(100) ²
T8 (E109 + USDA110)	(35 + 65) ³
T9 (E109 + CPAC 7)	(44 + 56) ⁴
T10 (SEMIA 5019 + USDA110)	(32 + 68) ³
T11 (SEMIA 5019 + CPAC 7)	(29 + 71) ⁴
T12 (CPAC 15 + USDA110)	(--) ⁵
T13 (CPAC 15 + CPAC 7)	(34 + 66) ⁴
T14 (SEMIA 587 + USDA110)	(16 + 84) ³
T15 (SEMIA 587 + CPAC 7)	(40 + 60) ⁴
T16 (GRZ3035 + USDA110)	(39 + 61) ³
T17 (GRZ3035 + CPAC 7)	(9 + 91) ⁴

¹ Promedio obtenido a partir de nódulos de raíces de 5 réplicas experimentales por cada tratamiento.

² El valor de 100% se infiere como medida de tendencia de ocupación del nódulo.

³ El recuento (y ocupación del nódulo expresado en porcentaje) para USDA110 se realizó en medio PSY suplementado con cloranfenicol. Las cepas SEMIA 5019, SEMIA 587, E109 y GRZ3035 también presentaron resistencia a este antibiótico. Por ello, se tuvo en cuenta la diferencia entre el recuento de E109 (Resistente a vancomicina) de SEMIA 5019, SEMIA 587 (Resistente a Kanamicina) y GRZ3035 (resistente a cloranfenicol, espectinomicina y estreptomycin) y el recuento de bacterias presuntivas de CPAC7 (sin resistencia)

⁴ Los recuentos (y ocupación del nódulo expresado en porcentaje) para CPAC 7 se realizaron en medio PSY sin antibiótico (no presenta resistencia a los antibióticos evaluados). Por ello, se tuvo en cuenta la diferencia entre el recuento de CPAC 15 (Resistente a Cloranfenicol) SEMIA 5019, SEMIA 587 (Resistentes a Kanamicina) y GRZ3035 (resistente a cloranfenicol, espectinomicina y estreptomycin) y el recuento presuntivas de CPAC 7.

⁵ Ambas cepas presentaron resistencia sólo a cloranfenicol. No se pudo determinar.

Tal como se observa en la Tabla 11, para el caso de los tratamientos de co-inoculación en las que se utilizaron las cepas CPAC 15, CPAC 7, SEMIA 5019 Y SEMIA 587, se realizó una prueba previa de resistencia a antibióticos (de acuerdo a la literatura consultada y a los antibióticos disponibles para los experimentos) y en tales condiciones se encontró que las cepas que compartían los co-inóculos presentaban la misma resistencia a ciertos antibióticos, con lo cual no fue posible diferenciar el crecimiento de un rizobio u otro en nuestras

condiciones experimentales. Para el caso de la CPAC 7 no presentó resistencia a los antibióticos evaluados.

Tabla 12. Resistencia a antibióticos de las cepas USDA110, E109, SEMIA 5019, CPAC 7, CPAC 15 y SEMIA 587.

CEPA	Resistencia a antibiótico
USDA110	Resistencia a Cloranfenicol
E109	Resistencia a vancomicina Resistencia a Kanamicina y Cloranfenicol (igual a
SEMIA5019	USDA110)
CPAC 15	Resistencia a Cloranfenicol - igual a USDA110
CPAC 7	No presentó resistencia Resistencia a Kanamicina, estreptomina y
SEMIA587	cloranfenicol (igual a USDA110)

Puesto que la producción de óxido nitroso en nódulos dependería en mayor proporción de la cantidad y presencia de simbiontes presentes en tal órgano (Akiyama et al. 2016), fue necesario correlacionar la información de los resultados de la Tabla 12 junto con el porcentaje de ocupación de los rizobios en el nódulo presentados en la Tabla 11. De manera general se puede observar que la competencia y ocupación del nódulo influyó notablemente en la producción de óxido nitroso a nivel de los nódulos. En estos resultados se evidencia la presencia de ambos bradyrizobios en el nódulo para el caso de los tratamientos T8 y T9. En tal caso, la reducción de la emisión (comparando la inoculación individual o Tratamiento T2) podría ser atribuida a la presencia de una bacteria con desnitrificación completa, que podría llevar el N_2O a N_2 en el nódulo. El caso contrario se observó en el tratamiento T15, que no presentó disminución en la producción de óxido nitroso aun cuando se adicionó la cepa CPAC 7 (desnitrificadora completa) y para la que el porcentaje de ocupación en el nódulo fue representativo en ambos casos. Para el caso de los tratamientos T10, T11, T14 y T17 la disminución de la producción de N_2O frente al tratamiento inoculado de manera individual (ver Figura 20) podría atribuirse a la baja ocupación del nódulo del rizobio con

desnitrificación incompleta y no por causa de un efecto de mitigación del rizobio con desnitrificación completa.

6.4 Discusión

En este capítulo se evidenció que la presencia de bacterias con desnitrificación incompleta podrían ocupar el nódulo y establecer la simbiosis junto con desnitrificadoras completas y de esta forma disminuir los flujos de emisión de N₂O. La búsqueda de alternativas planteadas en este capítulo incluyó la combinación con bacterias de vida libre con desnitrificación completa y se evidenció que los rizobios probablemente son los que mayor presencia y ocupación del nódulo presentan y la presencia de Az39 no influyó significativamente en la reducción de los flujos de N₂O. Con el propósito de verificar si este patrón se presentaba con otras desnitrificadoras de vida saprofitica, se realizó un experimento complementario, cuantificando la producción de N₂O en raíces noduladas de soja previamente coinoculadas con E109 y sus posibles combinaciones con Az39 y *Pseudomonas sutzeri* ATCC17588 (ver Figura suplementaria 1). Los resultados nuevamente permitieron inferir que las bacterias de vida libre coinoculadas con rizobios no participaron activamente en la mitigación del gas, mientras que el control negativo para la producción de óxido nitroso (USDA110) siempre presentó los valores más bajos de emisión. Es por esto que se continuó con la estrategia probablemente más efectiva que fue la coinoculación rizobio-rizobio en sus posibles combinaciones con desnitrificadoras completas e incompletas.

Como se evidenció en todos los experimentos la especie bacteriana y su actividad desnitrificante están directamente relacionados con la emisión de óxido nitroso. Si bien se ha reportado previamente que mutaciones, sobreexpresiones o inserciones transgénicas (Itakura et al. 2013; Inaba et al., 2012, entre otros) podrían ser una alternativa eficaz, la aplicabilidad de estas herramientas en el sistema productivo podrían ser poco viables a corto o mediano plazo. En casos como el de la Argentina, donde los bradyrizobios no tienen este gen y la legislación no permite la manipulación genética como alternativa biotecnológica viable para el desarrollo de productos, ensayos en condiciones de invernáculo o *a campo*, se hace necesario el abordaje de otras estrategias biológicas, como la co-inoculación con bacterias desnitrificantes completas.

En este orden de ideas y de acuerdo a nuestros resultados obtenidos, la inoculación individual con bacterias con desnitrificación incompleta siempre presenta los valores más altos frente a la inoculación mixta. Las co-inoculaciones disminuyeron la emisión en más de un 30% en varios casos y la ocupación en el nódulo fue representativa en los tratamientos T8 y T9 (ver Tabla 7), siendo entonces la cepa E109 más competitiva para alojarse en el nódulo y así mismo se observó que la co-inoculación con un rizobio con desnitrificación completa influyó positivamente sobre la reducción de la emisión de óxido nitroso. Resultados similares fueron encontrados por Akiyama et al. (2016), quienes afirman que la producción más elevada de éste gas se da en los nódulos y que su mitigación es eficiente cuando se realizan co-inoculaciones con cepas con desnitrificación completa (tanto en cepas nativas como en cepas que sobre-expresan el gen *nosZ* de *B. diazoefficiens* USDA110).

La producción de N₂O fue más alta para los tratamientos CPAC15, E109 y SEMIA 587. Todos estos grupos (excepto el USDA110) se usan comercialmente como ingrediente activo en la formulación de bioproductos para la soja [*Glycine max* L. (Merr.)] en Argentina y Brasil. Al respecto, varios autores han informado que varias cepas de *Bradyrhizobium* producen óxido nitroso como producto final de desnitrificación, y que este tipo de bacterias se encuentran en suelos agrícolas (Sameshima et al. 2003; Fernández et al. 2008). Las poblaciones naturales de *Bradyrhizobium* que carecen del gen *nosZ* y de actividad N₂O reductasa a menudo son dominantes en los suelos de los campos de soja (Sameshima et al., 2003; 2006).

Considerando la gran extensión de suelo cultivado con soja en América del Sur, el óxido nitroso puede ser emitido por las raíces noduladas de soja, por lo que la simbiosis leguminosa-*Bradyrhizobium* podría desempeñar un papel importante en las emisiones de óxido nitroso, contribuyendo así al calentamiento global (IPCC, 2001; 2006). El incremento en la demanda de producción de soja aumenta paulatinamente año tras año. Así mismo su impacto agronómico y ecológico debe ser sostenible. De acuerdo a nuestros resultados las emisiones de óxido nitroso son un problema latente en suelos cultivados con esta leguminosa. La co-inoculación propuesta (E109 + CPAC 7) constituye una herramienta de recomendación factible, puesto que son las dos cepas que se utilizan tradicionalmente como principio activo de los inoculantes para Soja en Argentina y Brasil. No obstante, es necesario conocer su

comportamiento en cuanto a la fijación biológica de nitrógeno y parámetros agronómicos que determinan la futura incorporación de estas mezclas a escala comercial.

Para el caso de las otras cepas con desnitrificación incompleta utilizadas comúnmente en Brasil (SEMIA 5019, CPAC 15 y SEMIA 587), es necesario que en futuras investigaciones se proceda con la búsqueda de rizobios nativos '*nosZ+*' que reduzcan la emisión y a su vez puedan cohabitar en el nódulo. Ya que, nuestros resultados evidencian que podría establecerse una simbiosis en donde el nódulo esté ocupado por rizobios con desnitrificación incompleta y completa y con funciones benéficas en cuanto a la mitigación de gases efecto invernadero, como el N₂O.

CAPÍTULO IV

7. EMISIÓN DE GEIs EN LA SIMBIOSIS SOJA-*Bradyrhizobium* EN CONDICIONES DE PARCELAS EXPERIMENTALES A CAMPO

7.1 Introducción

El N_2O es uno de los gases de efecto invernadero con mayor poder calórico, superando hasta 298 veces el poder de calentamiento del CO_2 y 13 veces mayor que el metano (CH_4) y posee una vida media de más de 100 años en la atmósfera. Así mismo, el aumento de las emisiones de este gas contribuye a la destrucción de la capa de ozono que actúa como filtro de la radiación ultravioleta (IPCC, 2007). La concentración de N_2O en la atmósfera se ha incrementado un 20% desde 1850 (IPCC 2013), debido principalmente a la conversión de bosques a suelos agrícolas y al incremento en el uso de fertilizantes nitrogenados (Granli y Bockman, 1994). Las actividades agrícolas son las mayores responsables de las emisiones globales de N_2O de todas las emisiones antropogénicas (Denman et al. 2007). Actualmente se reconoce que la agricultura es responsable de cerca del 84% de las emisiones mundiales de N_2O antropogénico y del 53% de las de CH_4 , mientras que, la mayor parte del CO_2 proviene del uso de combustibles fósiles (Robertson, 2014), es decir, el N_2O ocupa un lugar relevante como fuente de emisiones a nivel agrícola (Ver Figura 21).

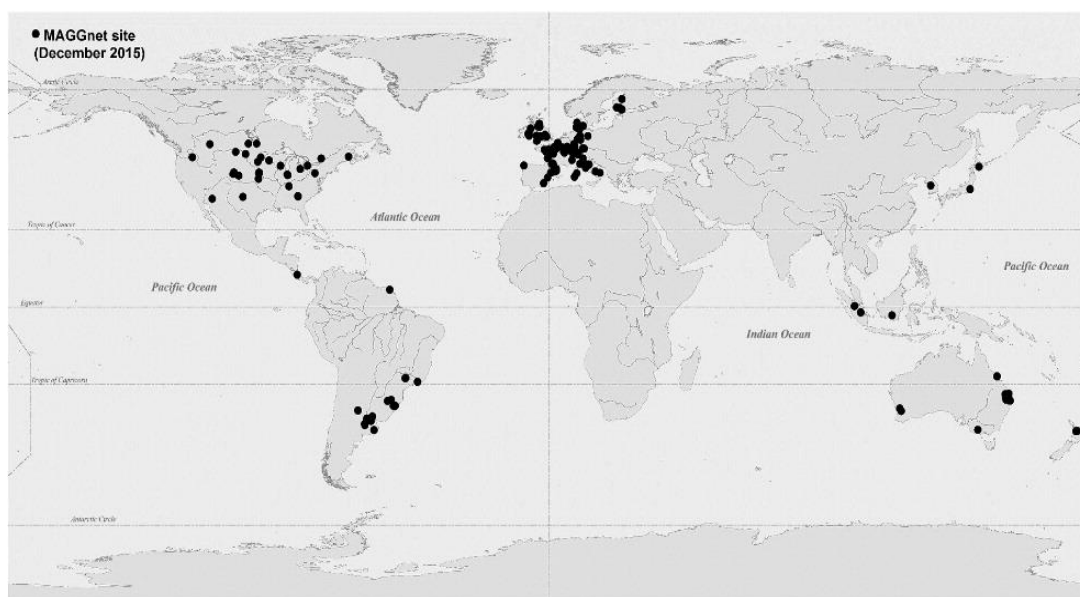


Figura 21. Distribución a nivel global de los sitios de estudio de emisiones de Gases de Efecto Invernadero (MAGGnet). (Liebig et al. 2016).

Las emisiones de N_2O de suelos agrícolas provienen principalmente de los procesos de nitrificación y desnitrificación (Johnson et al. 2007) y dependen principalmente de la actividad

de los microorganismos del suelo y de la disponibilidad de carbono y nitrógeno, temperatura, pH del suelo, condiciones edáficas y meteorológicas, manejo de suelo y cultivo (Conrad, 1996; Mosier, 1998; Mosier, 2001). Para el caso de la desnitrificación consiste en la reducción del nitrato o del nitrito a nitrógeno diatómico, con el pasaje a través de formas oxidadas intermedias correspondientes al NO y N₂O (Sameshina et al. 2003). La capacidad de desnitrificar es infrecuente entre los rizobios, y sólo algunas cepas del género *Bradyrhizobium* pueden realizarla de manera completa. Específicamente el último paso de la desnitrificación es vital en suelos donde se encuentren rizobios potencialmente emisores de N₂O, debido a que la reducción de N₂O a N₂ comprende una reacción catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa (Nos), codificada por el gen *nosZ* (Bedmar et al. 2005) y ausente en la mayoría de los rizobios encontrados en suelos cultivables.

Como es bien conocido, los rizobios establecen relaciones simbióticas con *Bradyrhizobium*-leguminosas y su inoculación tiene una gran repercusión tanto en el aumento de la productividad del cultivo, como en la nutrición humana y animal. En Argentina, la producción de soja constituye el principal renglón agropecuario. Su producción ha aumentado notablemente en los últimos años como consecuencia de aumentos de la superficie cultivada con soja y el aumento del rendimiento de la misma (Díaz-Zorita, 2004). Como se ha evidenciado en los capítulos anteriores, las cepas frecuentemente utilizadas en la inoculación del cultivo de la soja son, en su mayoría, desnitrificantes incompletas y teniendo las áreas sembradas en Brasil y Argentina el cultivo de soja podrá ser responsable del aumento de las emisiones de N₂O.

Así, el objetivo de este capítulo es determinar la influencia de las inoculaciones rizobiales con desnitrificación completa e incompleta en los flujos de N₂O en suelos cultivados con la soja en condiciones experimentales a campo.

7. 2 Materiales y Métodos

7.2.1 Flujos de óxido nitroso en experimentos en condiciones semicontroladas

7.2.2 Flujos de N₂O en parcelas experimentales a campo.

7.2.2.1 Material biológico

Se utilizaron las cepas CPAC15 y E109 de *B. japonicum*; SEMIA 5019 y 587 de *B. elkanii* y CPAC 7 de *B. diazoefficiens*, que están registradas y autorizadas para la formulación de inoculantes en Argentina y Brasil. Para los experimentos en condiciones de simbiosis con plantas de soja, se empleó la variedad Don Mario 4214.

7.2.2.2 Condiciones de cultivo bacteriano

Para el crecimiento y mantenimiento de los cultivos bacterianos en condiciones de vida libre, así como para los inoculantes aplicados en las plantas de soja se utilizó el medio de cultivo PSY suplementado con 0,1% de arabinosa (Regesburger y Hennecke, 1983) y el medio YMA de acuerdo a Vincent, (1970).

7.2.2.3 Diseño Experimental

El experimento se realizó en la Estación Experimental Manantiales, ubicada en la localidad de Chascomús (Provincia de Buenos Aires), en un terreno donde no se había cultivado soja históricamente. El ensayo se inició con la siembra el 05/01/2017 y los dos muestreos del experimento se realizaron en las etapas reproductivas R7 (inicio de maduración) y R8 (Maduración completa). El ensayo se realizó aplicando un diseño experimental con bloques al azar (3 bloques con 7 tratamientos). Cada bloque tenía 3 metros de ancho por 20 metros de largo. Los tratamientos evaluados fueron los siguientes:

T1: Inoculación con *B. diazoefficiens* CPAC 7

T2: Inoculación con *B. diazoefficiens* USDA110

T3: Inoculación con *B. japonicum* CPAC 15

T4: Inoculación con *B. japonicum* E109

T5: Inoculación con *B. elkanii* SEMIA 587

T6: Inoculación con *B. elkanii* SEMIA 5019

T7: Testigo sin inoculación / Control

El diseño de los bloques se muestra en la Figura 22.

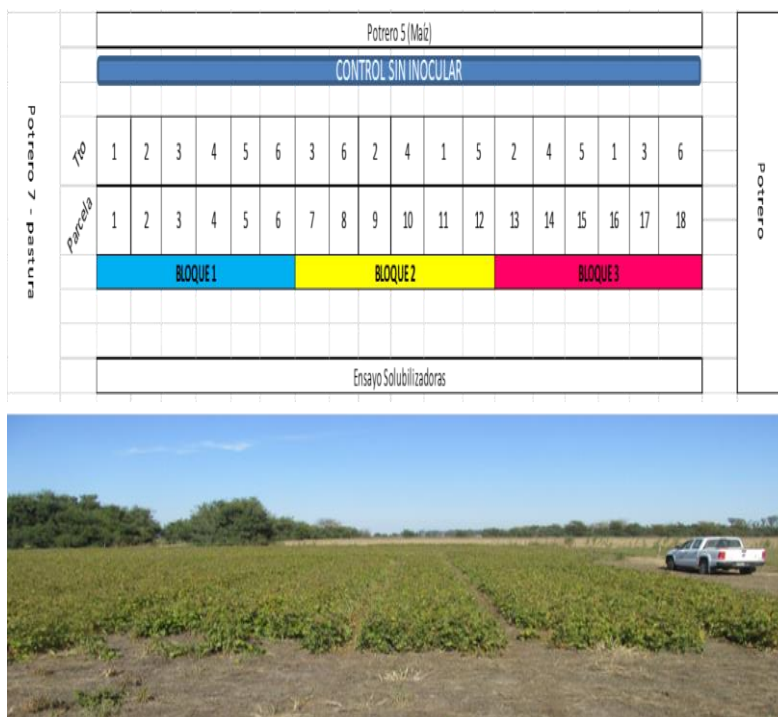


Figura 22. Diseño experimental del ensayo en parcelas a campo.

En todos los casos, los parámetros evaluados en cada tratamiento fueron: 1) Peso seco parte aérea; 2) Número de nódulos (Raíz principal + Raíces secundarias); 3) Peso seco de nódulos; 4) Fijación Biológica de Nitrógeno 5) Emisión de N_2O y 6) Rendimiento en grano. Los parámetros agronómicos fueron realizados en la etapa fenológica R7 y la medición de N_2O se realizó en la etapa fenológica R7 y R8, puesto que de acuerdo a la literatura consultada, las máximas emisiones se presentan en las últimas etapas del cultivo de soja (Uchida y Akiyama, 2013).



Figura 23. Cámara de captura de gases (N_2O).

Para la determinación de N_2O utilizaron cámaras de muestro de gases de 10 cm de altura de acuerdo a las condiciones descritas por Parkin et al. (2006). En cada muestreo realizado se utilizaron 2 cámaras de captura de gases por parcela evaluada y se realizaron muestreos en tres tiempos (0-15-30 minutos). Se colocó un termómetro en las cámaras para registrar la temperatura interna en el momento de realizar la medición. Previo a la medición, se pusieron bases metálicas en el suelo con un canal intermedio en donde encajaban las cámaras. Para evitar pérdidas de aire, cada cámara fue asegurada con una banda elástica ajustada al marco metálico. Las muestras fueron tomadas en jeringas de 1 ml y posteriormente fueron transferidas a viales de 20 ml, a los cuales se les hizo vacío previamente con una bomba de vacío manual hasta una presión de -80psi. Los viales fueron sellados con barniz resistente al agua y la humedad. Las muestras dispuestas en los viales fueron conservadas y posteriormente trasladadas al Laboratorio de Bioquímica Ambiental II, de la EEA- INTA Balcarce, en donde fueron analizadas de acuerdo a lo descrito en el capítulo III, experimento 3 del ítem 6.2.1.2. Para cada momento de muestreo se tomaron fracciones de suelo para determinar el contenido de humedad, el contenido de N mineral y carbono soluble (Venterea, 2010). Para el análisis y procesamiento de la información de parámetros agronómicos, se utilizó el análisis de varianza univariante (UNIANOVA) y la comparación de medias se realizó por el Test de Tukey al 5% de probabilidad utilizando el software SAS 9.0 para Windows. Para el análisis de la información de la correlación de todos los parámetros agronómicos y su correlación con la

emisión de N₂O se realizó el análisis de correlación de Pearson y se utilizó la prueba no paramétrica de Friedman. Para determinar el efecto de la inoculación sobre cada parámetro evaluado se realizó un análisis de componentes principales (ACP) con el software R Studio.

7.2.2.3 Reaislamiento e identificación de los rizobios inoculados mediante ERIC-PCR

7.2.2.3.1 Aislamiento de los rizobios inoculados a partir de nódulos

Se tomaron 100 nódulos de raíces de soja por tratamiento evaluado y se desinfectaron con 1% Cloramina T (v/v) durante 10 min., 90 % etanol comercial (v/v) durante 5 min. y tres lavados consecutivos con agua destilada estéril. Se realizó el macerado de los nódulos y se tomaron 20 µl que se sembraron en medios EMA (Vincent, 1970). Posteriormente se seleccionaron las colonias de acuerdo a la cepa control previamente inoculada y realizaron siembras sucesivas hasta obtener cultivos puros. Para garantizar que los aislamientos fueron aislados de los nódulos, se sembraron nódulos desinfectados y se incubaron en medio EMA y de esta forma se verificó la ausencia de colonias en el medio y el óptimo protocolo de desinfección.

7.2.2.3.2 Identificación de los rizobios inoculados mediante ERIC-PCR

Para el chequeo molecular de los rizobios se utilizó el oligonucleótido para ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus) (Versalovic et al. 1991). Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 25 µL, conteniendo 10 µM del primer BOX, 8 µM de dNTP's, 10X de buffer de reacción (Bioprobe Systems/Quantum, France), 5 unidades de *Taq* DNA polimerase (Appligene-Oncor, France) y 2 µL de ADN genómico obtenido por el protocolo de extracción con Chelex 100 al 6%. Para la amplificación mediante PCR se utilizó un termociclador ajustado a las siguientes condiciones: (1) 95 °C/7 minutos; (2) 35 ciclos de: 94 °C/1 minuto, annealing a 52 °C/1 minuto, luego 65 °C/8 minutos; y (4) una etapa de extensión final a 68 °C/16 minutos. Los productos de PCR fueron revelados por electroforesis en gel de 2% agarosa en solución buffer TBE (Tris/Borato/EDTA) (Sambrook y Russell, 2001), teñido con bromuro de etidio (EtBr 1,25 mg/L) y visualizado bajo luz UV. Los perfiles obtenidos fueron comparados por similitud en los patrones de bandas entre las cepas control (rizobios inoculados) y las cepas aisladas a partir de los nódulos. Se consideraron patrones idénticos a aquellas bandas que tuvieron la misma distancia de migración respecto al marcador de peso (100 pb).

7.3 Resultados

7.3.1 Determinación de los parámetros agronómicos y los flujos de N₂O en parcelas experimentales a campo

7.3.1.1 Número de nódulos en raíces de soja inoculadas con *Bradyrhizobium* sp.

Los resultados del número de nódulos se describen en términos de porcentaje del número de raíces principales (NRP) y secundarias (NRS) (figura 24).

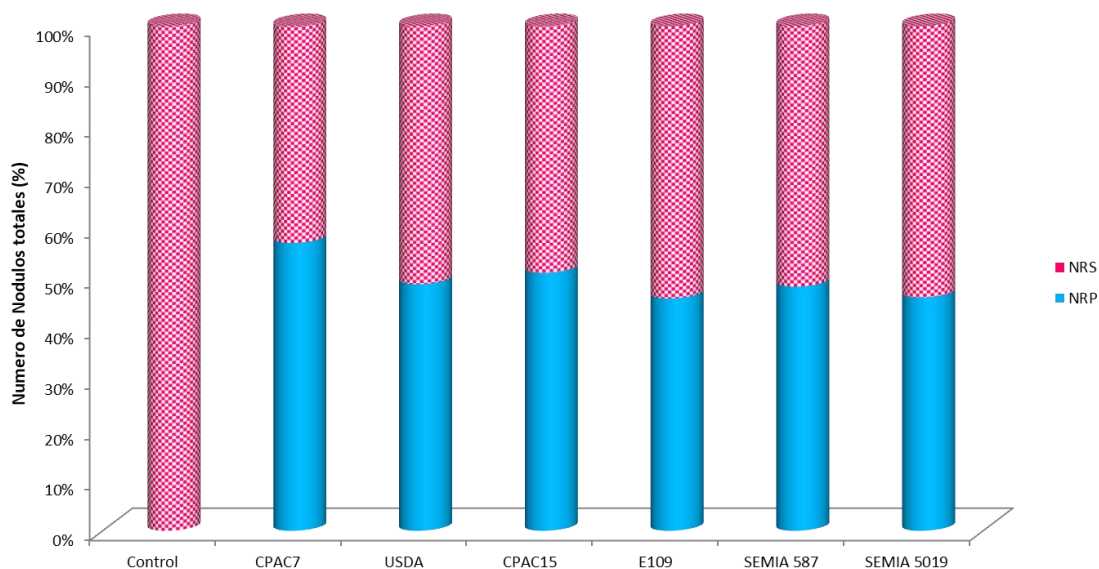


Figura 24. Porcentaje de nódulos en raíces de soja inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. Los resultados corresponden al número de nódulos en raíz principal (NRP) y raíces secundarias (NRS) que aportan al número total de nódulos agrupados por cepa inoculada.

El total de nódulos por rizobio inoculado (figura 24) muestra que las parcelas inoculadas con CPAC7, CPAC15 y USDA110 tienen en promedio una relación 50:50 entre NRS/NRP, mientras que para el resto de los tratamientos los nódulos se establecieron en la raíz principal. Para el caso del control, se extrajeron 12 plantas para verificar la presencia o ausencia de nódulos en las raíces y se encontró una única planta con 2 nódulos (no activos, sin presencia de rizobios en medio EMA) en raíces secundarias representan el total (100%) de los nódulos presentes en el muestreo.

7.3.1.2 Peso seco de nódulos de raíces de soja inoculadas con *Bradyrhizobium* sp.

Los resultados de peso seco de nódulos (PSN) se detallan a continuación en la figura 25.

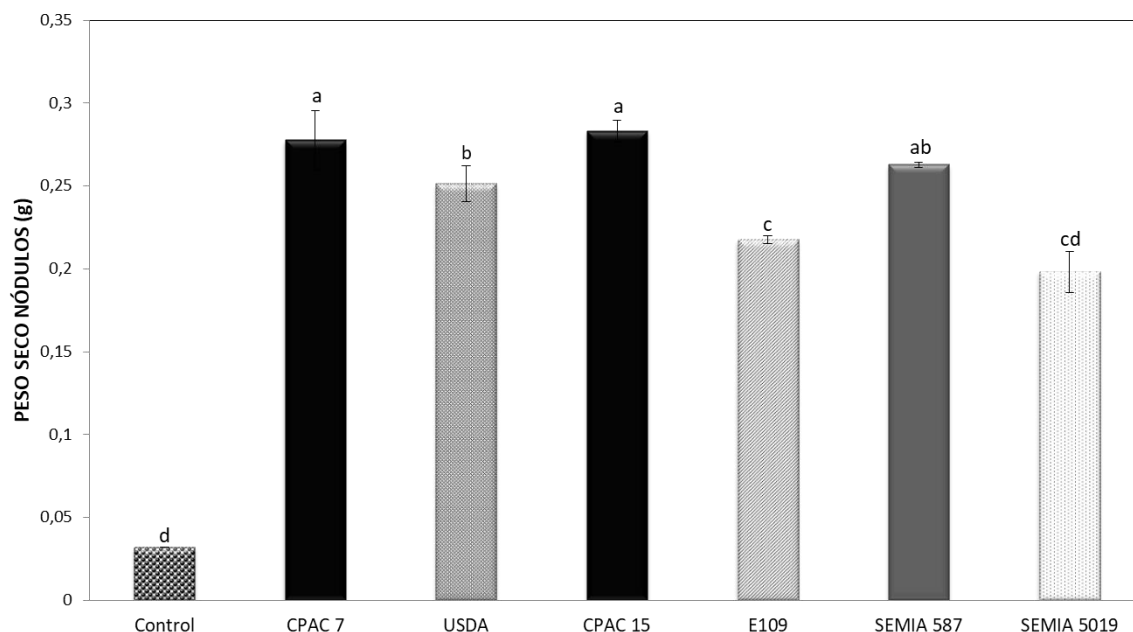


Figura 25. Peso seco de nódulos de raíces de soja inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. Los resultados presentan el peso seco total agrupado por cepa inoculada. Los valores y representan la media de 5 repeticiones seguida del error estándar. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas en relación a cada variable evaluada de acuerdo a la prueba de Tukey HSD ($p < 0.05$).

Revisando el PSN total por cepa inoculada se evidenció que CPAC7 y CPAC15 presentaron diferencias estadísticamente significativas. No obstante, los valores de SEMIA587 y USDA110 fueron altamente significativos respecto a estas cepas y al control. Los valores de peso más bajos fueron encontrados para E109 y SEMIA 5019 (para mayor información, ver figuras suplementarias 1, 2 y3).

7.3.1.3 Peso seco de la parte aérea plantas de soja inoculadas con *Bradyrhizobium* sp.

Los datos del peso seco de la parte aérea (PSA) se muestran a continuación en la figura 26.

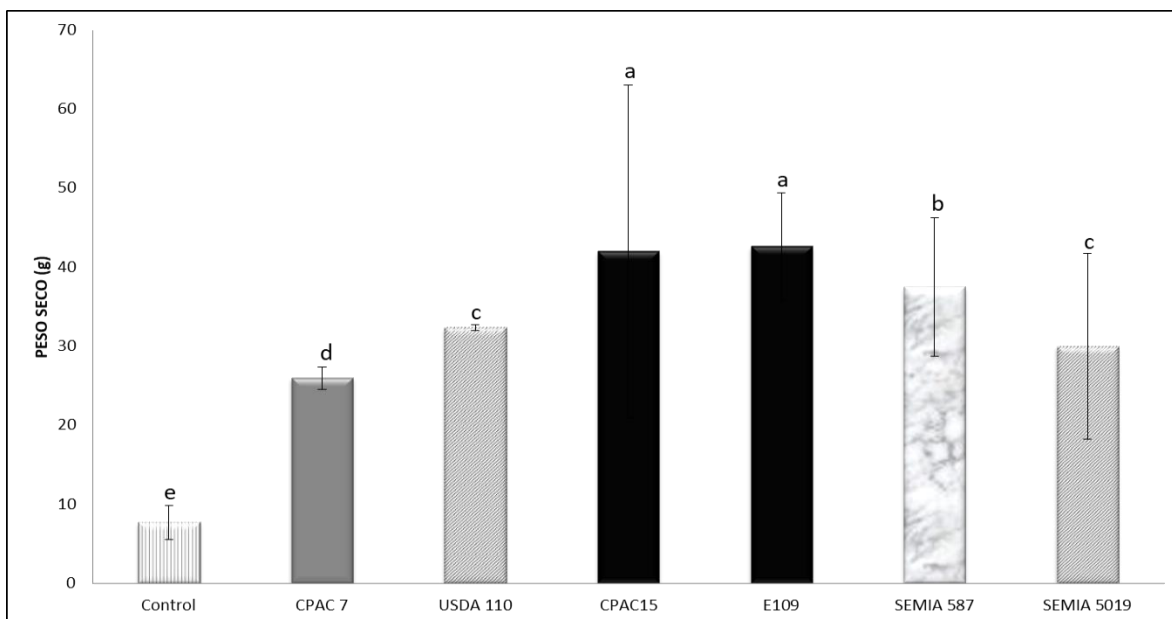


Figura 26. Peso seco de parte aérea de plantas de soja inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. Los resultados presentan el peso seco agrupado por cepa inoculada en las tres parcelas. Los valores y representan la media de 5 repeticiones seguida del error estándar. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas en relación a cada variable evaluada de acuerdo a la prueba de Tukey HSD ($p < 0.05$).

Analizando los promedios de peso seco de plantas por cepa inoculada (Figura 26) se confirma que los tratamientos inoculados con CPAC15 y E109 presentaron los valores más altos de PSA. No obstante, los tratamientos inoculados con SEMIA 587 presentan valores no muy alejados de estos. Los valores más bajos fueron encontrados en los tratamientos con inoculación de las cepas SEMIA 5019, USDA110, y el control sin inoculación.

7.3.1.4 Producción de óxido nitroso (N_2O)

Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 27 y 28.

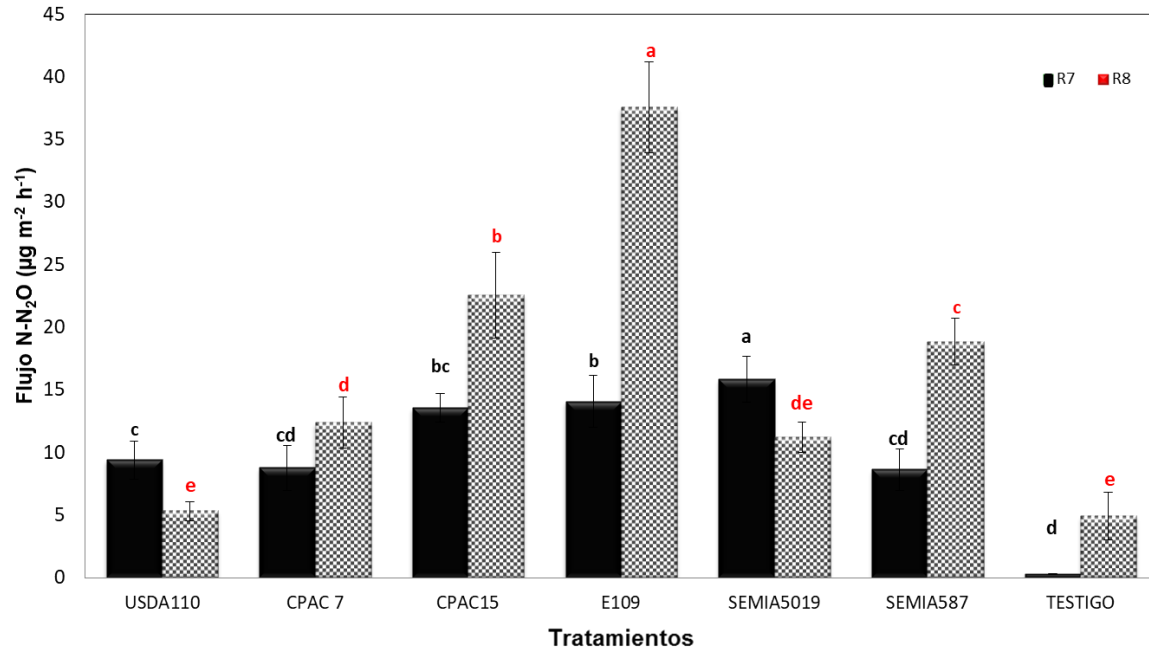


Figura 27. Flujos de N₂O desde el suelo en parcelas cultivadas con soja inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. en estadíos R7 y R8. Los valores se expresan como $\mu\text{g mol de N}_2\text{O h}^{-1}\text{g}^{-1}$. Las diferencias estadísticamente significativas Friedman ($p < 0,05$) se muestran para cada muestreo realizado: Letras negras corresponden a R7 y letras rojas a R8.

Analizando los flujos de manera independiente en la figura 27, en el estadio R7 los flujos de producción de N₂O fueron más altos para SEMIA 587, E109 y CPAC15 y los valores más bajos fueron para USDA110, SEMIA 5019, CPAC7 y el control sin inocular. En el caso del estadio R8, la dinámica se mantiene respecto a los tratamientos con mayores valores de producción (E109 y CPAC15), mientras que USDA110, SEMIA 5019, CPAC7 y el control presentaron los valores más bajos. No obstante, cuando se analizó la medición de los flujos para ambos muestreos se observa un aumento considerable en la producción de N₂O en todos los tratamientos, excepto SEMIA 5019 y USDA110 comparados con el control. De igual forma se observó un aumento de más de un 30% para CPAC15 y 60% para E109. Aun cuando ambos tratamientos (CPAC15 y E109) presentaron flujos similares en R7, E109 produjo valores considerablemente más altos que CPAC15 en R8. Este aumento representativo en R8 también se observó en SEMIA 587 y en el tratamiento testigo, el cual presenta valores muy bajos respecto a todos los tratamientos en ambos muestreos pero se observa un aumento en los flujos respecto a los valores en R7.

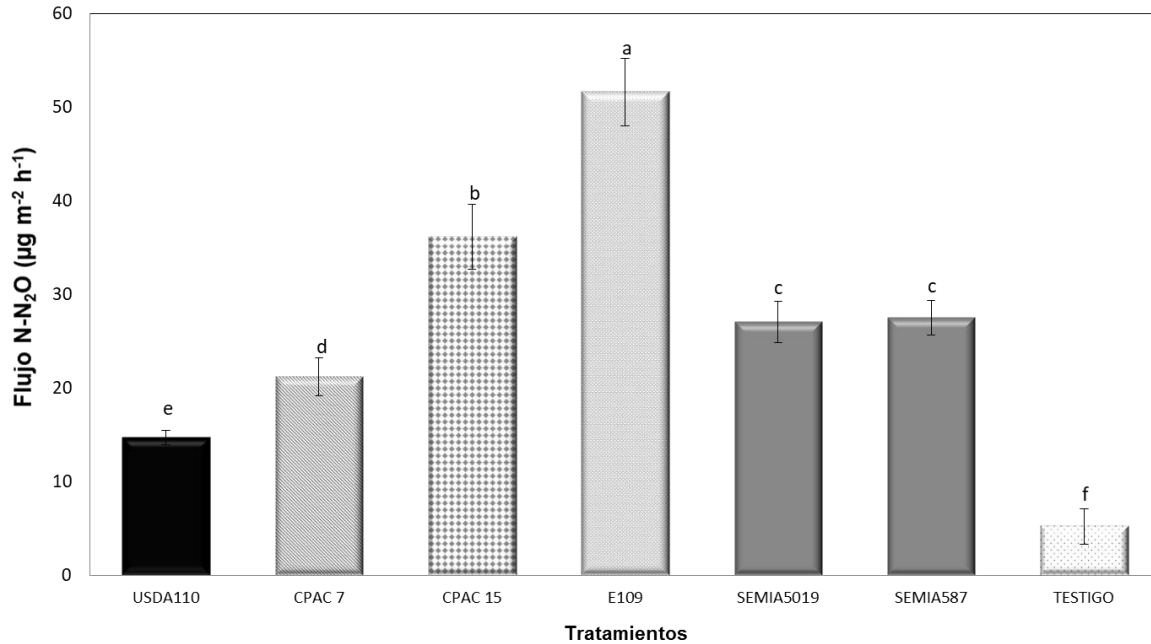


Figura 28. Flujos de N₂O acumulado desde el suelo en parcelas cultivadas con soja inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. en estadios R7 y R8. Los valores se expresan como µmol de N₂O h¹g⁻¹. Las diferencias estadísticamente significativas de acuerdo al test de Friedman (p<0,05)

Cuando analizamos los flujos de emisión de N₂O por cepa inoculada (Figura 28) se confirma la tendencia a mayores producciones por parte de suelos de soja inoculados con cepas con desnitrificación incompleta. Los flujos de producción de N₂O para tratamientos inoculados con E109 presentaron diferencias estadísticamente significativas que superan 4 veces las emisiones del tratamiento control y hasta dos veces las emisiones encontradas en tratamientos con cepas con inoculación de bacterias con desnitrificación completa (USDA110 y CPAC7). Los promedios acumulados para SEMIA 5019 y SEMIA 587 fueron similares entre sí, pero muy superiores a la producción del tratamiento control y de USDA110 y CPAC7.

7.3.1.5 Rendimiento

Los resultados de rendimiento de muestran a continuación en la Figuras 29.

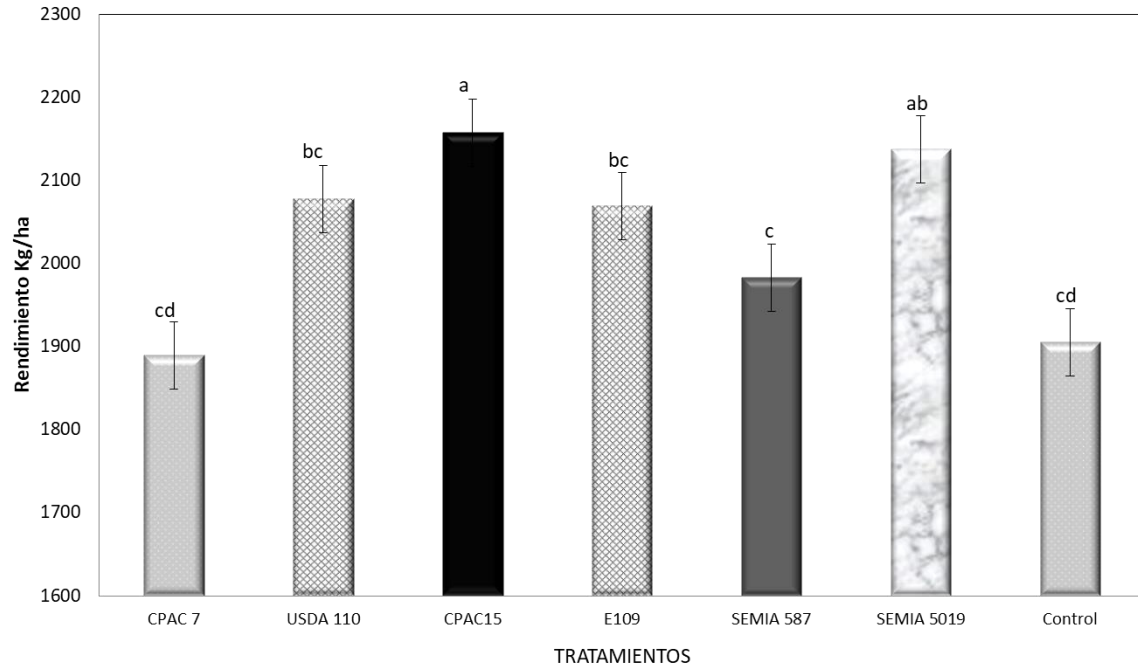


Figura 29. Rendimiento del cultivo de soja inoculada con 6 cepas de *Bradyrhizobium* sp. en estadio R7. Los valores se expresan en Kg/ha y corresponden al promedio de 3 réplicas experimentales seguidas del error estándar.

De acuerdo a los resultados obtenidos se presentaron diferencias significativas en el rendimiento del tratamiento inoculado con CPAC15 y SEMIA 5019, las cuales tuvieron un rendimiento del 20% más que el tratamiento control (sin inocular). Los siguientes mejores valores de rendimiento encontrados fueron para el tratamiento inoculado con USDA110 y E109 que superó hasta un 5% en ambos casos el rendimiento del tratamiento control. Los rendimientos más bajos fueron obtenidos en los tratamientos SEMIA 587, CPAC 7 y el control sin inocular.

7.3.1.6 Estimación del Coeficiente de correlación entre parámetros y tratamientos.

a) Mediante el coeficiente de correlación de Pearson

Con el propósito de evaluar el grado de relación de las variables evaluadas, se realizó la determinación de Pearson, que representa la correlación lineal existente en dos variables cuantitativas. Los resultados se presentan a continuación en la Tabla 13.

Tabla 13. Matriz de correlaciones de Pearson (n) entre las variables evaluadas en condiciones experimentales en parcelas a campo.

Variables	NNT	PSN	PSA	N ₂ O	Rend.	¹⁵ N	HR	C. Solub.	N-NO ₃
NNT		2,35E-05	0,004	0,005	0,001	0,360	0,901	0,991	0,666
PSN	0,787		0,072	0,010	0,261	0,269	0,994	0,281	0,245
PSA	0,599	0,4		0,040	0,044	0,048	0,312	0,741	0,653
N ₂ O	0,592	0,547	0,451		0,137	0,958	0,793	0,593	0,928
Rend.	0,673	0,256	0,443	0,335		0,238	0,946	0,944	0,104
¹⁵ N	0,210	0,252	0,437	-0,012	0,269		0,481	0,062	0,179
HR	-0,029	0,0017	-0,232	-0,061	0,016	0,163		0,055	0,004
C. Solub.	0,002	0,246	-0,077	-0,124	-0,016	0,414	0,424		0,642
N-NO ₃	-0,100	-0,265	-0,104	-0,021	0,365	0,305	0,601	0,107	
R²									

(p<0,05)

*NNT: Número Total de Nódulos; PSN: Peso Seco de Nódulos; PSA: Peso Seco Parte Aérea; N₂O: Flujo de óxido nitroso; Rend.: Rendimiento; ¹⁵N: Contenido de N₂; HR: Humedad Relativa; C. Solub.: Carbono Soluble; N-NO₃: Contenido de nitratos.

En la Tabla 13, el triángulo superior en tonos azules y rosas describe si una correlación (p<0,05) es positivamente o negativamente significativa, respectivamente. A mayor color azul o mas rojo, mayor correlación. Los cuadros azules que presentan un borde negro representan los parámetros con mayor significancia en la correlación. El triángulo inferior se describe el valor de R², en tonos amarillos se destacan los que tienen un R² con mayor correlación y se encierran en color marrón aquellos cuyo R² está más cercano a 1. Como se observa, los cuadros amarillos destacados en color marrón, corresponden a los mismos parámetros con correlación significativa del triángulo superior (Cuadros azules con borde negro). De acuerdo a los resultados obtenidos en ésta matriz, se presentó una correlación positiva y significativa entre PSN/NNT (78%) y PSA/NNT (59%), es decir, que existe una relación directa de aumento de un factor cuando el otro también lo hace. Así, podríamos entender que el número total de nódulos tuvo una correlación con el peso seco de tales órganos o que el peso seco de la parte aérea de las plantas estuvo asociado al número total de nódulos de esas plantas. Esto define una estrecha relación entre los parámetros de PSA y NNT, con lo cual se infiere que en condiciones en las que la simbiosis es activa en los nódulos, el número juega un papel fundamental en el peso de los mismos y en el aumento del peso de la parte aérea de la planta.

La variable rendimiento (Rend.), se correlacionó positivamente con el NNT (67%) y con PSA (44%). También se observó una correlación positiva entre $^{15}\text{N}/\text{PSA}$ (43%) y $\text{N-NO}_3/\text{HR}$ (60%). Para el caso de la correlación N_2O se encontró relacionado positivamente con los parámetros NNT (59%), PSN (54%), PSA (45%) y Rendimiento (33,5%), es decir, existe una relación directamente proporcional entre estos parámetros y la producción del gas: El aumento de NNT, PSN, PSA, y rendimiento podrían aumentar los niveles de óxido nitroso.

b) Mediante el análisis de componentes principales (ACP)

Los resultados obtenidos mediante el análisis de componentes principales muestran que las dos primeras componentes explican el 58,7% de la variabilidad del experimento; el 35,6% de la variación se describió por la primera componente principal (PCA1) y el 23,1% por la segunda componente (PC2). De aquí la información contenida en las nueve variables originales se explican mediante estas dos componentes, las cuales recolectaron la mayor información. Los resultados se presentan a continuación en la Figura 30.

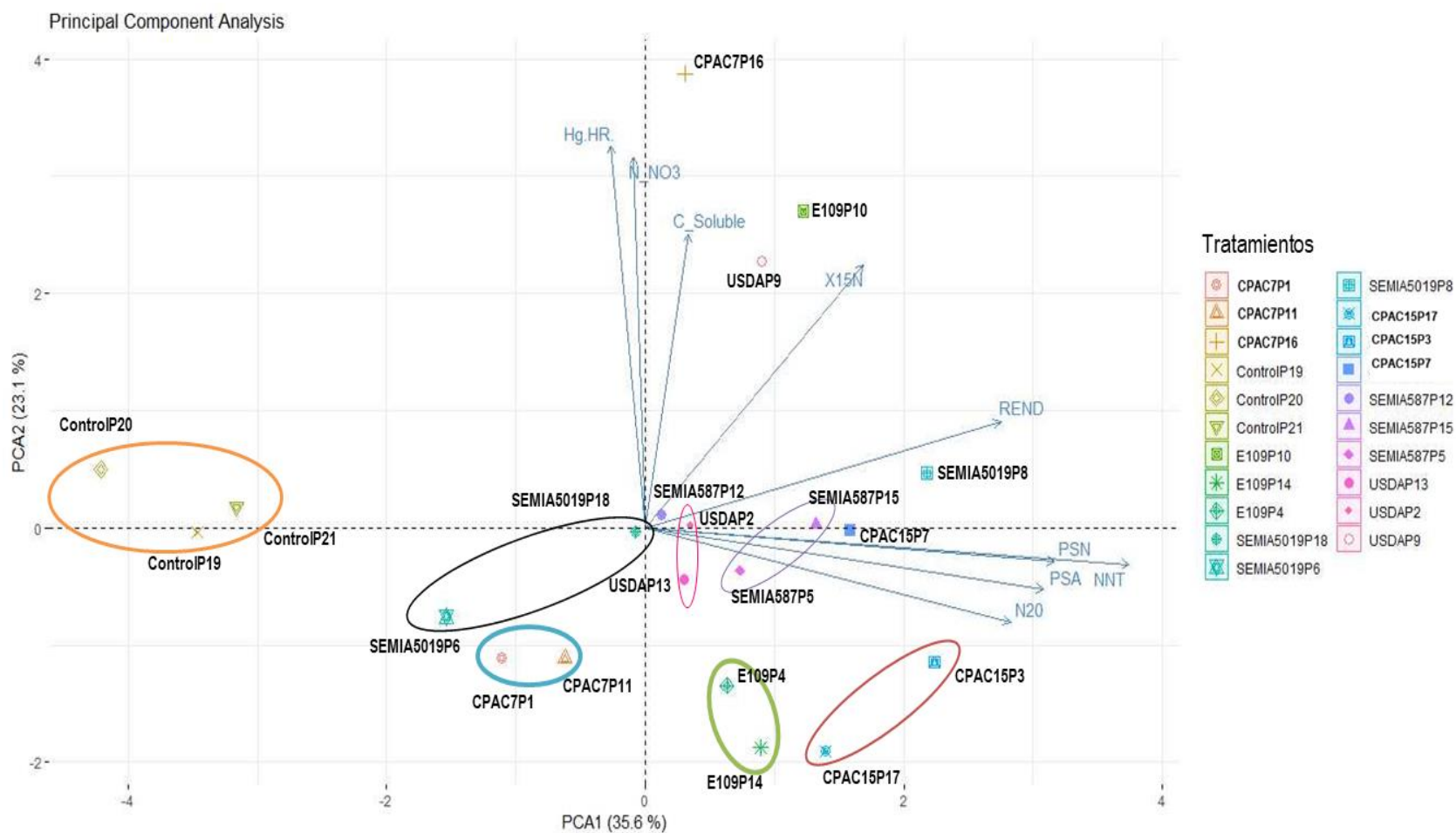


Figura 30. Análisis de componentes principales (ACP) de los tratamientos inoculados en parcelas experimentales a campo con *Bradyrhizobium* sp.. El diagrama de dispersión describe el experimento con las componentes PCA1 y PCA2

Como se observa en la Figura 30 no hubo un agrupamiento por cepa inoculada en el diagrama de dispersión, excepto para los tres tratamientos control, los cuales se correlacionaron negativamente con los parámetros NNT, PSN, PSA, N₂O y rendimiento. Los tratamientos USDAP9 y E109P1 tuvieron una correlación positiva en C soluble y en la fijación biológica de nitrógeno (¹⁵N). SEMIA5019P8 correlacionó positivamente con el rendimiento. Para el caso de CPAC7P1 y CPAC711 (elipse azul) y SEMIA5019P6 y SEMIA5019P18 (Elipse negro) se ve una correlación negativa respecto al rendimiento y a ¹⁵N, es decir, los tratamientos inoculados con SEMIA 5019 en estas parcelas influyeron negativamente en la fijación biológica de nitrógeno y por ende en los rendimientos obtenidos. Los tratamientos E109P4, E109P14 (elipse verde), CPAC15P17 y CPAC15P3 presentaron correlación negativa con humedad relativa (HR), N-NO₃ y se correlacionaron positivamente, más que los otros tratamientos con N₂O. Sin embargo el gráfico muestra que CPAC15P3 fue quién tuvo la correlación más cercana con esta variable.

7.3.1.7 Re-aislamiento e identificación de los rizobios inoculados mediante ERIC-PCR

7.3.1.7.1 Re-aislamiento de rizobios tentativos

A partir de los nódulos seleccionados para el aislamiento de los rizobios previamente inoculados, se obtuvo como resultado, un total de 57 cepas rizobiales cultivadas en medio Extracto de levadura Manitol (EMA) (Vincent ,1970). El número de aislamientos de cada muestra se detalla a continuación en la Tabla 14. En el caso del control, a partir de los 2 únicos nódulos (sin color rosa, característicos de nódulos con actividad de fijación de nitrógeno activa) no se encontraron cepas con características presuntivas de rizobios. Las muestras provenientes de nódulos macerados no presentaron crecimiento en los medios utilizados para el protocolo de aislamiento (YMA y TSA).

Tabla 14. Aislamientos obtenidos de las parcelas inoculadas con *Bradyrhizobium* sp.

Cepa	Parcelas Inoculadas	Número de Aislamientos
CPAC7	P1/P11/P16	7
USDA110	P2/P9/P13	8
CPAC15	P3/P7/P17	10
E109	P4/P10/P14	11
SEMIA 587	P5/P12/P15	11
SEMIA 5019	P6/P8/P18	10
Control	-	-
Total		57

Como se indica en la Tabla 14, los aislamientos se agruparon de acuerdo al morfotipo presuntivo en comparación con el morfotipo de las tres especies de *Bradyrhizobium* sp. utilizadas en este experimento: *B. japonicum*, *B. diazoefficiens*, *B. elkanii*. En cada caso se utilizó como referencia el mismo rizobio inoculado en las semillas correspondientes a cada parcela (ver Figura 31).



Figura 31. Selección de rizobios tentativos teniendo como referencia la cepa madre inoculada en cada parcela.

A partir de estos aislamientos, se realizó la caracterización y confirmación molecular correspondiente para establecer si las cepas inoculadas fueron las mismas que establecieron la simbiosis en cada caso. Los resultados del análisis molecular se muestran a continuación:

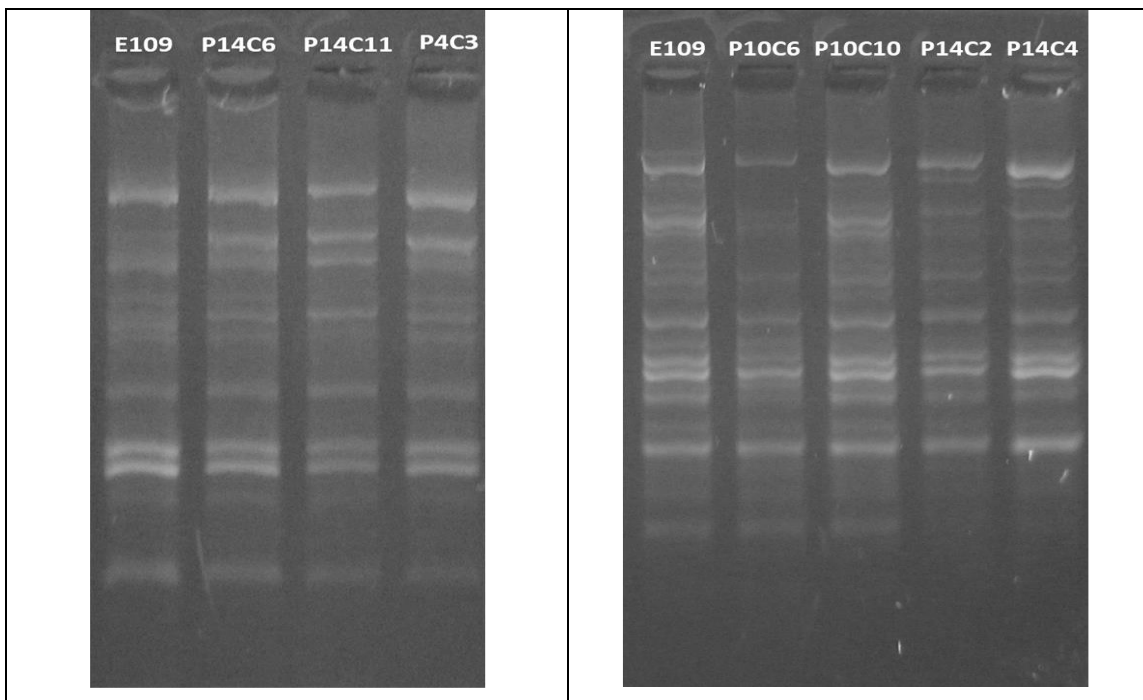


Figura 32. Amplificación de ERIC-PCR en electroforesis en gel de agarosa para las cepas tentativas de *B. japonicum* E109. El tratamiento fue inoculado con la cepa E109 (Control positivo) y las parcelas inoculadas fueron P4, P10 y P14. La letra C corresponde a las colonias y el respectivo número asignado para identificar cada cepa re aislada.

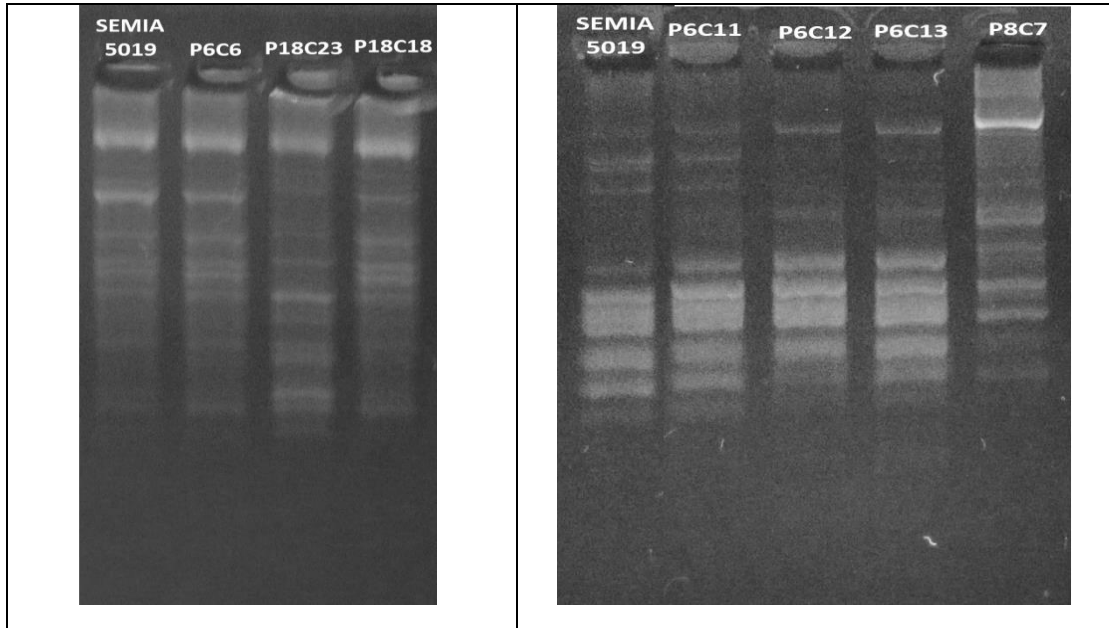
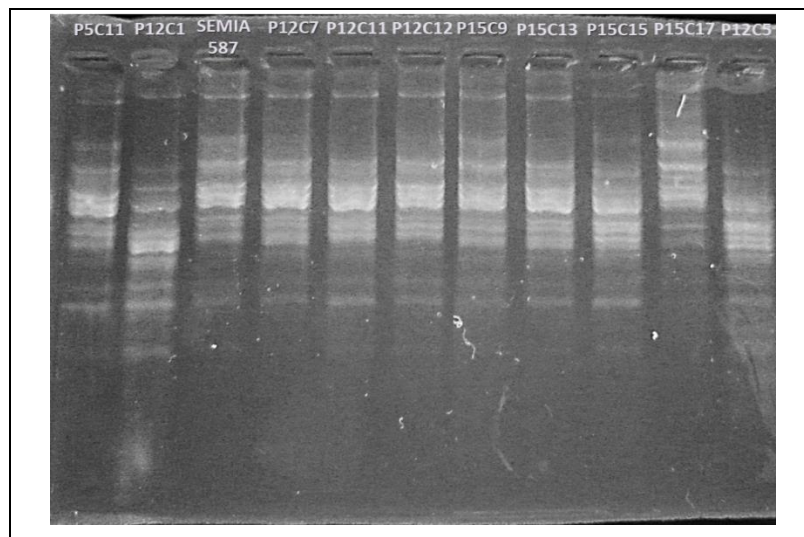


Figura 33. Amplificación de ERIC-PCR en electroforesis en gel de agarosa para las cepas tentativas de *B. elkanii* SEMIA 5019. El tratamiento fue inoculado con la cepa SEMIA 5019 (Control positivo) y las parcelas inoculadas fueron P6, P8 y P18. La letra C corresponde a las colonias y el respectivo número asignado para identificar cada cepa re aislada.



Figuras 34. Amplificación de ERIC-PCR en electroforesis en gel de agarosa para las cepas tentativas de *B. elkanii* SEMIA 587. El tratamiento fue inoculado con la cepa SEMIA 587

(Control positivo) y las parcelas inoculadas fueron P5, P12 y P15. La letra C corresponde a las colonias y el respectivo número asignado para identificar cada cepa re aislada.

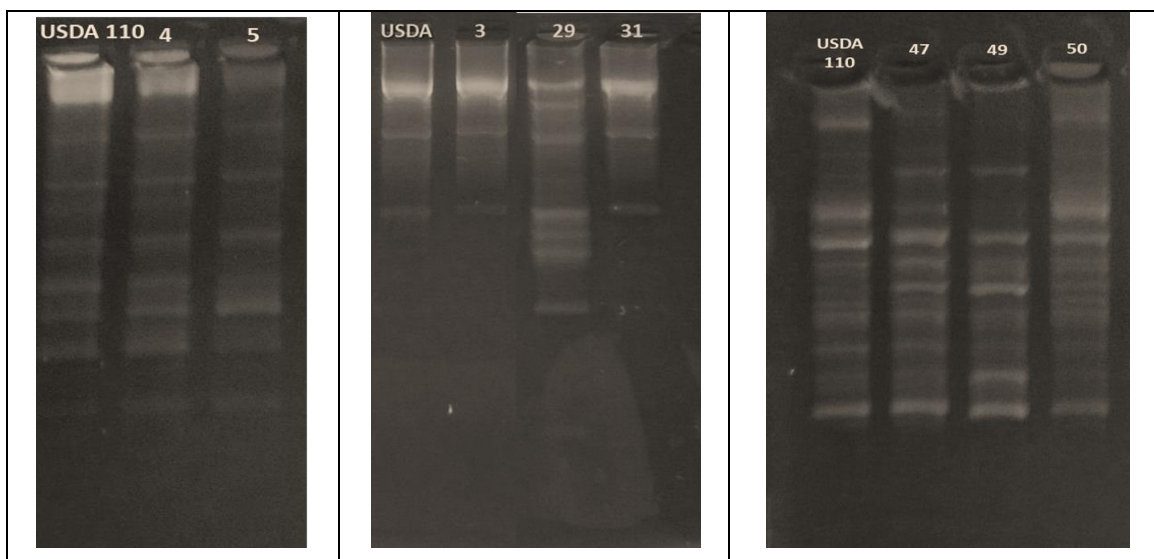


Figura 35. Perfil de ERIC PCR para cepas tentativas de *B. diazoefficiens* USDA110. El tratamiento fue inoculado con la cepa USDA 110 (Control positivo) y las parcelas inoculadas fueron P2, P9 y P13. La letra C corresponde a las colonias y el respectivo número asignado para identificar cada cepa re aislada.

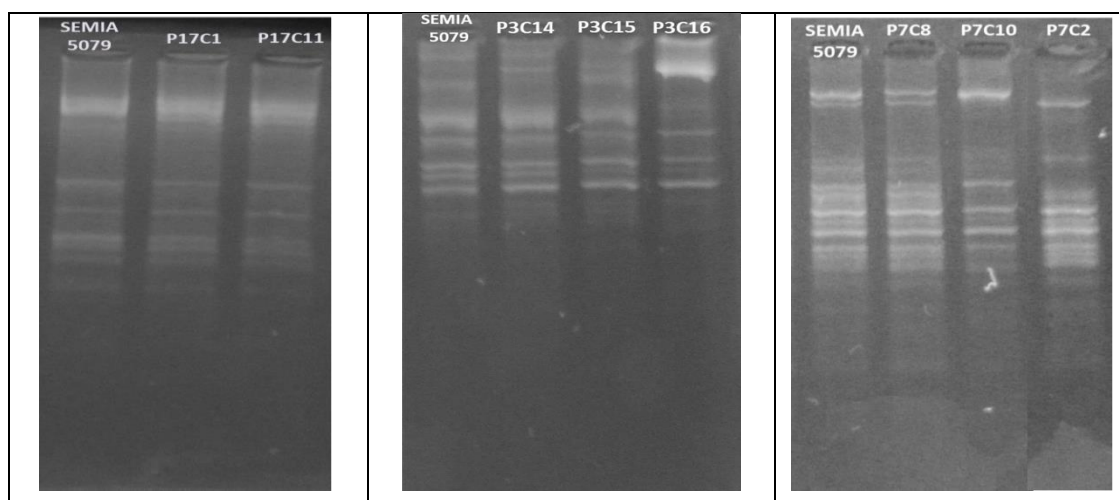


Figura 36. Amplificación de ERIC-PCR en electroforesis en gel de agarosa para las cepas tentativas de *B. japonicum* CPAC15. El tratamiento fue inoculado con la cepa CPAC15

(SEMIA 5079) (Control positivo) y las parcelas inoculadas fueron P3, P7y P17. La letra C corresponde a las colonias y el respectivo número asignado para identificar cada cepa re aislada.

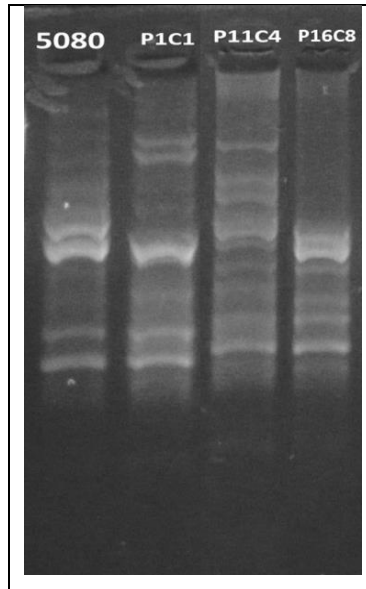


Figura 37. Amplificación de ERIC-PCR en electroforesis en gel de agarosa para las cepas tentativas de *B. Diazoeficiens* CPAC7. El tratamiento fue inoculado con la cepa CPAC7 (SEMIA 5080) (Control positivo) y las parcelas inoculadas fueron P1, P11y P16. La letra C corresponde a las colonias y el respectivo número asignado para identificar cada cepa re aislada.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se encontró que productos de PCR obtenidos de las distintas cepas re-aisladas a partir de nódulos amplificaron a la misma altura que cada cepa inoculada y utilizada como control de referencia. Como se observa en las figuras, la hibridación de secuencias repetidas por ERIC-PCR mostraron una correlación entre la cepa patrón y los perfiles en cada caso, lo que permiten inferir que se recuperaron los rizobios inoculados en cada parcela evaluada, es decir, que por cada tratamiento se realizó un screening en las tres parcelas correspondientes y se encontró en todos los casos la presencia del rizobio inoculado en el inicio del ensayo. De las 57 cepas aisladas 38 presentaron perfiles correspondientes a cada cepa inoculada en cada caso. Con lo cual se observa que el protocolo de re-aislamiento y la caracterización previa fueron acertados y permitieron

recuperar los rizobios previamente inoculados. Así mismo, los datos obtenidos para los flujos de emisión de N_2O (Ver figuras 27 y 28) pueden claramente atribuirse a raíces noduladas de soja que establecieron simbiosis con las cepas bradyrizobiales inoculadas. También se puede inferir que los parámetros agronómicos fueron favorecidos o promovidos por la fijación biológica de nitrógeno llevada a cabo por estas cepas en el interior de los nódulos. Como se observó en la tabla 13, los parámetros positivamente correlacionados fueron el peso seco de nódulos (PSN) con número total de nódulos (NNT) y peso seco de la parte aérea (PSA), pudiéndose atribuir el incremento de los parámetros de crecimiento al número y la ocupación de los nódulos por las cepas inicialmente inoculadas. Consecuentemente, el coeficiente de correlación fue positivo para $^{15}N/PSA$, lo que se puede atribuir, como se evidenció previamente en una relación directa entre la simbiosis con *Bradyrhizobium* sp. y su capacidad de promover parámetros de crecimiento y nutrición. Si bien los efectos anteriormente expuestos son favorables en términos agronómicos, también se encuentra una correlación no favorable en términos ambientales. Como también se describió en la tabla 13, se encontró una correlación positiva entre N_2O/NNT , N_2O/PSN , N_2O/PSA . Teniendo en cuenta que el chequeo molecular evidencia la presencia de los rizobios inoculados y la mayoría de estos son desnitrificadores incompletos, se infiere nuevamente que la inoculación con rizobios carentes de *nosZ*, podrían ser beneficiosos para la interacción con la soja y al mismo tiempo son un factor clave en el aumento de los flujos de óxido nitroso.

7.4 Discusión

Sobre el re-aislamiento e identificación de los rizobios inoculados podemos decir que la metodología utilizada para el chequeo molecular (ERIC-PCR), ha sido reportada comúnmente para tipificar bacterias con elevado poder de discriminación (López y Balatti, 2011; Anzuay et al., 2013; 2015). La similitud de las bandas respecto a cada cepa patrón utilizada como referencia permite inferir que los rizobios inoculados se alojaron en el nódulo y que la técnica utilizada es robusta y eficiente. Previos reportes han descrito el uso de regiones genéticas repetitivas de genomas bacterianos en estudio utilizando los primers de ERIC-PCR (Versalovic, 1994) para verificar el establecimiento de cepas inoculadas de diversos cultivos de leguminosas y no leguminosas, como en el screening

para verificar la presencia de *Pantoea* sp. y *Serratia* sp. en maíz (Anzuay et al. 2017). En comparaciones entre cepas parentales y transgénicas de *Bacillus licheniformis* y *Phanerochaete chrysosporium* en Alfalfa (Di Giovanni et al. 1998) y en cultivos susceptibles a al fitopatógeno *Xanthomonas fragaria* (Pooler et al. 1996) entre otros. Como se observa previamente, los reaislados coinciden con el perfil de bandas de cada control positivo. No obstante, tanto el número de cepas recuperadas de nódulos como el número de perfiles que resultaron con perfiles similares para tratamientos inoculados con la cepa CPAC 7 fue más bajo que en el resto de los tratamientos evaluados. Para los demás tratamientos se observó que amplificaron productos de PCR similares en todas las parcelas estudiadas. Si bien nuestro análisis no tiene como objetivo recuperar una muestra representativa de la población de rizobios, se observó la presencia de cada cepa inoculada en sus respectivas parcelas, las cuáles se encontraban aleatorizadas en tres bloques. De acuerdo a esto podemos inferir que estos microorganismos lograron establecerse en las raíces, formar los nódulos en plantas de soja y contribuir con la promoción de parámetros como el peso seco de la parte aérea, siendo este fundamental para aumento de los rendimientos en grano. Por otro lado, teniendo en cuenta que para este experimento se utilizó un campo sin antecedentes de haberse cultivado soja u otra leguminosa y que tal como se mencionó previamente el control sin inocular no presentó nodulación, se infiere que el establecimiento en los nódulos de cada cepa inoculada contribuye con los resultados obtenidos en la medición de los flujos de óxido nitroso en los estadios R7 y R8 (ver Figura 27). Mediante este chequeo molecular corroboramos la posible presencia de las cepas E109, SEMIA 5019, CPAC15, CPAC7 y SEMIA 587 en las raíces noduladas y por tanto, basados en los resultados encontrados en vida libre, en simbiosis con soja en condiciones de cámara de crecimiento y con este ensayo en parcelas experimentales a campo, se observa claramente que existe una alta emisión de las cepas y raíces noduladas inoculadas con *B. japonicum* E109 y una baja emisión por parte de *B. diazoefficiens* CPAC7.

Sobre los flujos de óxido nitroso en condiciones de parcelas experimentales a campo podríamos comenzar diciendo que la mejora agronómica del cultivo de soja se inicia con la mejora de la eficiencia simbiótica, que determinará un aumento en la ganancia en peso seco por parte de la planta, que a su vez, se verá reflejado en una mejor inversión de recursos nutricionales asignados a la floración y producción de granos y con ello reflejado en el

aumento de rendimiento del cultivo. Es por ello que cada parámetro puede convertirse un parámetro determinante a la hora de definir el rendimiento. En este caso particular, la selección del material biológico, además de establecer un comportamiento simbiótico específico y con ello modificar el rendimiento del cultivo, sería un indicador de la capacidad del sistema para impactar en el medio ambiente debido a la emisión de GEIs. Las condiciones particulares de nuestro ensayo, establecido en parcelas experimentales sin historia previa del cultivo de soja, o la no utilización de aditivos para el tratamiento de las semillas inoculadas, pudieron definir un comportamiento específico del ensayo, a nivel de la adaptación y supervivencia de los microorganismos utilizados sobre la semilla empleada y al ambiente rizosférico en el que fueron liberados. Tales condiciones pudieron jugar un papel fundamental en el establecimiento de la simbiosis y definir un efecto particular sobre el cultivo. Por otro lado, la existencia de una flora rizobiana previamente establecida en suelos sojeros, podría dar un nivel de complejidad al ensayo que limitaría los resultados obtenidos; sin embargo la ausencia de historia de cultivo de soja en tales parcelas, determinó un comportamiento puro y sin perturbaciones de la flora rizobiana establecida. En resumen, consideramos que las condiciones experimentales logradas en este ensayo fueron ampliamente favorables para comprender el fenómeno de la liberación de GEI por el cultivo de soja y su regulación por la inoculación con cepas desnitrificantes o no desnitrificantes de *Bradyrhizobium* sp. Quizás un aspecto para considerar el desarrollo de nuevos experimentos se relacione con el modelo productivo del cultivo y la evaluación del rendimiento comparativo con cada cepa, para el que podrían ser necesarios nuevos ensayos de características similares en diferentes condiciones experimentales. Teniendo en cuenta tales aclaraciones y a modo de resumen, podemos resumir el ensayo de acuerdo a los siguientes aspectos:

[1] A nivel del *establecimiento de la simbiosis y rendimiento del cultivo*: Todos los tratamientos inoculados con CPAC15 presentaron mayor número de nódulos y los tratamientos CPAC15P3 y CPAC15P7 presentaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al peso seco de nódulos y peso seco parte aérea, respectivamente. El análisis de correlación entre el peso seco de nódulos, número total de nódulos y peso seco de parte aérea (ver Tabla 13). En otros trabajos se han encontrado correlaciones

iguales y superiores entre éstas variables (Montero et al. 2001; Unkovichet al. 2008; Salvucci et al. 2012; Núñez, 2012) por lo cual el peso seco de nódulos (PSN) es incluido siempre en la evaluación de la eficiencia simbiótica de cepas de rizobios (Núñez, 2012). Por su parte la matriz de correlación positiva de Pearson evidenció una correlación directa y positiva ($0 < r < 1$) del 78% entre NNT y PSN como tendencia en todas las variables del experimento. Es decir cuando una de estas variables aumenta, la otra lo hace en proporción relativamente constante. Al respecto, Gwata et al. 2005 y Sinclair, 1991, han reportado coeficientes de correlación significativos entre el número y el peso seco de nódulos en soja. Aunque se presentaron variaciones en las respuesta a todos los tratamientos, se evidenció en los resultados de CPAC15 que sí existe una correlación entre el número, peso seco de nódulos y peso seco de la parte aérea de la planta. Aunque se esperaría que la cepa E109, regularmente utilizada en suelos Argentinos presentara las mejores respuestas en todos los parámetros, no fue el tratamiento con valores máximos. No obstante, debe tenerse en cuenta que en las parcelas no hay historial de inoculaciones rizobiales y no se encontraron rizobios alóctonos como se evidenció en el testigo sin inocular y por lo tanto todas las cepas podrían presentar, incluyendo la E109, una respuesta típica de rizobios en proceso de naturalización y adaptación al entorno que no correspondería a la respuesta en suelos previamente inoculados. Peticari (2005) reportó que en áreas con varias campañas del cultivo de soja y la inoculación anual sostenida a lo largo del tiempo y en diferentes campañas, ha permitido que los bradyrizobios inoculados, capaces de nodular soja, se hayan establecido y naturalizado de manera saprofítica, en la mayoría de los suelos sojeros.

Para el porcentaje de nódulos en raíz principal (NRP) y nódulos en raíces secundarias (NRS), se observó una tendencia de comportamiento en todos los tratamientos inoculados para el establecimiento entre un 40% y 60% de nódulos en la raíz principal (ver Figuras suplementarias 2,3 y 4). Cuando se observa el aporte de esta relación agrupando el total de tratamientos inoculados con una misma cepa, se encontró que en la mayoría de los tratamientos se presentó un mayor número de nódulos en la raíz principal, con respecto a la secundaria. Estos resultados son coincidentes con los encontrados por Ikeda e Ikeda, (2005), quienes encontraron una prevalencia del número de nódulos en la raíz principal, sobre la raíz secundaria en 14 cultivares de soja, proponiendo además la existencia de un factor primario de la planta que regularía la presencia de nódulos en raíces principales y

secundarias. La distribución numeral y espacial de los nódulos en las raíces afecta el crecimiento y la arquitectura de las raíces (Osmont et al. 2007). Así mismo, se ha evidenciado que el patrón de nodulación en leguminosas no se da de forma aleatoria (Remmler et al. 2013). Se han encontrado que existen zonas susceptibles a la formación de nódulos, como las zonas apicales de la raíz principal, las cuales presentan mayor plasticidad para permitir la penetración de los rizobios y la posterior formación de los nódulos (Bhuvanewari et al.1980). Ferguson et al. (2010) plantearon un modelo de auto-regulación de la nodulación, en el cuál los primeros nódulos envían una señal ascendente a la planta, la cual es decodificada por una quinasa rica en leucina que desencadenaría una señal inhibitoria que regularía la formación de nuevos nódulos en raíces juveniles en desarrollo en partes más profundas del sustrato o el suelo. Por otro lado, la presencia y distribución de nódulos fue significativa en la mayoría de los tratamientos con respecto al control sin inocular y las tres especies rizobiales utilizadas (*B. japonicum*, *B. diazoefficiens* y *B. elkanii*) pudieron realizar una simbiosis efectiva con las semillas de soja utilizadas. En este sentido, se ha descrito el papel que juega la variedad de soja empleada y su regulación predominante en el éxito de la simbiosis. Burias et al. (1990) reportaron que la soja presenta de manera genotípica un nivel de control que afectaría la distribución de nódulos. Es decir, diferentes cultivares presentarían diferentes perfiles de nodulación. La posición del nódulo en el sistema radicular parece ser afectada por las condiciones de crecimiento a las que están sujetas las plantas y sería regulada predominantemente por la interacción con el rizobio inoculado, el estado fisiológico de las bacterias luego de la inoculación (Penna et al. 2011) y su genotipo e interacción específica con la planta (Burias et al. 1990). De acuerdo a estos resultados, se puede inferir que el establecimiento de rizobios en un lugar sin historia de inoculación pudo favorecer la respuesta de las cepas menos competitivas en suelos con alta carga de rizobios naturalizados. Los rizobios utilizados en este estudio han sido previamente evaluados y seleccionados por ser los más eficientes y competitivos en el establecimiento de la simbiosis con soja en Brasil (Nishi y Hungría, 1996), Argentina (Peticari, 1998), Paraguay (Chen et al. 2000) y Uruguay (Labandera, 2003). Se ha reportado que la capacidad de infección de estas cepas es alta, dando como resultado un gran porcentaje de nódulos inducidos por ellas, condición favorecida por su adaptación ecológica al medio (Peticari et al. 1998). El tipo de suelo,

factores edáficos y ambientales pueden modificar la respuesta a la inoculación con determinado rizobio (Janice et al. 1990). Nishi y Hungría, (1996), reportaron que el mejor desempeño simbiótico ha sido obtenido por la cepa SEMIA 5019 en el sur de Brasil, teniendo resultados muy superiores a las cepas CPAC15 y CPAC7, las cuáles muestran resultados más eficientes cuando son cultivados en suelos de cerrado y aumentan significativamente la productividad en estas zonas. En Uruguay, los inoculantes para soja contienen principalmente dos cepas de *B. elkanii* identificadas como U-1301 (SEMIA 587) y U-1302 (SEMIA 5019), preseleccionadas por su óptimo establecimiento en suelos de esa región (Núñez, 2012).

[2] A nivel de la *emisión de GEIs*: Los tratamientos con mayor producción de óxido nitroso fueron aquellos inoculados con CPAC15 y E109, en los dos muestreos realizados (R7 y R8); mientras que los tratamientos con producción de N_2O más baja fueron los inoculados con CPAC7, USDA110 y el control son inocular. Como lo hemos mencionado anteriormente y en base a reportes publicados, la actividad desnitrificante incompleta de los rizobios podría contribuir directamente en la emisión de óxido nitroso a la atmósfera. Mientras que los tratamientos inoculados con E109 presentó flujos de 14,07 y 37,56 $\mu\text{g mol } N_2O \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ en R7 y R8 respectivamente; mientras que los tratamientos inoculados con USDA110 produjeron 9,40 y 5,311 $N_2O \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$. Previos reportes afirman que la óxido nitroso reductasa presente en algunas especies de *Bradyrhizobium* podría contribuir con la baja emisión de óxido nitroso a través de los nódulos (Sameshima-Sato, 2006). Así mismo, se ha reportado que las concentraciones de óxido nitroso proveniente del suelo pueden ser episódicos, debido a que dependen de múltiples factores como el contenido hídrico, temperatura, materia orgánica, fertilización nitrogenada, microbiota edáfica, entre otros (Li et al. 2002; Inaba et. al 2012). Además, se ha reportado que la presencia de la óxido nitroso reductasa (NOS) presenta alta afinidad por el óxido nitroso (Zumf, 1997), lo que permite inferir que la actividad desnitrificante del suelo podría favorecer la emisión de estos gases en presencia de microorganismos edáficos y en interacciones simbióticas que presenten la enzima NOS. Así mismo, se puede establecer de manera preliminar que tanto en nuestros resultados, como en otros reportes, el uso de rizobios con desnitrificación incompleta sería una pieza clave en la emisión de cultivos de varias leguminosas, como se ha reportado en

suelos cultivados con alfalfa (Duxbury et al. 1982), trébol blanco (Mori et al. 2005), soja (Yan y Cai, 2005; Sameshima-Saito, 2006; Inaba et al. 2012), entre otros. El incremento de las emisiones de nitroso durante la descomposición de restos de material vegetal, dentro de otros factores ha sido descrito en numerosos reportes (Uchida y Akiyama, 2013; Inaba et al. 2009; 2012). Yan y Cai, (2005), informaron que el aumento significativo de la emisión de N_2O en estadios avanzados en la soja podría atribuirse a la descomposición de raíces y residuos de soja en el suelo. También se ha encontrado una relación directamente proporcional entre los flujos de N_2O y la temperatura, y esta relación no sólo está asociada a los efectos sobre la actividad enzimática sino también al incremento en la respiración del suelo que reduce los niveles de oxígeno (O_2) (Butterbach-Bahl et al. 2016). Se ha reportado que las fluctuaciones en las emisiones ocurren después de un episodio lluvioso o de humedecer un suelo seco (Jorgensen et al. 1998), después de las aplicaciones de fertilizantes nitrogenados (Maggiotto et al. 2000) y durante el deshielo de suelos congelados (Wagner-Riddle et al. 1997; 2007). En nuestro caso, la medición de N_2O en el muestreo R7 se realizó posterior a un período de lluvias en el mes de mayo y R8 en época invernal, en el mes de julio. Por lo que se infiere que en R7 favoreció la producción el contenido hídrico en las parcelas y en R8 la producción del gas fue mayor conforme el avanzado estado del cultivo (etapa fisiológica de maduración completa). Diversos autores han demostrado que el factor directo en la emisión de N_2O es la actividad desnitrificante llevada a cabo por microorganismos del suelo que llevan a cabo este proceso hasta productos intermedios, como el óxido nítrico y óxido nitroso (Firestone et al. 1980; O'Hara y Daniel, 1985; Sanford et al. 2012; Itakura et al. 2013, entre otros). Kim et al. (2005) reportaron que las emisiones en plantas de soja noduladas fueron considerablemente más altas en comparación con las emisiones de plantas de soja mutantes incapaces de formar nódulos. Ésto, claramente evidencia que los nódulos son una fuente importante de emisión en aquellos ecosistemas en donde se encuentre esta leguminosa. Una posible explicación de este proceso de emisión de N_2O por estos sistemas simbióticos es que el nitrato absorbido a través de las raíces de las leguminosas y las superficies de los nódulos podrían ser transportado en nódulos (Lucinski, 2002), que emiten N_2O a partir de nitratos en bacteroides que carecen de genes *nos*. Otra explicación es que el N_2O es producido por organismos de rizosfera a partir de nódulos senescentes (Yang y Cai, 2005; Ciampitti et al.

2008), donde el nitrógeno se convertiría en una fuente de emisión de N_2O independientemente de la presencia de los genes *nos* en los bacteroides. En cualquiera de estos planteamientos la presencia de la óxido nitroso sintetasa debería disminuir los niveles de N_2O en la rizósfera y la emisión de N_2O de los suelos de campo. De acuerdo a los reportes previamente citados y a los resultados encontrados a lo largo de esta investigación, se evidencia que la inoculación tradicional con rizobios carentes del gen *nosZ*, es decir con desnitrificación incompleta (SEMIA 5019, CPAC15, SEMIA 587 y E109) representa una fuente evidente de emisión de óxido nitroso y una disminución en los flujos del gas cuando se utilizaron las cepas CPAC7 y USDA110 bajo todas las condiciones evaluadas y confirmadas en las condiciones de parcelas a campo.

Como posibles soluciones de mitigación de las emisiones de N_2O provenientes de la agricultura, se han planteado numerosas alternativas desde distintas disciplinas. A nivel agronómico, por ejemplo, se han planteado estrategias como el manejo de la labranza o el uso eficiente de los fertilizantes. Sullivan et al. (2013), han planteado que es posible re diseñar la composición de los fertilizantes para garantizar que los rendimientos de los cultivos permanezcan altos y al mismo tiempo se disminuyan los flujos de N_2O emitidos. Con relación a la alternativa de optimizar el manejo de la labranza, se ha propuesto, una adecuada densidad y espaciamiento entre hileras del cultivo que favorezcan la absorción de nitrógeno y agua y una estrategia de fertilización nitrogenada –en el caso de no leguminosas- que sincronice el momento de aplicación con la demanda de nitrógenos del cultivo para reducir las emisiones de N_2O (Sainz Rozas et al. 2004a; 2004b). Teniendo en cuenta que la desnitrificación en el suelo es controlada por el contenido de agua, que a su vez, controla la aireación del suelo, la disponibilidad de carbono (C) y nitrato, y la temperatura del suelo, esta alternativa para cultivos no leguminosas, representa una alternativa viable (Pietrobon, 2012; Barbieri et al. 2008). Por su parte, Gaimster et al. (2018) mencionan que es necesario analizar en experimentos reales a campo los microcosmos que coexisten en el suelo y cómo podría mitigarse la emisión partiendo desde la interacción de los microorganismos desnitrificadores presentes en el suelo. Respecto al microbioma edáfico. Ciampitti et al. (2008), determinaron los flujos de N_2O en un suelo cultivado con soja en Buenos Aires y encontraron que las emisiones de las parcelas de soja y las de los suelos no plantados fueron similares, lo cual podría implicar que los

microorganismos establecidos en el suelo fueron en gran parte responsables de la acumulación de N₂O, aún en suelos donde no fue cultivada la leguminosa. Osborne et al. (2010), reportaron que cambios en la riqueza y la diversidad microbiana de la rizósfera de leguminosas, han sido detectados con frecuencia y esto podría afectar o incrementar los flujos de N₂O vía desnitrificación. Como se mencionó anteriormente, varios autores han reportado que los rizobios con expresión y sobreexpresión de *nosZ* han resultado una alternativa efectiva para la mitigación de la producción de N₂O. Nuestro trabajo constituye un seguimiento de los inoculantes utilizados en nuestro continente tanto en vida libre como en simbiosis; en condiciones controladas, semi-controladas y a campo, en parcelas experimentales. La trazabilidad del proyecto definió una tendencia en la emisión de N₂O de rizobios con desnitrificación completa (USDA110 y CPAC7 de *B. diazoefficiens*) e incompleta (E109 y CPAC15 de *B. japonicum*; SEMIA 5019 y SEMIA 587 de *B. elkanii*) en todas las condiciones evaluadas. Si dentro de las estrategias de mitigación de GEI que se plantearon en la tercera comunicación nacional a la CMNUCC, 2015, se incluye el uso de fijadores biológicos de nitrógeno, es importante tener en cuenta que la utilización indiscriminada de tales microorganismos podrían estar aumentando los niveles de óxido nitroso en la atmósfera y por ende afectar los objetivos iniciales de mitigación, por lo que se recomienda la búsqueda y selección de rizobios con potencial verificable de desnitrificación como atenuadores de los flujos de emisión de óxido nitroso en condiciones agronómicas, es decir, con actividad desnitrificante completa. No obstante, aunque a lo largo de este proyecto se evidenció que los patrones de emisión están directamente relacionados con la actividad desnitrificante completa o incompleta de cada bradyrizobio, es necesario realizar futuros experimentos a campo. Nuestros resultados obtenidos en parcelas a campo corroboran la tendencia ya obtenida durante la investigación pero está condicionada por un posible único bradyrizobio presente en el suelo en proceso de naturalización y la respuesta en suelos con presencia de rizobios alóctonos puedan generar variantes en los flujos de emisión ya sea por competencia o por presencia de otros microorganismos desnitrificantes que aumenten la emisión o contribuyan con la mitigación de estos gases. No obstante, de acuerdo a todos los resultados obtenidos en el proyecto, se plantea como estrategia factible la inoculación de Bradyrizobios con desnitrificación

completa, ya sea como coinóculos con *B. japonicum* E109 u otras cepas tradicionalmente utilizadas, o como único rizobio inoculado en el cultivo de soja.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES GENERALES

Conclusiones

Capítulo I. ANÁLISIS DE LA RUTA DESNITRIFICANTE DE *Bradyrhizobium* sp. EN VIDA LIBRE

1. Se determinó la existencia de numerosas secuencias codificantes relacionadas con la desnitrificación tales como *napA*, *nirK*, *norC* y *nosZ* en el genoma de *B. japonicum* para E109 y CPAC15; de *B. diazoefficiens* para CPAC 7 y no se encontraron estas secuencias para *B. elkanii* SEMIA 5019, SEMIA 587.
2. Para el análisis *in silico*, se destacó la ausencia de la secuencia del gen *nosZ* en todas las cepas (excepto en CPAC 7, con todos los genes de la ruta) y esto fue confirmado *in vitro*, ya que no hubo amplificación de esta secuencia en contrapartida a lo que ocurrió en la cepa modelo (USDA110), quien evidentemente cuenta con todos los genes implicados en este proceso.
3. Se determinó la actividad enzimática NR y NiR; la producción de óxido nítrico y nitroso por todas las cepas, siendo la producción de N₂O emitida en valores mínimos por CPAC 7 y mayormente emitidos por las cepas con desnitrificación incompleta, particularmente E109 y CPAC15, infiriendo que estas cepas podrían ser potencialmente emisoras de gases tipo NO_x en condiciones de vida libre producto de su inoculación en los cultivos de soja de nuestro continente.

Capítulo II. ANÁLISIS DE LA RUTA DESNITRIFICANTE DE *Bradyrhizobium* sp. EN SIMBIOSIS CON SOJA

1. Se encontró que las raíces noduladas de soja inoculadas con las cepas SEMIA 5019, CPAC 15 y E109 presentaron la mayor producción de óxido nítrico (NO). La emisión de este gas, confirmó los resultados obtenido a nivel *in silico* (para CPAC 7, CPAC 15 y E109) e *in vitro* para todas las cepas en estudio.

2. Se determinó que las raíces noduladas y los nódulos de las plantas de soja inoculadas con la cepa E109 de *B. japonicum* son productoras de óxido nitroso. Las emisiones a partir de las raíces noduladas fueron superiores frente a la cepa USDA110 y a la cepa mutante *nosZ*. Estos resultados se observaron de igual forma en los nódulos separados, en donde nuevamente el tratamiento inoculado con la cepa E109 fue el que mayor valor de producción presentó, lo que permitió inferir que esta cepa emite de manera importante y en asociación con la planta de soja, gases contaminantes de tipo NOXs producto de su condición de desnitrificadora incompleta.
3. Se demostró que existe una marcada tendencia de producción de óxido nitroso de E109 frente a dos variedades de soja evaluadas. Si bien son valores variables esperados por determinar un compuesto en fase gaseosa, se encontró que existe una diferencia notable entre plantas inoculadas con rizobios con desnitrificación completa e incompleta, como se observó para E109 y USDA 110, respectivamente.
4. El monitoreo de la ruta desnitrificante en la interacción soja-*Bradyrhizobium* demostró que la ausencia del gen *nosZ* se refleja en acumulaciones importantes de N₂O a nivel de las raíces noduladas. En tal sentido, las cepas utilizadas frecuentemente como inoculantes comerciales E109, SEMIA 5019, CPAC15 y SEMIA 587 fueron más productoras de este gas que la cepa tipo USDA110 y la cepa comercial CPAC7, las que presentan el gen *nosZ*, superan significativamente las producciones de N₂O, tanto en vida libre como en simbiosis.
5. Los genes que codifican las actividades enzimáticas de la ruta desnitrificante para SEMIA 587 y SEMIA 5019 no pudieron ser identificados en nuestros experimentos. Sin embargo, es claro que estas cepas tienen la capacidad de producir óxido nitroso y por ello una posible ruta metabólica activa, especialmente los tratamientos inoculados con SEMIA 5019. Éste punto en particular representa una posible línea de continuidad de éste trabajo en el futuro.
- 6.

Capítulo III. ESTRATEGIAS DE MITIGACIÓN DE LA EMISIÓN DE GASES EFECTO INVERNADERO EN LA SIMBIOSIS SOJA-*Bradyrhizobium*

1. La inoculación de bacterias de *vida libre* (Az39 y ATCC17588) con desnitrificación completa no presentó capacidad de mitigación a nivel de la producción de óxido nitroso en las raíces noduladas de soja en condiciones de cámaras de crecimiento. De acuerdo a estos resultados y a los obtenidos previamente, se sugiere continuar con las evaluaciones a nivel de campo utilizando inoculaciones mixtas con cepas de *B. diazoefficiens*, para determinar tanto la capacidad mitigadora como la capacidad de promoción de crecimiento vegetal en condiciones normales del cultivo de soja.
2. Se determinó que la inoculación de CPAC7 de manera individual o combinada podría constituir una alternativa aplicable a nivel de campo como estrategia de mitigación de la emisión de N₂O. Sin embargo se requieren posteriores ensayos que confirmen la capacidad mitigadora y de promoción de crecimiento de la soja cuando se utilice como inoculante la cepa propuesta en esta investigación.

Capítulo IV EMISIÓN DE GEIs EN LA SIMBIOSIS SOJA-*Bradyrhizobium* EN CONDICIONES DE PARCELAS EXPERIMENTALES A CAMPO

1. Se encontraron 38 perfiles de rizobios aislados a partir de nódulos que amplificaron de forma similar con los perfiles de los controles positivos inoculados para cada tratamiento, determinando que la producción de óxido nitroso podría relacionarse estrechamente con la presencia de los rizobios identificados y que se mantuvo la misma tendencia de alta emisión por parte de los tratamientos inoculados con cepas con desnitrificación incompleta (especialmente E109) y baja emisión para tratamientos inoculados con cepas con desnitrificación completa, como se observó para las cepas USDA 110 y CPAC7.
2. De acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo a campo, se mantiene la tendencia observada a lo largo de toda la tesis doctoral y se sugiere continuar con

estudios en condiciones a campo que permitan monitorear los flujos de N_2O de tratamientos inoculados con los rizobios evaluados en este proyecto en suelos agrícolas con antecedentes históricos de siembra de soja e inoculados con rizobios y de esta forma determinar la incidencia e interacción con distintos factores bióticos y abióticos que puedan aumentar o disminuir la actividad mitigadora de cepas con desnitrificación completa, y a su vez, determinar si los inoculantes comerciales con desnitrificación incompleta mantienen los valores de emisión en condiciones habituales del cultivo de la soja.

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Alves, B.J.R. Urquiaga, S. Jantalia, C.P. Boddey, R.M.(2016). Influência de fungos e bactérias na eficiência da fertilização nitrogenada e na emissão de N₂O para a atmosfera. In: Fatima Maria de Souza Moreira; Maria Catarina Megumi Kasuya. (Org.). Fertilidade e biologia do solo: Integração e tecnologia para todos. 1ed.Viçosa: *Sociedade Brasileira de Ciência do Solo* 1, 197-226. ISBN: 978-85-86504-17-4
2. Akiyama, H., Hoshino, Y. T., Itakura, M., Shimomura, Y., Wang, Y., Yamamoto, A., Hayatsu, M. (2016). Mitigation of soil N₂O emission by inoculation with a mixed culture of indigenous *Bradyrhizobium diazoefficiens*. *Scientific Reports*. doi:10.1038/srep32869.
3. Anzuay, M.S., Ciancio, M.G.R., Ludueña, L.M., Angelini, J.G., Barros, G., Pastor, N., and Taurian, T. (2017). Growth promotion of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and maize (*Zea mays* L.) plants by single and mixed cultures of efficient phosphate solubilizing bacteria that are tolerant to abiotic stress and pesticides. *Microbiol. Res.* 199:98-109. doi: [https:// doi.org/10.1016/j.micres.2017.03.006](https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.03.006).
4. Anzuay M.S., Frola O., Angelini J.G., Luduena L.M., Fabra A., Taurian T. (2013). Genetic diversity of phosphate-solubilizing peanut (*Arachis hypogaea* L.) associated bacteria and mechanisms involved in this ability. *Symbiosis*, 60, 143–154.
5. Anzuay MS, Luduena LM, Angelini JG, Fabra A and Taurian T,(2015). Beneficial effects of native phosphate solubilizing bacteria on peanut (*Arachis hypogaea* L) growth and phosphorus acquisition. *Symbiosis*, 66, 89–97.
6. Badagliacca, G., Benítez, E., Amato, G., Badalucco, L., Giambalvo, D., Laudicina, V.A., Ruisi, P. (2018). Long-term no-tillage application increases soil organic carbon, nitrous oxide emissions and faba bean (*Vicia faba* L.) yields under rain-fed Mediterranean conditions. *Sci Total Environ.* 15; 639:350-359. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.05.157.

7. Barbieri, P.A.; Echeverría, H.E.; Sainz Rozas, H.R.; Andrade, F.H. (2008). Nitrogen use efficiency in maize as affected by nitrogen availability and row spacing. *Agron. J.* 100(4):1094-1100.
8. Barnett M J, Hung D Y, Reisenauer A, Shapiro L, Long S.(2001) *J Bacteriol* 183:3204–3210,pmid:11325950.
9. Bartnikas, T.B., Tosques, I.E., Laratta, W.P., Shi, J., and Shapleigh, J.P. (1997) Characterization of the nitric oxide reductase-encoding region in *Rhodobacter sphaeroides* *J Bacteriol* 179 3534–3540.
10. Barton, L., Wolf, B., Rowlings, D., Scheer, C., Kiese, R., Grace, R., StefanovaK., Butterbach-Bahl, K. (2015). Sampling frequency affects estimates of annual nitrous oxide fluxes. *Scientific Reports* 5,15912.
11. Baudouin, E. Pieuchot, L. Engler, G. Pauly, N.Puppo A. (2006). Nitric oxide is formed in *Medicago truncatula*–*Sinorhizobium meliloti* functional nodules. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 19, 970–975. doi: 10.1094/MPMI-19-0970.
12. Bedzyk L, Wang T, Ye RW. (1999). The periplasmic nitrate reductase in *Pseudomonas* sp. strain G-179 catalyzes the first step of denitrification. *J. Bacteriol.* 181:2802-2806.
13. Bedmar EJ, Robles EF, Delgado MJ.(2005). The complete denitrification pathway of the symbiotic nitrogen-fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochem Soc Trans* 33, 141-144.
14. Bertani, G. (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*, 62, 293-300.
15. Bell, L. C., Page, M. D., Berks, B. C., Richardson, D. J. Ferguson, S. J. (1993). Insertion of transposon Tn5 into a structural gene of the membrane-bound nitrate reductase of *Thiosphaera pantotropha* results in anaerobic overexpression of periplasmic nitrate reductase activity. *J Gen Microbiol* 139, 3205–3214.
16. Berks, B.C. Baratta, D. Richardson, D.J. Ferguson, S.J. (1993) Purification and characterization of a nitrous oxide reductase from *Thiosphaera pantotropha*. Implications for the mechanism of aerobic nitrous oxide reduction. *Eur J Biochem* 212: 467–476.

17. Besson-Bard, A., Pugin, A., and Wendehenne, D. (2008). New Insights into Nitric Oxide Signaling in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 21-39.
18. Boiero L1, Perrig D, Masciarelli O, Penna C, Cassán F, Luna V.(2007). Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 74(4):874-80.
19. de Boer, A. P., van der Oost, J., Reijnders, W. N. H., Westerhoff, V., Stouthamer, A. H. van Spanning, R. J. M. (1996). Mutational analysis of the nor gene cluster which encodes nitric-oxide reductase from *Paracoccus denitrificans*. *Eur J Biochem* 242, 592–600.
20. Bhuvaneshwari T.V., Turgeon, B.G., Bauer, W.D. (1980). Early stages in the infection of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) by *Rhizobium japonicum* Localization of infectible root cells. *Plant Physiol.*, 66 (1980), pp. 1027-1031
21. Bueno E. Mesa S, Bedmar EJ, Richardson DJ, Delgado MJ. (2012). Bacterial adaptation of respiration from oxic to microoxic and anoxic conditions: Redox control. *Antioxidant and Redox Signaling (ARS)* 16: 819-852.
22. Bueno E., Bedmar E. J., Richardson D. J. and Delgado M. J. (2008). The role of *Bradyrhizobium japonicum* cytochrome c550 in nitrite and nitrate respiration. *FEMS Microbiol. Lett.* 279: 188-194.
23. Braun, C. Zumft, W. G. (1991) Marker exchange of the structural genes for nitric oxide reductase blocks the denitrification pathway of *Pseudomonas stutzeri* at nitric oxide, *J. Biol. Chem.* 266,
24. Brozyna M., Petersen, S.O., Chirinda,N., Olesen, JE.(2013). Effects of grass–clover management and cover crops on nitrogen cycling and nitrous oxide emissions in a stockless organic crop rotation *Agric. Ecosyst. Environ.*, 188, pp. 115-126
25. Burias,N., Planchon,P. Paul, M.H. (1990).Phenotypic and genotypic distribution of nodules on soybean root system inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* strain G49. *Agronomie*, 10 (1990), pp. 57-62

26. Campos, B. C.; Hungria, M.; Tedesco, V. (2001): Eficiência da fixação biológica de N₂ por estirpes de *Bradyrhizobium* na soja em plantio direto. En: *Rev. Bras. Ciênc. Solo* 25 (3), pág. 583–592. DOI: 10.1590/S0100-06832001000300007.
27. Carter, J. P., Hsaio, Y. H., Spiro, S. Richardson, D. J. (1995). Soil and sediment bacteria capable of aerobic nitrate respiration. *Appl Environ Microbiol* 61, 2852–2858.
28. Cartron, M. L., Roldán, M. D., Ferguson, S. J., Berks, B. C. & Richardson, D. J. (2002). Identification of two domains and distal histidine ligands to the four haems in the bacterial c-type cytochrome NapC; the prototype connector between quinol/quinone and periplasmic oxido-reductases. *Biochem J* 368, 425–432.
29. Cassán, F., D. Perrig, V. Sgroy, O. Masciarelli, C. Penna and V. Luna. (2009). *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *European Journal of Soil Biology* 45: 28-35.
30. Chahboune R, Carro L, Peix A, Barrijal S, Velázquez E, and Bedmar EJ. (2011). *Bradyrhizobium cytisi* sp. nov. isolated from effective nodules of *Cytisus villosus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:2922-2927.
31. Cébron, A. Garnier, J. (2005) *Nitrobacter* and *Nitrospira* genera as representatives of nitrite-oxidizing bacteria: Detection, quantification and growth along the lower Seine River (France). *Water Research*. 39 4979–4992.
32. Chan, Y.K . McCormick, W.A. Watson R.J.(1997). A new *nos* gene downstream from *nosDFY* is essential for dissimilatory reduction of nitrous oxide by *Rhizobium* (*Sinorhizobium*) *meliloti* *Microbiology*, 143, pp. 2817-2824
33. Chen, L. S., Figueredo, A., Pedrosa, F. O., & Hungria, M. (2000). Genetic Characterization of Soybean Rhizobia in Paraguay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(11), 5099–5103.

34. Chèneby, D.; Hartmann, A.; Hénault, C.; Topp, E.; Germon, J. C. (1998). Diversity of denitrifying microflora and ability to reduce N₂O in two soils. *Biology and Fertility of Soils* 28 (1), 19–26. doi: 10.1007/s003740050458.
35. Conrad R. (1996). Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H₂, CO, CH₄, OCS, N₂O, and NO). *Microbiol. Rev.*, 60, 609-640.
36. Coyle CL Zumft WG Kroneck PMH Korner H Jakob W (1985) Nitrous oxide reductase from denitrifying *Pseudomonas perfectomarina*. Purification and properties of a novel multicopper enzyme. *Eur J Biochem* 153: 459–467.
37. Cueto, M. Hernández-Perera, O. Martín, R. Bentura, M.L. Rodigo, J. Lamas, S. Golvano, M.P.(1996) Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. *FEBS Lett* 398, 159–164. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(96\)01232-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(96)01232-X).
38. Ikeda , D., Ikeda, M .(2005) Distribution of K, Na and Cl in Root and Leaf Cells of Soybean and Cucumber Plants Grown under Salinity Conditions, *Soil Science and Plant Nutrition*, 51:7, 1053-1057,DOI: 10.1111/j.1747-0765.2005.tb00144.x
39. Darwin, A. J., Ziegelhoffer, E. C., Kiley, P. J. Stewart, V. (1998). Fnr, NarP and NarL regulation of *Escherichia coli* K-12 napF (periplasmic nitrate reductase) operon transcription in vitro. *J Bacteriol* 180, 4192–4198.
40. Delgado MJ, Bonnard N, Tresierra-Ayala A, Bedmar EJ, and Müller, P. (2003). The *Bradyrhizobium japonicum* napEDABC genes encoding the periplasmic nitrate reductase are essential for nitrate respiration. *Microbiology* 149, 3395-3403.
41. Delgado M. J., Ligeró F., Lluch C. (1994) Effects of salt stress on growth and nitrogen fixation by pea, faba-bean, common bean and soybean plants. *Soil. Biol. Biochem.* 26:371–376.
42. Denman K.L., Brasseur G., Chidthaisong A., Ciais P., Cox P.M., Dickinson R.E., Hauglustaine D., Heinze C., Holland E., Jacob D., Lohmann U., Ramachandran S., da Silva Dias P.L., Wofsy S.C. & Zhang X. (2007) Couplings between changes in the climate system and biogeochemistry. In: Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt KB, Tignor M, Miller HL (eds) *Climate change (2007) the physical science basis. Contribution of working group I to the fourth assessment*

- report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge University Press, Cambridge.
43. Díaz Zorita, M.(2004) Requerimientos nutricionales del cultivo de soja. En: Díaz Zorita, M. y Duarte, G. A. (eds.), Manual práctico para la producción de soja. Buenos Aires, Hemisferio Sur S.A. 79-89 págs.
 44. Di Giovanni, G., Watrud, L.S., Seidler, R.J. , Widmer, F. (1999). Comparison of Parental and Transgenic Alfalfa Rhizosphere Bacterial Communities Using Biolog GN Metabolic Fingerprinting and Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence-PCR (ERIC-PCR). *Microbial Ecology* 37(2), pp 129–139.
 45. Di Spirito, A.L.R. Taafee, J.D. Lipscomb,A. HOOPER, G. (1985). A ‘blue’ copper oxidase from *Nitrosomonas eur-paea*. *Biochim. Biophys. Acta* 827: 320–326.
 46. Duxbury, J.M. Bouldin, D.R. Terry, R.E. Tate R.L. (1982) Emissions of nitrous oxide from soils. *Nature* 298,462–464. DOI:10.1038/298462a0
 47. Felsenstein J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17, 368.376.
 48. Ferguson, B. J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M.-H., Lin, Y.-H., Reid, D. E., and Gresshoff, P. M. (2010). Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *J. Integr. Plant Biol.* 52:61-76.
 49. Fernández, Leticia Andrea; Perotti, Elda Beatriz; Sagardoy, Marcelo Antonio; Gómez, Marisa Anahí (2008). Denitrification activity of Bradyrhizobium sp. isolated from Argentine soybean cultivated soils. En: *World J Microbiol Biotechnol* 24 (11), pág. 2577–2585. DOI: 10.1007/s11274-008-9828-x.
 50. Firestone MK, Firestone RB, Tiedje JM. (1980). Nitrous Oxide from Soil Denitrification: Factors Controlling Its Biological Production Science. 749-751.
 51. Fukudome, M., Calvo-Begueria, L. , Osuki, K. Rubio, M.C. Murakami, E.(2016) Hemoglobin LjGlb1-1 is involved in nodulation and regulates the level of nitric oxide in the *Lotus japonicus*–*Mesorhizobium loti* symbiosis. *Journal of Experimental Botany* 67, 5275–5283. doi: 10.1093/jxb/erw290

52. Gao, N., Shen, W., Camargo C., Shiratori, Y., Nishizawa, T., Isobe, K., He, X., Senoo, K. (2017). Nitrous oxide (N₂O)-reducing denitrifier-inoculated organicfertilizer mitigates N₂O emissions from agricultural soils. *Biol Fertil Soils*. 53(8), pp 885–898. DOI 10.1007/s00374-017-1231-z
53. Gaimster, H.,Alston, M., Richardson, D.J, Gates, A.J. Rowley, G. (2018). Transcriptional and environmental control of bacterial denitrification and N₂O emissions.*FEMS Micrbiol let* 365.
54. Gardner, A.M. and Gardner, P.R. 2002.Flavo-hemoglobin detoxifies nitric oxide in aerobic, but not anaerobic, *Escherichia coli*: evidence for a novel inducible anaerobic nitric oxide-scavenging activity. *J. Biol. Chem.* 277, 8166–8171.
55. Granli T., Bockman O. C. (1994). Nitrogen oxide from agriculture. Norwegian. *Journal of Agricultural Sciences*, 12, 7-127.
56. Grove, J., Tanapongpipat, S., Thomas, G., Griffiths, L., Crooke, H. Cole, J. (1996). *Escherichia coli* K-12 genes essential for the synthesis of c-type cytochromes and a third nitrate reductase located in the periplasm. *Mol Microbiol* 19, 476–481.
57. Gupta, K.J. Fernie, A.R. Kaiser. W.M. van Dongen, J.T. (2011) On the origins of nitric oxide. *Trends in Plant Science* 16, 160–168. doi: 10.1016/j.tplants.2010
58. Gwata, E. T., D. S. Wofford, K. J. Boote, A. R. Blount, and P. L. Pfahler. (2005). Inheritance of Promiscuous Nodulation in Soybean Journal Series Paper No. R-09853, Florida Agricultural Experiment Stations.. *Crop Sci.* 45:635-638. doi:10.2135/cropsci2005.0635
59. Hauggaard-Nielsen H, Gooding M, Ambus P, Corre-Hellou G, Crozat Y, Dahlmann C, Dibet A, von Fragstein P, Pristeri A, Monti M, Jensen ES (2009) Pea–barley intercropping for efficient symbiotic N₂-fixation, soil N acquisition and use of other nutrients in European organic cropping systems. *Field Crop Res* 113:64–71
60. Hendriks, J., Oubrie, A., Castresana, J., Urbani, A., Gemeinhardt, S. Saraste, M. (2000). Nitric oxide reductase in bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1459, 266–273.

61. Hichri, Imène; Boscari, Alexandre; Castella, Claude; Rovere, Martina; Puppo, Alain; Brouquisse, Renaud (2015): Nitric oxide: a multifaceted regulator of the nitrogen-fixing symbiosis. En: *Journal of experimental botany* 66 (10), pág. 2877–2887. DOI: 10.1093/jxb/erv051.
62. Hirayama, Junta; Eda, Shima; Mitsui, Hisayuki; Minamisawa, Kiwamu (2011): Nitrate-dependent N₂O emission from intact soybean nodules via denitrification by *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids. En: *Applied and environmental microbiology* 77 (24), pág. 8787–8790. DOI: 10.1128/AEM.06262-11.
63. Holloway P, McCormick W, Watson RJ, Chan YK.(1996) Identification and analysis of the dissimilatory nitrous oxide reduction genes, *nosRZDFY*, of *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol. Mar;178(6):1505-14*.
64. Honisch, U., W. G. Zumft. (2003). Operon structure and regulation of the *nos* gene region of *Pseudomonas stutzeri*, encoding an ABC-type ATPase for maturation of nitrous oxide reductase. *J. Bacteriol. 185:1895–1902*
65. Hungria M, Mendes I.C, de Bruijn F.(2015). Nitrogen fixation with soybean: the perfect symbiosis? *Biological Nitrogen Fixation* . Volume 2, chapter 99. p.1005-1019. Doi: 10.1002/9781119053095.ch99
66. Hungria MA, Boddey LH, Santos MA, Vargas MAT. (1998). Nitrogen fixation capacity and nodule occupancy by *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* strains *Biol Fertil Soils* 27, 393-399.
67. Hutchinson G.L. Mosier A.R. (1981). Improved soil cover method for field measurement of nitrous oxide fluxes. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 45, 311-316.
68. Inaba S, Ikenishi F, Itakura M, Kikuchi M, Eda S, Chiba N, Katsuyama C, Suwa Y, Mitsui H, Minamisawa K. (2012). N₂O emission from degraded soybean nodules depends on denitrification by *Bradyrhizobium japonicum* and other microbes in the rhizosphere. *Microbes Environ.*27(4):470-6.
69. Itakura M, Y; Uchida Y, Akiyama H, Yuko T, Shimomura Y. (2013). Mitigation of nitrous oxide emissions from soils by *Bradyrhizobium japonicum* inoculation. *Nature Climate Change*: 208-212.

70. Itakura, M., Tabata, K., Eda, S., Mitsui, H., Murakami, K., Yasuda, J. Minamisawa, K.(2008). Generation of *Bradyrhizobium japonicum* mutants with increased N₂O reductase activity by selection after introduction of a mutated *dnaQ* gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 7258-7264.
71. INTA. 2016. Informe estadístico mercado de la soja. <http://inta.gov.ar/documentos/soja-actualizacion-2016>
72. IPCC (2013). Climate Change 2013: The Physical Science Basis. In: Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (Eds T. F. Stocker, D. Qin, G. K. Plattner, M. Tignor, S. K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex, P. M. Midgley). UK: Cambridge University Press.
73. IPCC (2007). Summary for policymakers. Climate change 2007: the physical science basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. In: Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K.B., Tignor, M., Miller, H.L. (Eds.). Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
74. IPCC, (2006). IPCC guidelines for national greenhouse gas inventories. In: Eggleston, H.S., Buendia, L., Miwa, K., Ngara, T., Tanabe, K. (Eds.), Agriculture, Forestry and Other Land Use. Prepared by the National Greenhouse Gas Inventories Programme, vol. 4. IGES, Japan.
75. IPCC, (2001). Climate change 2001: the scientific basis. Contribution of working group I to the third assessment report of the intergovernmental panel on climate change. In: Houghton, J.T., Ding, Y., Griggs, D.J., Noguer, M., van der Linden, P.J., Dai, X., Maskell, K., Johnson, C.A. (Eds.). Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, p. 881.
76. Janice E. Thies, Paul W. Singleton, and B. Ben Bohlool. (1991). Microorganism-Plant Interactions: Influence of the Size of Indigenous Rhizobial Populations on Establishment and Symbiotic Performance of Introduced Rhizobia on Field-Grown Legumes *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1 19-28.

77. Johnson, J.M.F., Franzluebbers, A.J.; Lachnicht Weyers S.; Reicosky, D.C. (2007). Agricultural opportunities to mitigate greenhouse gas emissions. *Environ. Pollut.* 150(1):107-124.
78. Jorgensen RN, Jorgensen BJ, Nielsen NE (1998) N₂O emission immediately after rainfall in a dry stubble field. *Soil Biology and Biochemistry*, 30, 545–546.
79. Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Minamisawa K, Uchiumi T, Sasamoto S, Watanabe A, Idesawa K, Iriguchi M, Kawashima K, Kohara M, Matsumoto M, Shimpo S, Tsuruoka H, Wada T, Yamada M, Tabata S. (2002). Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res.* 9,189-197.
80. Kim OS, Cho YJ, Lee K, Yoon SH, Kim M, Na H, Park SC, Jeon YS, Lee JH, Yi H, Won S, Chun J. (2012). Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 716-721.
81. Kim Y., Nakayama, N. Nakamura, T. Takahashi, M.(2005). NO and N₂O emissions from fields in the different nodulated genotypes of soybean. *Jpn. J. Crop Sci.* 74:427–430
82. Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 6, 111–120.
83. Kobayashi M., Matsuo Y., Takimoto A., Suzuki S., Maruo F., Shoun H. (1996). Denitrification, a novel type of respiratory metabolism in fungal mitochondrion. *J. Biol. Chem.* 271, 16 263–16 26710.1074/jbc.271.27.16263 (doi:10.1074/jbc.271.27.16263)
84. Krauss, M., Ruser, R., Müller, T., Hansen, S., Mäder, P., & Gattinger, A. (2017). Impact of reduced tillage on greenhouse gas emissions and soil carbon stocks in an organic grass-clover ley - winter wheat cropping sequence. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 239, 324–333. <http://doi.org/10.1016/j.agee.2017.01.029>
85. Labandera C. (2003). Soja: Inoculantes e inoculación. *Revista del Pan agropecuario* 107. 53-54.

86. Lewis, G. Schrire, B. Mackinder, B. Lock, M. (2005). Legumes of the World. *Royal Botanic Gardens Kew*. 577.
87. Li, X., K. Inubushi, and K. Sakamoto. (2002). Nitrous oxide concentration in an Andisol profile and emissions to the atmosphere as influenced by the application of nitrogen fertilizers and manure. *Biol. Fertil. Soils* 35:108-113.
88. Liebig M.A., A.J. Franzluebbbers, C. Alvarez, T. Della Chiesa, N. Lewczuk, G. Piñeiro, G. Posse, L. Yahdjian, et al., (2016). MAGGnet: An International Network to Foster Mitigation of Agricultural Greenhouse Gases. Carbon Management, DOI: 10.1080/17583004.2016.1180586
89. Lodeiro, Aníbal R. (2015): Interrogantes en la tecnología de la inoculación de semillas de soja con *Bradyrhizobium* spp. En: *Revista Argentina de microbiología* 47 (3), pág. 261–273. DOI: 10.1016/j.ram.2015.06.006.
90. López-García SL, Peticari A, Piccinetti C, Ventimiglia L, Arias N, De Battista JJ, Althabegoiti J, Mongiardini EJ, Pérez-Giménez J, Quelas JI, Lodeiro AR. (2009). In-furrow inoculation and selection for higher motility enhances the efficacy of *Bradyrhizobium japonicum* nodulation. *Agron J* 101, 357-363.2009
91. López, S, Balatti, P. (2011). Closely related strains of *Bradyrhizobium* contained in commercial inoculates of soybean are identified by a set of PCR reactions. *Genetic Engineering and Biotechnology Journal*, 34.
92. Lucinski, R., W. Polcyn, and L. Ratajczak. (2002). Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association Rhizobium-legumes. *Acta Biochim. Pol.* 49:537-546.
93. Luo J, de Klein CAM, Ledgard SF, Saggar S (2010) Management options to reduce nitrous oxide emissions from intensively grazed pastures: a review. *Agric Ecosyst Environ* 136:282–291.
94. Maggiotto SR, Webb J, Wagner-Riddle C, Thurtell GW. (2000). Nitrous and nitrogen oxide emissions from turfgrass receiving different forms of nitrogen fertilizer. *Journal of Environmental Quality*, 29, 621–630.
95. Meakin, G. E.; Jepson, B. J. N.; Richardson, D. J.; Bedmar, E. J.; Delgado, M. J. (2006). The role of *Bradyrhizobium japonicum* nitric oxide reductase in nitric

- oxide detoxification in soybean root nodules. En: *Biochemical Society transactions* 34 (Pt 1), pág. 195–196. DOI: 10.1042/BST0340195.
96. Meilhoc, E. Boscari, A. Bruand, C. Puppo, A. Brouquisse, R. (2011) Nitric oxide in legume–*rhizobium* symbiosis. *Plant Science*. 181 (5), 573–581. doi: 10.1016/j.plantsci.2011.04.007.
 97. Mesa S, Velasco L, Manzanera ME, Delgado MJ, Bedmar EJ., (2002). Characterization of the norBCQD genes, encoding nitric oxide reductase, in the nitrogen fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Microbiology* 148, 3553e3560.
 98. 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: 479-84.
 99. Montero, FA; KM Filippi, M.A., Sagardoy. (2001). Nodulación y nutrición nitrogenada en sojas convencionales y resistentes a glifosato inoculadas con *Bradyrhizobium japonicum*. *Ciencia del Suelo*. 19: 159-162.
 100. Moreno-Vivián C, Cabello P, Martínez-Luque M, Blasco R, Castillo F. (1999). Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. *J Bacteriol*. 1999, 181: 6573-6584.
 101. Mori, A., M. Honjito, H. Kondo, H. Matsunami, and D. Scholefield. (2005). Effects of plant species on CH₄ and N₂O fluxes from a volcanic grassland soil in Nasu, Japan. *Soil Sci. Plant Nutr*. 51:19-27.
 102. Mosier A.R., Kroeze C., Nevison C., Oenema O., Seitzinger S., vanCleemput O. (1998). Closing the global N₂O budget: nitrous oxide emissions through the agricultural nitrogen cycle—OECD/IPCC/IEA phase II development of IPCC guidelines for national greenhouse gas inventory methodology. *Nutr Cycl Agroecosyst*, 52, 225-248
 103. Mosier A., C. Kroeze. (2000). Potential impact on the global atmospheric N₂O budget of the increased nitrogen input required to meet future global food demands. *Chemosphere-Global. Change Science*, 2, 465-473.
 104. Mur, L.A. Mandon, J. Persijn, S. Cristescu, S.M. Moshkov, I.E. Novikova, G.V. Hall, M.A. Harren, F.J. Hebelstrup, K.H. Gupta, K.J. (2013) Nitric oxide in plants:

- an assessment of the current state of knowledge. *AoB Plants* 5, 052. doi: 10.1093/aobpla/pls052.
105. Nascimento, E.C. (2011) Potencial desnitrificador de estirpes de *Bradyrhizobium* recomendadas para a cultura da soja. Seropédica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.77. (Dissertação de Mestrado).
 106. Nellen-Anthamatten, D., Rossi, P., Preisig, O., Kullik, I., Babst, M., Fischer, H.M. and Hennecke, H. (1998) *Bradyrhizobium japonicum* FixK2, a crucial distributor in the FixLJ-dependent regulatory cascade for control of genes inducible by low oxygen levels. *J. Bacteriol.*180, 5251–5255
 107. Nicholas DJD, Nason A. (1957). Determination of nitrate and nitrite. Pages 981-984 in *Methods in Enzymology*. S.P. Colowick and N. O. Kaplan, eds. Academic Press, New York.
 108. Nishi, C.Y.M. y Hungria, M.(1996). Efeito da reinoculação na soja [*Glycine max* (L.) Merril] em um solo com população estabelecida de *Bradyrhizobium* com as estirpes SEMIA 566, 586, 587, 5019, 5079 e 5080. *Pesq. Agropec. Bras.*,31:359-368
 109. Nishizawa T, Quan AH, Kai A, Tago K, Ishii S, Shen WS, Isobe K, Otsuka S, Senoo K (2014) Inoculation with N₂-generating denitrifier strains mitigates N₂O emission from agricultural soil fertilized with poultry manure. *Biol Fertil Soils* 50:1001–1007
 110. Núñez, L. (2012). Fijación de nitrógeno en soja [*Glycine max* (L.) Merr] inoculada con cepas comerciales de *Bradyrhizobium japonicum* y *Bradyrhizobium elkanii*. Tesis de grado. Universidad de la República. Uruguay. 73pp.
 111. Obando Castellanos, M.; Donadio, F.; Bedmar, E. Cassán, F. (2016) Emisión de gases invernadero en la simbiosis *Bradyrhizobium*-soja. XXVII Reunión latinoamericana de Rizobiología (RELAR). Libro de Resúmenes pp 195. ISBN 978-85-69146-02-5.
 112. O'Hara G. W. Daniel R. M. (1985) Rhizobial denitrification: A review. *Soil Biol. Biochem.* 17, 1–9.

113. Okada, N. Nomura, N. Nakajima-Kambe, T. Uchiyama, H. (2005) Characterization of the aerobic denitrification in *Mesorhizobium* sp. strain NH-14 in comparison with that in related rhizobia. *Microbes and Environments* 20, 208-215. <https://doi.org/10.1264/jsme2.20.208>
114. Osborne CS, Peoples MB, Janssen PH (2010) Exposure of soil to a low concentration of hydrogen elicits a reproducible, single member shift in the bacterial community. *Appl Environ Microbiol* 76:1471–1479
115. Osmont KS, Sibout R, Hardtke CS.(2007). Hidden branches: developments in root system architecture. *Annual Review of Plant Biology*. 58:93-113
116. Parkin T. B. & Kaspar T. C. (2006). Nitrous oxide emissions from corn soybean systems in the midwest. *J. Environ. Qual.*, 35, 1496-1506.
117. Parkin, T., and Venterea, R. (2010). Chapter 3. Chamber-based trace gas flux measurements, in: *Sam-pling Protocols*, edited by: Follet, R., 1–39, online available at: www.ars.usda.gov/research/GRACEnet
118. Pauly, N. (2006) Reactive oxygen and nitrogen species and glutathione: key players in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Journal of experimental botany* 57 (8), 1769–1776. doi: 10.1093/jxb/erj184.
119. Penna C, Massa R, Olivieri F, Gutkind G, Cassán F (2011) A simple method to evaluate the number of bradyrhizobia on soybean seeds and its implication on inoculant quality control. *AMB Express* 1:1–10
120. Peix, A. Ramírez-Bahena, M.H. Flores-Félix, J.D. La Alonso de Vega, P. Rivas, R. Mateos, P.F. (2015) Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium lupini* and reclassification as *Bradyrhizobium lupini* comb. nov. *International Journal of systematic and evolutionary microbiology* 65 (Pt 4), 1213–1219. doi: 10.1099/ijs.0.000082.
121. Peticari, A. (1998). ¿vale la pena inocular la soja?. Situación actual en Argentina. *Actas III Reunion Anual de Oleaginosas*. Universidad Nacional del Sur. Bahia Blanca. p 183 – 184.
122. Peticari, A. (2005). IMYZA INTA Castelar. Presentado en el Congreso Mundo Soja 2005. Inoculación de calidad para un máximo aprovechamiento de la FBN.

Disponible en: <http://www.e-campo.com/sections/news/display.php/uuid.01CF4233-041A-470C->.

123. Pietrobon, M. (2012). Densidad de plantas en el cultivo de maíz (*Zea Mays* L.) y su efecto sobre la eficiencia de uso de nitrógeno. Tesis de *Magister Scientiae*. Área de Post-grado en Producción Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata. Balcarce, Buenos Aires, Argentina. 89 p
124. Pooler, M.R., D.F. Ritchie, and J.S. Hartung. (1996). Genetic relationships among strains of *Xanthomonas fragariae* based on random amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR, and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR data and generation of multiplexed PCR primers useful for the identification of this pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3121–3127.
125. Ramos M.L, Magalhães N.F.M, Boddey R.M.(1987)Native and inoculated rhizobia isolated from field grown *Phaseolus vulgaris*: Effects of liming an acid soil on antibiotic resistance. *Soil Biology and Biochemistry*, 19 (2), 179–185. DOI: 10.1016/0038-0717(87)90079-4.
126. Regensburger, B.; Hennecke, H. (1983): RNA polymerase from *Rhizobium japonicum*. En: *Archives of microbiology* 135 (2), pág. 103–109.
127. Remmler,L. Clairmont,L Rolland-Lagan, AG.. Guinel, FC.(2014). *Standardized mapping of nodulation patterns in legume roots*. *New Phytol.* , 202(3), 1083.
128. Rigaud J, Puppo A. (1975). Indole-3 acetic catabolism by soybean bacteroids. *J Gen Bacteriol* 88, 223-228
129. Rivas R, Martens M, de Lajudie P, Willems A. (2009). Multilocus sequence analysis of the genus *Bradyrhizobium*. *Syst App Microbiol* 32:101-110.
130. Robles, E. F.; Sánchez, C.; Bonnard, N.; Delgado, M. J.; Bedmar, E. J. (2006): The *Bradyrhizobium japonicum* napEDABC genes are controlled by the FixLJ-FixK(2)-NnrR regulatory cascade. En: *Biochemical Society transactions* 34 (Pt 1), pág. 108–110. DOI: 10.1042/BST0340108.
131. Sainz Rozas, H.R.; Echeverría, H.E.; Barbieri, P.A. (2004a). Nitrogen balance as affected by application time and nitrogen fertilizer rate in irrigated no-tillage maize. *Agron. J.* 96(2):1622-1631.

132. Sainz Rozas, H.R.; Echeverría, H.E.; Barbieri, P.A. (2004b). Desnitrificación en un suelo bajo siembra directa en función de la presencia de plantas de maíz y de la dosis de nitrógeno. *Ci.Suelo*. 22(1):27- 35.
133. Salvucci, R.D, Aulicino, M., Hungria M., Balatti, P.A. (2012). Nodulation capacity of Argentinean soybean (*Glycine max.* Merr) cultivars inoculated with strains of *Bradyrhizobium japonicum* . *American journal of plant and science* (3), 130-140.
134. Sambrook J and Russell DW .(2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 999 pp.
135. Sameshima-Saito, R. Chiba, K. Hirayama, J. Itakura, M. Mitsui, H. Eda, S. Minamisawa, K. (2006a) Symbiotic *Bradyrhizobium japonicum* Reduces N₂O Surrounding the Soybean Root System via Nitrous Oxide. *Reductase.Applied and environmental microbiology* 72 (4), 2526–2532. doi: 10.1128/AEM.72.4.2526-2532.2006.
136. Sameshima-Saito, R. Chiba, Minamisawa, K. (2006b) Correlation of denitrifying capability with the existence of *nap*, *nir*, *nor* and *nos* genes in diverse strains of soybean Bradyrhizobia. *Microbes and Environments*, 21, 174-184. <https://doi.org/10.1264/jsme2.21.174>
137. Sameshima-Saito R, Chiba K, Minamisawa K. (2004) New method of denitrification analysis of *Bradyrhizobium* field isolates by gas chromatographic determination of ¹⁵N-labeled N₂. *Appl Environ Microbiol* ; 70:2886–2891.
138. Sameshima R, Isawa T, Sadowsky MJ, Hamada T, Kasai H, Shutsrirung A. (2003). Phylogeny and distribution of extra-slow-growing *Bradyrhizobium japonicum* harboring high copy numbers of RS[±], RS² and IS1631. *FEMS Microbiology Ecology*. 44: (2) 191–202.
139. Sánchez C, Gates AJ, Meakin GE, Uchiumi T, Girard L, Richardson DJ, Bedmar EJ, Delgado MJ. (2010). Production of nitric oxide and nitrosyl-leghaemoglobin complexes in soybean nodules in response to flooding. *Mol Plant Microb Inter*, 23, 702-711.
140. Sanford R, Darlene D, Wagner Q, Chee-Sanford J, Thomas S, Cruz-García C, Rodríguez G, Massol-Deyá A, Krishnani K, Ritalahti K, Nissen S, Konstantinidis

- K, Löffler F.(2012). Unexpected nondenitrifier nitrous oxide reductase gene diversity and abundance in soils PNAS 109 (48)19709-19714. doi:10.1073/pnas.1211238109
141. Saunders, N. F. W., Houben, E. N. G., Koefoed, S., de Weert, S., Reijnders, W. N. M., Westerhoff, H. V., De Boer, A. P. N. van Spanning, R. J. M. (1999). Transcription regulation of the nir gene cluster encoding nitrite reductase of *Paracoccus denitrificans* involves NNR and NirI, a novel type of membrane protein. Mol Microbiol 34, 24-36.
 142. Saunders, N. F. W., Ferguson, S. J. Baker, S. C. (2000). Transcriptional analysis of the nirS gene, encoding cytochrome cd 1 nitrite reductase, of *Paracoccus pantotrophus* LMD 92.63. *Microbiology* 146, 509-516.
 143. Sears, H. J., Sawers, G., Berks, B. C., Ferguson, S. J. Richardson, D. J. (2000). Control of periplasmic nitrate reductase gene expression (*napEDABC*) from *Paracoccus pantotrophus* in response to oxygen and carbon substrates. *Microbiology* 146, 2977–2985.
 144. Sears H.J., Little P.J., Richardson D.J., Berks B.C., Spiro S., Ferguson S.J. (1997). Identification of an assimilatory nitrate reductase in mutants of *Paracoccus denitrificans* GB17 deficient in nitrate respiration. Arch. Microbiol. 167:61-6.
 145. Shimoda Y, Shimoda-Sasakura F, Kucho K., Kanamori N, Nagata M, Suzuki A, Abe M, Higashi S, Uchiumi T.(2009). Overexpression of class 1 plant hemoglobin genes enhances symbiotic nitrogen fixation activity between *Mesorhizobium loti* and *Lotus japonicus*. *Plant J.* 57, 254e263
 146. Sinclair TR, Soffes AR, Hinson K, Albrecht SL, and Pfahler PL, (1991). Genotypic variation in soybean nodule number and weight. *Crop Sci* 31:301–304.
 147. Siqueira, A. F., Ormeño-Orrillo, E., Souza, R. C., Rodrigues, E. P., Almeida, L. G. P., Barcellos, F. G., Hungria, M. (2014). Comparative genomics of *Bradyrhizobium japonicum* CPAC 15 and *Bradyrhizobium diazoefficiens* CPAC 7: elite model strains for understanding symbiotic performance with soybean. BMC Genomics, 15(1), 420. doi:10.1186/1471-2164-15-420.
 148. Snyder SW Hollocher TC (1987) Purification and some characteristics of nitrous oxide reductase from *Paracoccus denitrificans*. J Biol Chem 262: 6515–6525.

149. Smith, P., Fang, C., Dawson, J.J.C., Moncrieff, J.B. (2008). Impact of global warming on soil organic carbon. *Adv. Agron.* 97, 1-43.
150. Steenkamp ET, Stepkowski T, Przymusiak-Botha WJ, Law II. (2008). Cowpea and peanut in southern Africa are nodulated by diverse *Bradyrhizobium* strains harboring nodulation genes that belong to the large pantropical clade common in Africa. *Mol Phylo Evol* 48:1131-1144.
151. Sullivan M.J., Gates, A.G., Appia- Ayme, C., Rowley, G., Richardson, D., Copper control of bacterial N₂O reduction. (2013). Proceedings of the National Academy of Sciences, 110 (49) 19926-19931; DOI:10.1073/pnas.1314529110
152. Takaya N., Shoun H. (2000). Nitric oxide reduction, the last step in denitrification by *Fusarium oxysporum*, is obligatorily mediated by cytochrome P450nor. *Mol. Gen. Genet.* 263, 342–348. DOI:10.1007/s004380051177 (doi:10.1007/s004380051177)
153. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739.
154. Thomson, A.J., Giannopoulos, G., Pretty, J., Baggs, E.M., Richardson, D.J., (2012). Biological sources and sinks of nitrous oxide and strategies to mitigate emissions. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci.* 367, 1157–1168.
155. Toffanin, A., Wu, Q., Maskus, M., Casella, S., Abruna, H. D. Shapleigh, J. P. (1996). Characterization of the gene encoding nitrite reductase and the physiological consequences of its expression in the nondenitrifying *Rhizobium 'hedysari'* strain HCNT1. *Appl Environ Microbiol* 62, 4019– 4025.
156. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. (1997). The clustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Res.* 24, 4876-4882.
157. Torres D, Revale S, Obando M, Maroniche G, Paris G, Peticari A, Vazquez M, Wisniewski-Dyé F, Martínez-Abarca F, Cassán F.(2015). Genome sequence of *Bradyrhizobium japonicum* E109, one of the most agronomically used nitrogen-fixing rhizobacteria in Argentina. *Genome Announc* 3(1):e01566-14. doi:10.1128/genomeA.01566-14.

158. Torres Porras, M.J. (2014). Versatility in rhizobial respiration under oxygen-limiting conditions: new insights in the denitrification regulatoru network. Granada: Universidad de Granada. 214 p. <http://hdl.handle.net/10481/29948>
159. Tortosa, G. Hidalgo, A. Salas, A. Bedmar, E.J. Mesa, S. Delgado, M.J. (2015) Nitrate and flooding induce N₂O emissions from soybean nodules. *Symbiosis* 67 (1-3), 125–133. doi: 10.1007/s13199-015-0341-3.
160. Uchida Y. Akiyama H. (2013). Mitigation of postharvest nitrous oxide emissions from soybean ecosystems: a review, *Soil Sci. Plant Nutri.* 59, 477–487.
161. Unkovich MJ, Pate JS (2000) An appraisal of recent field measurements of symbiotic N₂ fixation by annual legumes. *Field Crop Res* 65(2): 211–228. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(99\)00088-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(99)00088-X)
162. Velasco L, Mesa S, Delgado MJ, Bedmar EJ. (2001). Characterization of the nirK gene encoding the respiratory, Cu-containing nitrite reductase of *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochim Biophys Acta.*1521, 130-134.
163. Velasco L, Mesa S, Xu CA, Delgado MJ, Bedmar EJ. (2004). Molecular characterization of nosRZDFYLX genes coding for denitrifying nitrous oxide reductase of *Bradyrhizobium japonicum*. *Antonie van Leeuwenhoek* 85, 229-235.
164. Versalovic J, Koeuth T and Lupski JR.(1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 19:6823-6831.
165. Vincent, J. M. (1970). A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. Oxford: Blackwell Scientific.
166. Vinuesa P, Leon-Barrios M, Silva C, Willems A, Jarabo-Lorenzo A, Perez-Galdona R, Werner D, Martinez-Romero E. (2005). *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 569-575.
167. Van Spanning, R.J.M., Delgado, M.J. and Richardson, D.J.(2005). The nitrogen cycle: denitrification and its relationship with N₂ fixation. In Nitrogen Fixation in

- Agriculture, Forestry, Ecology and the Environment (Werner, D. and Newton, W.E., eds), pp. 277–342.
168. Van Spanning, R.J.M., de Boer, A.P.N., Reijnders, W.N.M., Westerhoff, H.V., Stouthamer, H. y Van der Oost, J.V. (1997). FnrP and NNR of *Paracoccus denitrificans* are both members of the FNR family of transcriptional activators but have distinct roles in respiratory adaptation in response to oxygen limitation. *Mol. Microbiol.* 23:893-907.
 169. de Vries, S., Suharti, S. and Pouvreau, L.A.M.(2007). Nitric oxide reductase: structural variations and catalytic mechanism. In *Biology of the Nitrogen Cycle* (Bothe, H., Ferguson, S. J. and Newton, W.E., eds). Elsevier. pp. 57–66.
 170. Wagner-Riddle C, Thurtell GW.(1998). Nitrous oxide emissions from agricultural fields during winter and spring thaw as affected by management practices. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 52, 151–163.
 171. Wagner-Riddle, C., Furon, A., Mclaughlin, N. L., Lee, I., Barbeau, J., Jayasundara, S., Parkin, G., Von Bertoldi, P. and Warland, J.(2007). Intensive measurement of nitrous oxide emissions from a corn–soybean–wheat rotation under two contrasting management systems over 5 years. *Global Change Biology*, 13: 1722–1736. doi:10.1111/j.1365-2486.2007.01388.x
 172. Weir, B.S., Turner, S.J., Silvester, W.B., Park, D.C. Young, J.A. (2004) Unexpectedly diverse *Mesorhizobium* strains and *Rhizobium leguminosarum* nodulate native legume genera of New Zealand, while introduced legume weeds are nodulated by *Bradyrhizobium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 5980–5987.
 173. Whitehead D, Edwards GR (2015) Assessment of the application of gibberellins to increase productivity and reduce nitrous oxide emissions in grazed grassland. *Agric Ecosyst Environ* 207:40–50
 174. Wunsch, P. Zumft, WG. (2005). Functional Domains of NosR, a Novel Transmembrane Iron-Sulfur Flavoprotein Necessary for Nitrous Oxide Respiration *Journal of Bacteriology*, 187 (6) 1992-2001; DOI: 10.1128/JB.187.6.1992-2001.2005

175. Yang, L., and Z. Cai. (2005). The effect of growing soybean (*Glycine max.* L.) on N₂O emission from soil. *Soil Biol. Biochem.* 37:1205-1209.
176. Zhong, Z., Lemke, R. L., and Nelson, L. M. (2009). Nitrous oxide emissions associated with nitrogen fixation by grain legumes, *Soil Biol. Biochem.*, 41, 2283–2291, doi:10.1016/j.soilbio.2009.08.009, 2009.
177. Zumft, W.G.(2005). Biogenesis of the bacterial respiratory CuA, Cu-S enzyme nitrous oxide reductase. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 10, 154–166
178. Zumft, W.G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and molecular biology reviews* 4, 533–616.

ANEXOS Y FIGURAS SUPLEMENTARIAS

Anexo 1. Secuencias obtenidas de los productos amplificados del gen 16S rRNA de las cepas de *Bradyrhizobium* sp. y sus respectivas homologías, según cada caso.

Gen 16S rRNA

>SEMIA5019

```
TACTAGCGATTCCAACCTTCATGGGCTCGAGTTGCAGAGCCCAATCCGAACCTGAGACGG
CTTTTTGAGATTTGCGAAGGGTTCGCCCTTAGCATCCCATTGTCACCGCCATTGTAGCA
CGTGTGTAGCCCAGCCGTAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCGC
GGCTTATACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCTCAACTAAATGGTAGCAACTAAGGACGG
GGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCC
ATGCAGCACCTGTCTCCGGTCCAGCCGAAGTGAAGAACTCCGTCTCTGGAGTCCGCGA
CCGGGATGTCAAGGGCTGGTAAGGTTCTGCGCGTTGCGTTCGAATTAACCACATGCTC
CACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAATCTTGCGACCGTACTCCCC
AGGCGGAATGCTTAAAGCGTTAGCTGCGCCACTAGTGAGTAAACCCACTAACGGCTGG
CATTTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTT
CGTGCCTCAGCGTCAGTATCGGGCCAGTGAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTGCGAA
TATCTACGAATTTACCTCTACACTCGCAGTTCCACTCACCTCTCCCGAACTCAAGATCT
TCAGTATCAAAGGCAGTTCTGGAGTTGAGCTCCAGGATTTACCCCTGACTTAAAGACC
CGCCTACGCACCCTTTACGCCCAGTGATTCCGAGCAACGCTAGCCCCCTTCGTATTACC
GCGGTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGGGCTTATTCTTGCGGTACCGTCATTATCTTCCC
GCACAAAAGAGCTTTACAACCCTAGGGCCTTCATCACTCACGCGGCATGGCTGGATCA
GGCTTGCGCCCATTTGTCCAATATTCCTTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTG
TCTCAGTCCCAATGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTACTGATCGTCGCCTTGGTG
AGCCATTACCTCACCAACTAGCTAATCAGACGCGGGCCGACCCACCCGCGTGTGTGTG
TGTATAGGCCCCAGCCCGTTAAGGACCATGAGGGACTTGACGTCATTCCCCTCTTTCG
```

Bradyrhizobium sp. NBRC 101129 gene for 16S rRNA, partial sequence.
AB681395 100%

Bradyrhizobium elkanii strain CCBAU 65727 16S ribosomal RNA gene,
partial sequence. JF834147 100%

>SEMIA5079

```
ATCCACGATTACTAGCGATTCCAACCTTCATGGGCTCGAGTTGCAGAGCCCAATCCGAAC
TGAGACGGCTTTTTGAGATTTGCGAAGGGTTCGCCCTTAGCATCCCATTGTCACCGCCA
TTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGCCGTAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCAC
CTTCTCGCGGCTTATCACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCTCAACTAAATGGTAGCAACT
AAGGACGGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGA
CGACAGCCATGCAGCACCTGTGCTCCAGGCTCCGAAGAGAAGGTCACATCTCTGCGAC
CGGTCTGGACATGTCAAGGGCTGGTAAGGTTCTGCGCGTTGCGTTCGAATTAACCAC
ATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAATCTTGCGACCGTA
CTCCCCAGGCGGAATGCTTAAAGCGTTAGCTGCGCCACTAGTGAGTAAACCCACTAAC
GGCTGGCATTTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCC
ACGCTTTCGTGCCTCAGCGTCAGTATCGGGCCAGTGAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTC
TTGCGAATATCTACGAATTTACCTCTACACTCGCAGTTCCACTCACCTCTCCCGAACTC
AAGATCCTCAGTATCAAAGGCAGTTCTGGAGTTGAGCTCCAGGATTTACCCCTGACTT
AAAGACCCGCCTACGCACCCTTTACGCCCAGTGATTCCGAGCAACGCTAGCCCCCTTCG
TATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGGGCTTATTCTTGCGGTACCGTCATTA
```

TCTTCCCGCACAAAAGAGCTTTACAACCCTAGGGCCTTCATCACTCACGCGGCATGGCT
GGATCAGGGTTGCCCCATTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGG
GCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTACTGATCGTCGCC
TTGGTGAGCCATTACCTACCAACTAGCTAATCAGACGCGGGCCGATCTTTCGGCGATA
AATCTTTCCCGTAAGGGC

Bradyrhizobium japonicum strain SR-11-5079 16S ribosomal RNA gene,
partial sequence.JQ315252 100%

Bradyrhizobium japonicum USDA6 DNA, complete genome.
AP012206 100%

>SEMIA5080

GATCCACGATTACTAGCGATTCCAACCTTCATGGGCTCGAGTTGCAGAGCCCAATCCGA
ACTGAGACGGCTTTTTGAGATTTGCGAAGGGTCGCCCTTAGCATCCCATTGTCACCCG
CATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGCCCCTAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCC
ACCTTCCTCGCGGCTTATCACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCTCAACTAAATGGTAGCAA
CTAAGGACGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCT
GACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTCCAGGCTCCGAAGAGAAGGTCACATCTCTGCG
ACCGTCCCTGGACATGTCAAGGGCTGGTAAGGTTCTGCGCGTTGCGTCGAATTAACC
ACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAATCTTGCGACC
GTAATCCCCAGGCGGAATGCTTAAAGCGTTAGCTGCGCCACTAGTGAGTAAACCCACT
AACGGCTGGCATTTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTC
CCCACGCTTTCGTGCCTCAGCGTCAGTATCGGGCCAGTGAGCCGCCTTCGCCACTGGTG
TTCTTGCGAATATCTACGAATTTACCTCTACACTCGCAGTTCCTACTCACCTCTCCCGAA
CTCAAGATCTTCAGTATCAAAGGCAGTTCTGGAGTTGAGCTCCAGGATTTACCCCTGA
CTTAAAGACCCGCCTACGCACCCTTACGCCAGTGATTCCGAGCAACGCTAGCCCCCT
TCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGGGCTTATTCTTGCGGTACCGTCA
TTATCTTCCCGCACAAAAGAGCTTTACAACCCTAGGGCCTTCATCACTCACGCGGCATG
GCTGGATCAGGGTTGCCCCATTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTT
TGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTACTGATCGTC
GCCTTGGTAGGCCGTTACCCTACCAACTAGCTAATCAGACGCGGGCCGATCTTTCGGCG
ATAAATCTTCCCGTAAGGGCTTATCCGGTATT

Bradyrhizobium japonicum gene for 16S rRNA, partial sequence,
strain: NBRC 14792. AB680665 100%

Bradyrhizobium japonicum strain NA257 16S ribosomal RNA gene,
partial sequence.JN392464 100%

Bradyrhizobium sp. SEMIA 5080 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence.FJ390911 100%

>SEMIA587

TTACTAGCGATTCCAACCTTCATGGGCTCGAGTTGCAGAGCCCAATCCGAAGTGCAGACG
GCTTTTTGAGATTTGCGAAGGGTCGCCCTTAGCATCCCATTGTCACCGCCATTGTAGC
ACGTGTGTAGCCAGCCCCTAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCG
CGGCTTATCACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCTCAACTAAATGGTAGCAACTAAGGACG
GGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGC
CATGCAGCACCTGTCTCCGGTCCAGCCGAAGTGAAGAACTCCGTCTCTGGAGTCCGCG

ACCGGGATGTCAAGGGCTGGTAAGGTTCTGCGCGTTGCGTTCGAATTAACCACATGCT
CCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCCTTTGAGTTTTAATCTTGC GACCGTACTCCC
CAGGCGGAATGCTTAAAGCGTTAGCTGCGCCACTAGTGAGTAAACCCACTAACGGCTG
GCATTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCT
TTCGTGCCTCAGCGTCAGTATCGGGCCAGTGAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTTCG
AATATCTACGAATTTACCTCTACACTCGCAGTTCCACTCACCTCTCCC GAACTCAAGA
TCTTCAGTATCAAAGGCAGTTCTGGAGTTGAGCTCCAGGATTTACCCCTGACTTAAAG
ACCCGCCTACGCACCCTTTACGCCCAGTGATTCCGAGCAACGCTAGCCCCCTTCGTATT
ACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGGGCTTATTCTTGC GGTACCGTCATTATCTT
CCCGCACAAAAGAGCTTTACAACCCTAGGGCCTTCATCACTCACGCGGCATGGCTGGA
TCAGGCTTGCGCCATTGTCCAATATTC CCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCC
GTGTCTCAGTCCCAATGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTACTGATCGTCGCCTTG
GTGAGCCATTACCTACCAACTAGCTAATCAGACGCGGGCCGATCTTTCGGCGATAAA
TCTTCCCCGTAAGGGCTTATCC

Bradyrhizobium sp. NBRC 101129 gene for 16S rRNA, partial sequence.
AB681395 100%

Bradyrhizobium elkanii strain CCBAU 65727 16S ribosomal RNA gene,
partial sequence.JF834147 100%

Bradyrhizobium sp. SEMIA 6093 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence.FJ390909 100%

>E-109

ATTACTAGCGATTCCAACCTCATGGGCTCGAGTTGCAGAGCCCAATCCGAACTGAGAC
GGCTTTTTGAGATTTGCGAAGGGTCGCCCTTAGCATCCCATTGTCACCGCCATTGTAG
CACGTGTGTAGCCCAGCCCGTAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTC
GCGGCTTATCACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCTCAACTAAATGGTAGCAACTAAGGAC
GGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAG
CCATGCAGCACCTGTGCTCCAGGCTCCGAAGAGAAGGTCACATCTCTGCGACCGGTCC
TGGACATGTCAAGGGCTGGTAAGGTTCTGCGCGTTGCGTTCGAATTAACCACATGCTCC
ACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAATCTTGC GACCGTACTCCCCA
GGCGGAATGCTTAAAGCGTTAGCTGCGCCACTAGTGAGTAAACCCACTAACGGCTGGC
ATTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTC
GTGCCTCAGCGTCAGTATCGGGCCAGTGAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTTCGGAAT
ATCTACGAATTTACCTCTACACTCGCAGTTCCACTCACCTCTCCC GAACTCAAGATCC
TCAGTATCAAAGGCAGTTCTGGAGTTGAGCTCCAGGATTTACCCCTGACTTAAAGACC
CGCCTACGCACCCTTTACGCCCAGTGATTCCGAGCAACGCTAGCCCCCTTCGTATTACC
GCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGGGCTTATTCTTGC GGTACCGTCATTATCTTCCC
GCACAAAAGAGCTTTACAACCCTAGGGCCTTCATCACTCACGCGGCATGGCTGGATCA
GGGTTGCCCCATTGTCCAATATTC CCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTG
TCTCAGTCCCAATGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTACTGATCGTCGCCTTGGTG
AGCCATTACCTACCAACTAGCTAATCAGACGCGGGCCGATCTTTCGGCGATAAATCTT
TC

Bradyrhizobium japonicum strain SR-11 16S ribosomal RNA gene,
partial sequence.JQ315252 100%

Bradyrhizobium japonicum USDA 6 DNA, complete genome.
AP012206 100%

Bradyrhizobium japonicum gene for 16S rRNA, partial sequence,
strain: C24-2420.AB513468 100%

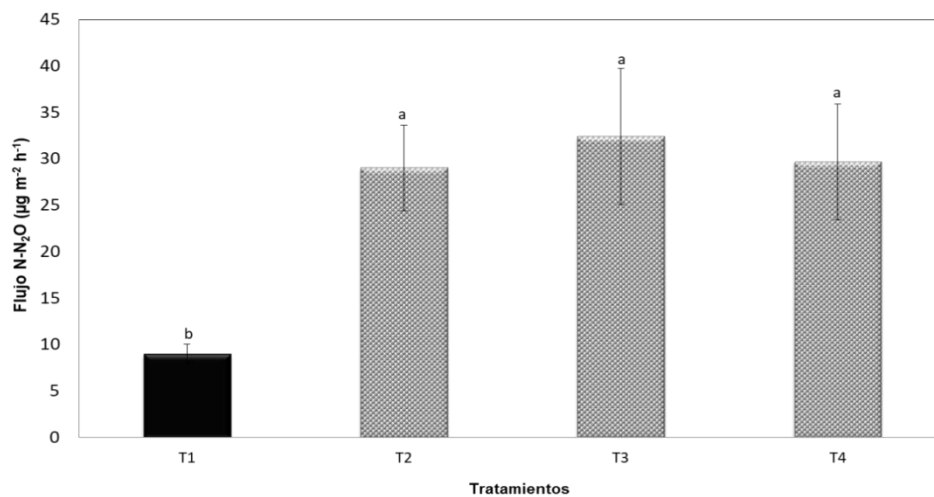


Figura suplementaria 1. Flujos de N₂O acumulado en raíces noduladas de soja inoculadas con: (T1) USDA110 como control negativo; (T2) E109 como control positivo; (T3) E109+Az39; (T4) E109+ATCC17588. Los valores se expresan como µgmol de N²-N₂O/m²*h. Las diferencias estadísticamente significativas por test de Tukey HSD (p<0.05).

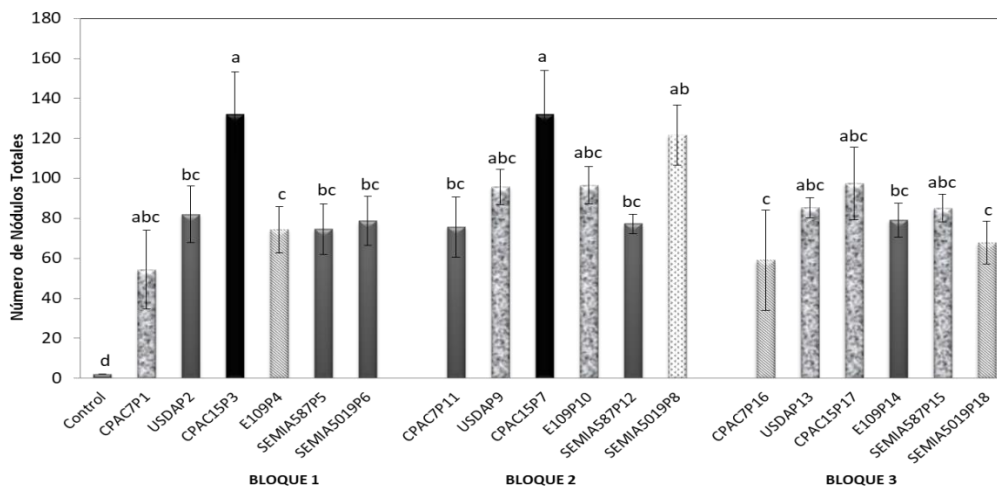


Figura suplementaria 2. Número de nódulos en raíces de soja inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. Los resultados corresponden al número de nódulos en raíz principal y raíces secundarias. Los valores y representan la media de 6 repeticiones seguida del error estándar. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas en relación a cada variable evaluada de acuerdo a la prueba de Tukey HSD ($p < 0.05$).

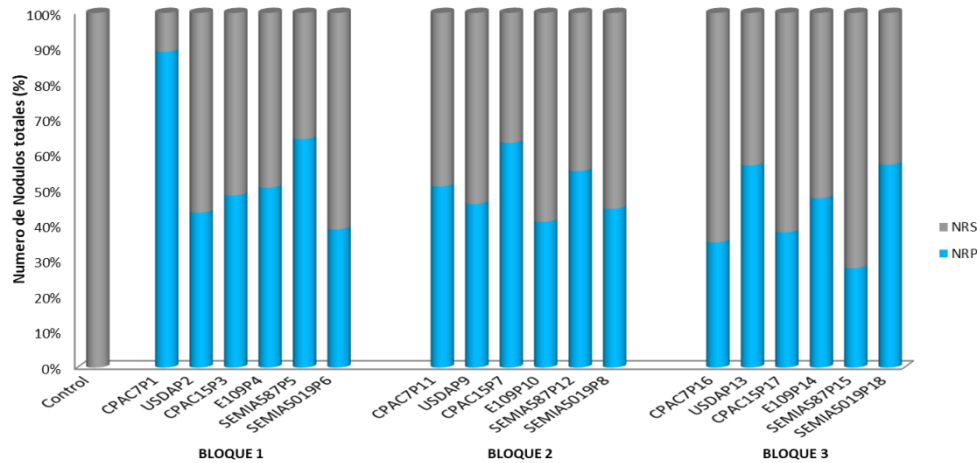


Figura suplementaria 3. Porcentaje de nódulos en raíces de soja inoculadas con las cepas de *Bradyrhizobium* sp. Los resultados corresponden al número de nódulos en raíz principal y raíces secundarias que aportan al número total de nódulos por cada parcela evaluada.

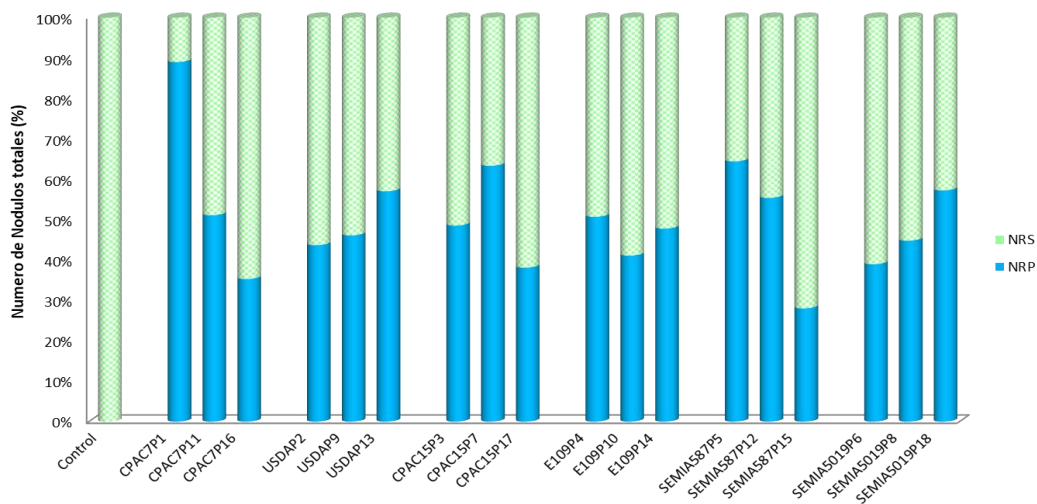


Figura suplementaria 4. Porcentaje de nódulos en raíces de soja inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. Los resultados corresponden al número de nódulos en raíz principal y raíces secundarias que aportan al número total de nódulos agrupados por parcelas inoculadas con el mismo rizobio.

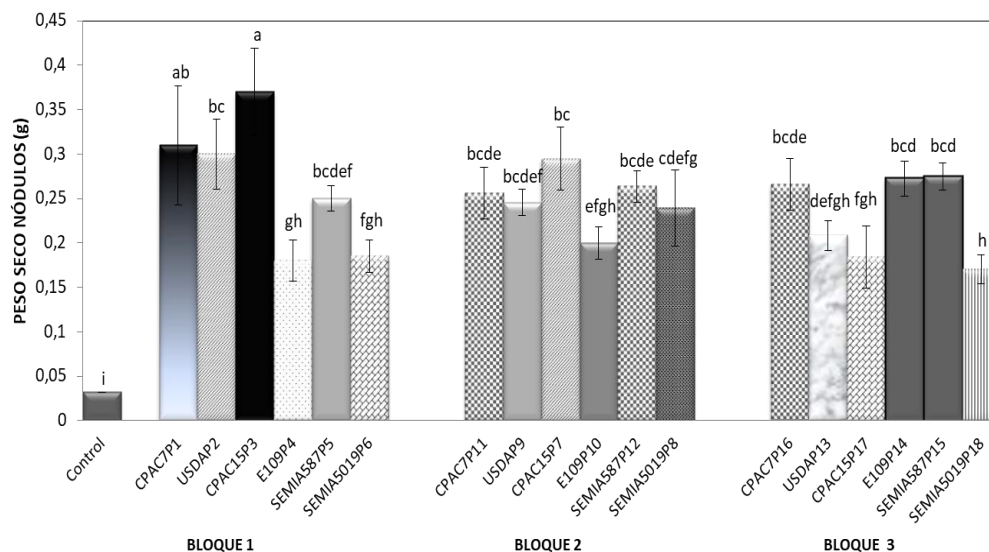


Figura suplementaria 5. Peso seco de nodulos de plantas de soja inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. Los valores y representan la media de 5 repeticiones seguida del error estándar. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas en relación a cada variable evaluada de acuerdo a la prueba de Tukey HSD ($p < 0.05$).

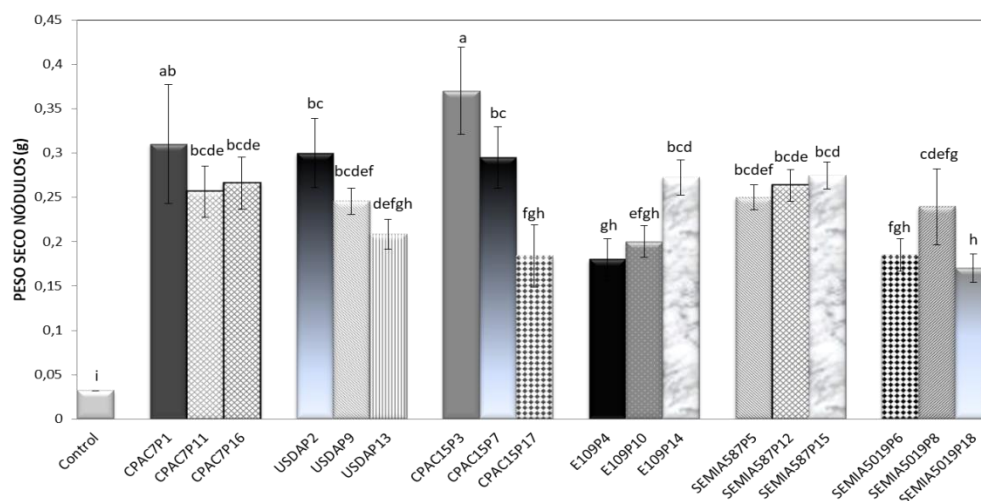


Figura suplementaria 6. Peso seco de nódulos de raíces de plantas de soja inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. . Los resultados presentan el peso seco agrupado por parcelas

inoculadas con el mismo rizobio. Los valores y representan la media de 5 repeticiones seguida del error estándar. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas en relación a cada variable evaluada de acuerdo a la prueba de Tukey HSD ($p < 0.05$).

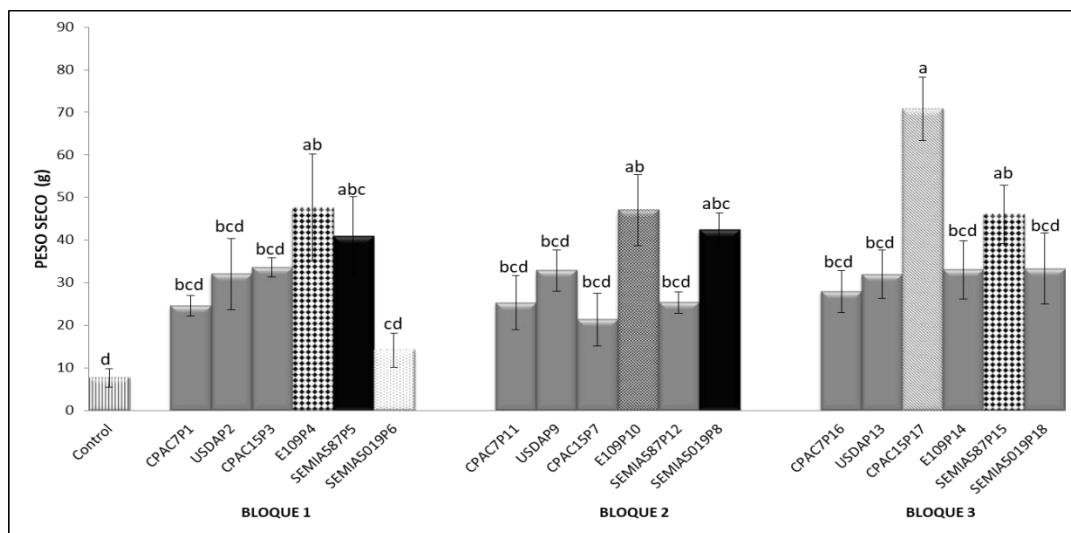


Figura suplementaria 7. Peso seco de parte aérea de plantas de soja inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. Los valores y representan la media de 5 repeticiones seguida del error estándar. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas en relación a cada variable evaluada de acuerdo a Tukey HSD ($p < 0.05$).