

**Estudio de una Estrategia Alternativa de Ingeniería Genética para
Incrementar la Fijación Biológica de Nitrógeno Atmosférico**

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires,
Área Ciencias Agropecuarias*

Lorena M. Setten

Lic. en Biología – Universidad de Morón - 2005

Lugar de trabajo: Laboratorio de Mejoramiento Molecular de Especies Forrajeras y
Salicáceas. Instituto de Genética “Ewald A. Favret” CICVyA – INTA - Buenos Aires



FAUBA

Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

Nicolás Daniel Ayub

Lic. en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctor en Química Biológica (Área Microbiología) (Universidad de Buenos Aires)

Co-director

Gabriela Cynthia Soto

Licenciada en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctora en Cs. Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Consejero de Estudios

María Susana Di Bernardo de Passeron

Lic. en Ciencias Químicas (Universidad de Buenos Aires)

Dra. En Ciencias Químicas (Universidad de Buenos Aires)

JURADO DE TESIS

Director de tesis

Nicolás Daniel Ayub

Lic. en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctor en Química Biológica (Área Microbiología) (Universidad de Buenos Aires)

JURADO

María Eugenia Zanetti

Lic. en Química (Universidad Nacional de La Plata)

Doctora en Ciencias (Área Química) (Universidad Nacional de La Plata)

JURADO

Leonardo Curatti

Lic. en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional de Mar del Plata)

Doctor en Ciencias Biológicas. (Universidad Nacional de Mar del Plata)

JURADO

Antonio Lagares

Lic. en Ciencias Bioquímicas (Universidad Nacional de La Plata)

Dr. en Cs. Bioquímicas (Universidad Universidad Nacional de La Plata)

Fecha de defensa de la tesis: 24 de Octubre de 2014.

A esa estrella que sonríe cada día para mí...

Agradecimientos

Simplemente un pequeño homenaje a todos aquellos que hicieron posible llevar a cabo este trabajo.

Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) por la beca otorgada para el desarrollo de esta tesis doctoral.

Al Ing. Agr. M. Sc Raúl Ríos, director del Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas del INTA-Castelar, ya fallecido, por confiar en mí para el desarrollo de esta beca doctoral (INTA-Agencia).

Al INTA y a la ANPCyT por la subvención de este trabajo de tesis a través del Proyecto “Mejoramiento molecular de especies forrajeras para ambientes restrictivos” (AERG 233282 – Cartera 2009 – Ing. Agr. Antonio Díaz Paleo) y del PICT 2011 – Dr. Nicolás Ayub)

A la Ing. Agr. M. Sc. Elba Pagano por permitirme trabajar en esta investigación, brindarme todo su apoyo y la libertad para hacerlo.

A mi Consejera, la Dra. Susana Di Bernardo de Passeron por acompañarme a lo largo de estos años y por su buena predisposición para darme consejo.

A los jurados de esta tesis, Dra. Ma Eugenia Zanetti, Dr. Leonardo Curatti y Dr. Antonio Lagares, por sus valiosos aportes.

A mis directores Dr. Nicolás Ayub y Dra. Gabriela Soto por el tiempo, la experiencia y el acompañamiento a lo largo de este trabajo.

A los Dres. Matteo Mozzicafredo, Massimiliano Cuccioloni y Mauro Angeletti de *School of Biosciences and Biotechnology, University of Camerino* (Italia) por su colaboración en la caracterización de la nitrogenasa de *Pseudomonas*.

Al Dr. Adolfo Daniel Fox, director del Laboratorio Fox, a la Dra. Ana Romina Fox y la Señora Graciela Fox por las determinaciones de nitrógeno mineral en el suelo.

A la Dra. Alicia Martínez y al Ing. Agr. M. Sc. Victor Beltran, por la colaboración en las mediciones de clorofila.

A la futura doctora y mamá Lic. Ailin Beznec, y a las doctoras Dalia Lewi y Cecilia Décima, por el espacio cedido para llevar a cabo el experimento de maíz.

Al Señor Roberto Richmond y la Ing. Agr. M. Sc. Mariana Kándus, por su colaboración con los experimentos de maíz.

A los doctores Gustavo Maddonni y Martín Díaz Zorita por los valiosos comentarios y aportes recibidos.

A la Ph. D. Claudine Elmerich y el Ph. D. Edwin Southern, por enviarme sus publicaciones gentilmente y junto con ellas sus mejores deseos para el éxito de esta investigación.

Al personal de la Escuela para Graduados “Alberto Soriano” – FAUBA, realmente es un grupo muy humano, en el cual uno encuentra apoyo, contención y solución a cada uno de los inconvenientes que se presentan.

A la Dra. Lucía Vivanco, por todas las sugerencias recibidas para la ExpoDoc, espero recordarlas para la defensa.

A todo el público que asistió a la ExpoDoc por los consejos y las sugerencias recibidas.

A mis compañeros de laboratorio: Lic. Andrea Dengis, Dra. Andrea Ferri, Ing. Agr. Araceli García, Lic. Cristina Gomez, Lic. Christian Lisi, Sra. Camila Maurelis (con Isabella en la panza), Sra. Graciela Nuñez, Sr. Guillermo Piparola, Sr. Juan Requelme y Sra. Carmen Soria por todo el apoyo y la colaboración.

A los bibliotecarios, Stella Maris Noya, Liliana Barchetta y Daniel Bassi y a Jorge Cayo por albergarme en sus oficinas, aceptar mi inquietud y disfrutar diariamente, sin quejas, de mi solo de batería.

A mis compañeros de beca Lic. Cecilia Randazzo, Ing. Agr. Julián Guariniello y Lic. María José Beribe con quienes compartí, éxitos y fracasos, alegrías y tristezas a lo largo de estos años, que realmente fueron una aventura increíble.

A Benja y Tute Ayub por compartir tardes y feriados en el laboratorio.

Al Sr. José Diaz, por abrir y cerrar las puertas del instituto en los horarios más insólitos.

Al personal policial, principalmente a Susana y su marido por compartir el término de cada jornada y cada fin de semana brindándome compañía, protección y seguridad.

A Candela alias “Sindi” por ser mi fiel compañera y mi fan número uno.

A aquellos inolvidables profesores de la Universidad de Morón de quienes aprendí tanto y siempre tengo presentes; Dr. David Kursinzky, Bioq. Claudia Diamant, Ing. Agr. M. Sc. Marcela Sánchez, Dr. Néstor Labonia, Dr. Claudio Cervino, Dr. Ulises Mitidieri y Ing. Agr. Silvia Benavidez.

A la Dra. Ana María Molina, Ing. Agr. M. Sc. Elechosa, Tec. Miguel Juárez por abrirme las puertas del INTA hace ya más de 10 años.

Al Dr. Eduardo Favret y el Dr. Néstor Fuentes por abrirme los ojos a un nuevo mundo, en otra escala.

A la Bioq. M. Sc. Mariana Perez de la Torre, la Lic. Noelia Ulrich (futura Doctora) & Tec. Marcela Mori (futura Licenciada) por formar el mejor grupo de trabajo que existió y lucha constantemente para que vuelva a existir.

A mis primeros compañeros de trabajo, con ellos empezamos a recorrer juntos el camino de la ciencia y compartimos nuestro primeros tropezones, Dra. Yanil Parma, Lic. Pol Malaire, Lic. Mariana Capello y Lic. Eugenio Calcena alias Juge.

A la Lic. Estela Favret por tener siempre el oído predispuesto para escucharme y aconsejarme.

Y muy especialmente...

A las cuatros personas que hicieron posible que terminara de escribir, Lic. Lorena La Fuente, Bioq. M. Sc. Mariana Pérez de la Torre, Carolina Castagnet (futura Técnica en floricultura) y Laura Lima que supieron soportar los primeros escritos; mis intentos de renuncia, le pusieron el oído a cada uno de mis proyectos fabulosos para dejar de escribir y lograron mantenerme sentada. Chicas, no se si va a salir algo bueno de esto pero mi eterno agradecimiento hacia ustedes por convencerme de que lo podía lograr. Las quiero un montón.

A mis sobrinos, Mateo alias “Cabeza de Cepillo” & Marco alias “Cabecita de fósforo” y mis hermanos, Mariano, Danilo y Carolina, por aguantar mis ausencias.

A una de las personas más importantes que me acompañó, sostuvo y empujó durante estos años, mi entrañable amiga, Lo alias “la otra Lo”, “Loló”, “Totolito”, “Tatanito”.

A mis padres por estar siempre y acompañarme en cada una de mis decisiones, de ellos aprendí lo más importante en la vida, a ser una buena persona, o al menos intentarlo y espero haber aprendido bien, modelos no me faltaron. Así como también aprendí su mayor virtud y su peor defecto poner al otro por delante de los problemas y las necesidades propias. Gracias mami y pochi por ser su consentida. Los amo muchísimo.

A Dios, a pesar de sentirte lejos o muy cerca siempre presente en mi vida, gracias por darme la fuerza necesaria para seguir adelante.

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.

Lorena María Setten

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

Los resultados derivados de esta tesis dieron lugar a una publicación en una revista internacional y dos solicitudes de patente: una nacional y otra internacional.

Publicación en revista internacional:

Setten, L., Soto, G., Mozzicafreddo, M., Fox, A. R., Lisi, C., Cuccioloni, M., Angeletti, M., Pagano, E., Díaz-Paleo, A. & Ayub, N. 2013. Engineering *Pseudomonas protegens* Pf-5 for nitrogen fixation and its application to improve plant growth under nitrogen-deficient conditions. *PLoS ONE*, 8(5): 1-14. e63666.

Solicitudes de patente presentadas:

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas & Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Cepa de bacteria recombinante fijadora de nitrógeno, inóculo que la contiene y métodos de aplicación. Inventores: Gabriela Cynthia Soto; Nicolás Daniel Ayub y Lorena Maria Setten. N° de presentación: 20110104381. Fecha de solicitud: 24-11-2011, (Argentina).

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas & Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. *Recombinant nitrogen-fixing bacterial strain, inoculum containing the same and application methods*. Inventores: Gabriela Cynthia Soto; Nicolás Daniel Ayub y Lorena Maria Setten. N° de presentación: PCT/IB2012/056643. Fecha de presentación: 22-11-2012, (Suiza).

ÍNDICE GENERAL

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS.....	xi
ÍNDICE DE CUADROS.....	xvii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xix
ABREVIATURAS.....	xxiii
RESUMEN	xxvii
ABSTRACT.....	xxviii
CAPÍTULO 1.....	3
1.1- El Nitrógeno: elemento fundamental para la vida.....	3
1.2- Aspectos económicos y ecológicos del uso de fertilizantes nitrogenados en la agricultura	3
1.3- Fijación biológica del nitrógeno	6
1.4- Producción de nuevos diazótrofos mediante ingeniería genética.....	11
1.5- Objetivos e Hipótesis	12
1.6- Glosario.....	15
CAPÍTULO 2.....	19
2.1- Introducción	19
2.1.1- Fisiología, bioquímica y biología molecular de la fijación biológica del nitrógeno..	19
2.1.2- El género <i>Pseudomonas</i> como fijador de nitrógeno	23
2.1.3- Hipótesis y Objetivos.....	24
2.2- Materiales y Métodos.....	25
2.2.1- Cepas bacterianas.....	25
2.2.2- Construcción del cósmido recombinante X940	25
2.2.3- Transformación de cepas de <i>Pseudomonas</i> con el cósmido X940	27
2.2.4- Construcción de la cepa <i>Pseudomonas protegens</i> Pf-5 X940(2).....	29
2.2.5- Análisis por PCR del gen <i>nifH</i> en ADN genómico de <i>Pseudomonas protegens</i> Pf-5 X940.....	30
2.2.6- Análisis por <i>Southern blot</i> del número de copias insertadas del cósmido X940 en el genoma de la bacteria <i>Pseudomonas protegens</i> Pf-5 X940	30

2.2.7- Caminado Genómico de <i>Pseudomonas protegens</i> Pf-5 X940	32
2.2.8- Crecimiento bacteriano en condiciones restrictivas de nitrógeno	32
2.2.9- Análisis de la expresión de genes <i>nif</i> por RT-qPCR	34
2.2.10- Evaluación de la actividad nitrogenasa y medición de producción de amonio liberado	36
2.2.11- Programa Estadístico.....	36
2.3- Resultados.....	37
2.3.1- Transferencia de genes <i>nif</i> a <i>Pseudomonas protegens</i> Pf-5	37
2.3.2- Evaluación del crecimiento de <i>Pseudomonas protegens</i> Pf-5 X940 en condiciones restrictivas de nitrógeno.....	41
2.3.3- Adaptación del complejo heterólogo nitrogenasa a <i>Pseudomonas protegens</i> Pf-5...	43
2.3.4- Transferencia de los genes <i>nif</i> a otras cepas del género <i>Pseudomonas</i>	45
2.4- Discusión	51
2.5- Conclusiones.....	52
CAPÍTULO 3	57
3.1- Introducción.....	57
3.1.1- Fijación biológica del nitrógeno: estudio como una nueva alternativa para aumentar la concentración de nitrógeno en suelos deficientes	57
3.1.2- Hipótesis y objetivos	58
3.2- Materiales y Métodos	58
3.2.1- Material vegetal.....	58
3.2.2- Ensayos de inoculación en hidropónia	59
3.2.3- Ensayos de inoculación en tierra	60
3.2.4- Microcosmos del suelo.....	61
3.2.5- Programa Estadístico.....	62
3.3- Resultados.....	62
3.4- Discusión	67
3.5- Conclusión.....	70
CAPÍTULO 4	73

4.1	Consideraciones Finales.....	73
	Bibliografía	77
	Bibliografía	79

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1: Microorganismos diazótrofos.....	9
Cuadro 2.1_I: Sustratos alternativos del complejo nitrogenasa.....	21
Cuadro 2.1_{M&M}: Composición del medio de cultivo L.....	33
Cuadro 2.2_{M&M}: Genes <i>nif</i> estudiados por RT-qPCR.....	35
Cuadro 3.1_{M&M}: Composición de la solución nutritiva INTA 13.....	59
Cuadro 3.2_{M&M}: Caracterización de la tierra utilizada.....	61
Cuadro 3.1: Cuantificación de la concentración de amonio y nitrato en tierra de cultivo de maíz.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Esquema representativo de la distribución del nitrógeno (N) en la Tierra...	4
Figura 1.2: Representación esquemática del ciclo biogeoquímico del nitrógeno.....	5
Figura 1.3: Consumo de fertilizantes nitrogenados por hectárea (ha) de tierra cultivable.....	6
Figura 1.4: Diversidad taxonómica entre especies fijadoras de nitrógeno.....	7
Figura 2.1: Reducción de la molécula de nitrógeno por el complejo nitrogenasa.....	20
Figura 2.2: Genes de fijación de nitrógeno (<i>nif</i>).....	22
Figura 2.1_{M&M}: Esquema de obtención de la cepa doble recombinante A1501 C.....	26
Figura 2.2_{M&M}: Esquema de obtención del cósmido pSC2.....	27
Figura 2.3_{M&M}: Esquema de la construcción de la biblioteca genómica de A1501C para la obtención del cósmido recombinante X940.....	28
Figura 2.4_{M&M}: Esquema del cósmido recombinante X940.....	29
Figura 2.5_{M&M}: Obtención de la sonda <i>DIG</i> por PCR a partir de ADN genómico de <i>P. protegens</i> Pf-5 X940.....	31
Figura 2.6_{M&M}: Digestión de ADN genómico de <i>P. protegens</i> Pf-5 y <i>P. protegens</i> Pf-5 X940.....	32
Figura 2.7_{M&M}: Extracción ARN de <i>P. protegens</i> Pf-5 X940 y <i>P. protegens</i> Pf-5 X940(2).....	35
Figura 2.1: Esquema de la organización de los <i>clusters</i> de genes <i>nif</i> de <i>P. stutzeri</i> A1501.....	38
Figura 2.2: Análisis por PCR a partir del ADN genómico para evaluar la presencia del gen <i>nifH</i>	39
Figura 2.3: Análisis por <i>Southern blot</i> del número de copias insertadas del cósmido X940 en el genoma de la bacteria <i>P. protegens</i> Pf-5 X940.....	40

Figura 2.4: Esquema de la inserción del cósmido recombinante X940 en el genoma de <i>P. protegens</i> Pf-5.....	41
Figura 2.5: Evaluación del crecimiento de <i>P. protegens</i> Pf-5 X940 en condiciones restrictivas de nitrógeno con diferente disponibilidad de oxígeno (“aerobiosis” vs. “microaerobiosis”).....	42
Figura 2.6: Evaluación de la actividad nitrogenasa y medición de los niveles de producción de amonio extracelular en cultivos de <i>P. protegens</i> Pf-5 X940.....	44
Figura 2.7: Estudio de la expresión de los genes <i>nifA</i> , <i>nifB</i> y <i>nifH</i> en la bacteria <i>P. protegens</i> Pf-5 X940 mediante RT-qPCR.....	46
Figura 2.8: Comparación de la expresión de los genes <i>nifA</i> , <i>nifB</i> y <i>nifH</i> , actividad nitrogenasa y producción de amonio extracelular de las bacterias <i>P. protegens</i> Pf-5 X940 vs. <i>P. protegens</i> Pf-5 X940(2).....	47
Figura 2.9: Comparación de la actividad nitrogenasa y producción de amonio extracelular de las bacterias <i>P. protegens</i> Pf-5 X940 vs. <i>P. protegens</i> Pf-5 X940(2)....	48
Figura 2.10: Análisis por PCR a partir del ADN genómico para evaluar la presencia del gen <i>nifH</i>	49
Figura 2.11: Evaluación de la actividad nitrogenasa y producción de amonio extracelular en <i>Pseudomonas</i> recombinantes portadoras del cósmido X940.....	50
Figura 3.1: Efecto de la inoculación con <i>P. protegens</i> Pf-5 X940 sobre la productividad de <i>Arabidopsis thaliana</i>	63
Figura 3.2: Efecto de la inoculación con <i>P. protegens</i> Pf-5 X940 sobre la productividad de <i>Medicago sativa</i> (alfalfa).....	64
Figura 3.3: Efecto de la inoculación con <i>P. protegens</i> Pf-5 X940 sobre la productividad de <i>Festuca arundinacea</i> (festuca alta).....	65

Figura 3.4: Efecto de la inoculación con <i>P. protegens</i> Pf-5 X940 sobre la productividad en <i>Zea mays</i> (maíz).....	67
Figura 3.5: Análisis de persistencia de <i>P. protegens</i> Pf-5 X940 a través de un microcosmos del suelo.....	68

ABREVIATURAS

A1501	<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501
Acc. #	<i>accession number</i> (número de acceso)
ADN	ácido desoxirribonucleico
Amp^R	resistencia a ampicilina
ARN	ácido ribonucleico
ARN_r	ácido ribonucleico ribosomal
atm	atmósfera
ATP	adenosintrifosfato
cm	centímetros
CO₂	dióxido de carbono
DNase	desoxirribonucleasa
dNTPs	desoxirribonucleósidos trifosfato
DO	densidad óptica
dS/m	decisiemens por metro
dTTP	desoxitimidina trifosfato
dUTP	desoxiuridina trifosfato
EDTA	etilendiamino tetracético
EUA	Estados Unidos de América
FBN	fijación biológica de nitrógeno
FeFe-proteína	hierro nitrogenasa o azoferrodoxina
FeMo-co	cofactor hierro molibdeno
Fe-proteína	hierro proteína
Fig.	figura
Fig₁	figura sección introducción

Fig_{M&M}	figura sección materiales y métodos
G	Gramos
g/l	gramos por litro
H	Horas
H₂	Hidrógeno
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
Kg	Kilogramo
kg/ha	kilogramos por hectárea
KmR	resistencia a kanamicina
kV	Kilovoltio
LB	medio de cultivo Luria Bertani
M	Molar
Mg	Miligramos
mg/ml	miligramos por mililitro
mg/kg	miligramos por kilo
MgADP	magnesio adenosin difosfato
MgATP	magnesio adenosin trifosfato
ml	Mililitros
Min	Minutos
mM	Milimolar
MM	marcador de peso molecular
MoFe-proteína	hierro-molibdeno nitrogenasa o molibdoferrodoxina
mS/cm	milisiemens por centímetro
N₂	Nitrógeno
ng/μl	nanogramos por microlitro

NH₃	amoníaco
NH₄⁺	amonio
nif	genes de fijación de nitrógeno
nm	nanómetros
Nº	número
NO₂	óxido nitroso
NO₃⁻	nitrato
N.S.	no significativo
O₂	oxígeno
OGM	organismo genéticamente modificado
ohm	ohmio
P/V	peso en volumen
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PF-5	<i>Pseudomonas protegens</i> Pf-5
PF-5 X940	<i>Pseudomonas protegens</i> Pf-5 X940
PGPR	promotores del crecimiento vegetal
ppm	partes por millón
rpm	revoluciones por minuto
RT-qPCR	reacción en cadena de la polimerasa retrotranscriptasa en tiempo real
seg	segundos
SEM	error estándar de la media
TAE	buffer Tris-Acético-EDTA
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
U	unidades
UFC	unidades formadoras de colonias

UFC/g	unidades formadoras de colonias por gramo
UFC/ml	unidades formadoras de colonias por mililitro
UV	Ultravioleta
V/V	volumen en volumen
VFe-proteína	vanadio hierro nitrogenasa
μF	Microfaradio
μg	Microgramos
μg/ μl	microgramos por microlitro
μg/ml	microgramos por mililitro
μjoule/cm²	microjoule por centímetro cuadrado
μl	Microlitros
μM	Micromolar
μmol m⁻² seg⁻¹	micromoles por metro cuadrado por segundo

RESUMEN

Estudio de Estrategias Alternativas de Ingeniería Genética para Incrementar la Fijación Biológica de Nitrógeno Atmosférico

Para satisfacer los altos rendimientos que impulsan la agricultura moderna la aplicación de fertilizantes nitrogenados ha sido fundamental. Dado que la base de la producción industrial de los fertilizantes químicos esta basado en el uso de combustibles fósiles, estos, actualmente, incrementan el costo económico debido a la disminución constante de las reservas de petróleo. Además, dada la baja eficiencia en el uso del fertilizante aplicado por parte de las plantas y el alto impacto ambiental debido a la emisión de óxido nitroso, resulta necesario emprender la búsqueda de nuevas estrategias para aumentar la concentración del nitrógeno fijado. Una de las propuestas para disminuir la aplicación de fertilizantes es el uso de microorganismos fijadores de nitrógeno; que ya son ampliamente utilizados en leguminosas por su capacidad de establecer asociaciones simbióticas; las cuales, lamentablemente, aún no han sido encontradas entre los principales cultivos de cereales. El objetivo del presente trabajo es la producción de una técnica de ingeniería genética que permita obtener bacterias fijadoras de nitrógeno recombinantes capaces de asociarse a distintos cultivos vegetales incrementando la productividad de los mismos. Para ello, los genes que sintetizan la nitrogenasa (*nif*), que están co-localizados en una isla genómica, en *Pseudomonas stutzeri* A1501 se transfirieron, vía el cósmido recombinante X940, a un promotor del crecimiento vegetal, *Pseudomonas protegens* Pf-5. La bacteria recombinante obtenida, *P. protegens* Pf-5 X940, fue capaz de crecer en medios de cultivo deficientes en nitrógeno o con el agregado de amonio; mostró una alta actividad nitrogenasa, liberando al medio de cultivo cantidades significativas de amonio y presentó expresión de los genes *nif*, sugiriendo que el proceso de fijación, en esta bacteria, es constitutivo. Las inoculaciones de especies vegetales (arabidopsis, alfalfa, festuca alta y maíz) con Pf-5 X940 aumentaron la concentración de amonio en el suelo y la productividad de las plantas en condiciones deficientes de nitrógeno. Estos resultados inician un nuevo camino hacia la producción efectiva de inoculantes recombinantes para la fijación de nitrógeno en un amplio rango de cultivos.

Palabras claves: fijación de nitrógeno, transferencia horizontal, *Pseudomonas protegens*, *Pseudomonas stutzeri*, genes *nif*, microorganismos diazotrófos, promotores del crecimiento vegetal, inoculantes.

ABSTRACT

Engineering *Pseudomonas* for nitrogen fixation and its application to improve plant growth

Nitrogen fertilizer application is an essential input for crop productivity in most regions of the world. Reduction or elimination of this application will attenuate our dependence on fossil fuels as they are necessary for the production of nitrogen fertilizer. Both from health and environmental perspectives, the quality of ground water is adversely affected by nitrogen fertilization. An alternative to application of nitrogen fertilizers is the use of biological nitrogen fixation. Many strains of nitrogen-fixing can form symbiotic associations with legumes, providing the host with nitrogen-rich compounds. Unfortunately, this type of symbiosis is not observed in the most economically important crops. The aim of this work is to obtain a recombinant nitrogen fixing bacteria, capable to associate with different crops for increasing their productivity. A plant growth promoting microorganism, *Pseudomonas protegens* Pf-5 was genetically modified to fix nitrogen using the genes encoding the nitrogenase (*nif*) of *Pseudomonas stutzeri* A1501. These genes are co-localized in a genomic island. The transfer was carried via the X940 recombinant cosmid. *P. protegens* Pf-5 X940 was able to grow in medium without nitrogen, displayed high nitrogenase activity and released significant quantities of ammonium to the medium. *P. protegens* Pf-5 X940 also showed constitutive expression and enzymatic activity of nitrogenase in ammonium medium or in nitrogen-free medium, suggesting a constitutive nitrogen fixation. Interestingly, inoculation of arabidopsis, alfalfa, tall fescue and maize with Pf-5 X940 increased the ammonium concentration in soil and plant productivity under nitrogen-deficient conditions. In conclusion, these results would open the way to the production of effective recombinant inoculants for nitrogen fixation on a wide range of crops.

Keywords: nitrogen fixation, horizontal transfer, *Pseudomonas protegens*, *Pseudomonas stutzeri*, *nif* gene, diazotrophics microorganisms, plant growth promoting microorganism, inoculants.

Capítulo I

Introducción

CAPÍTULO 1

1. Introducción

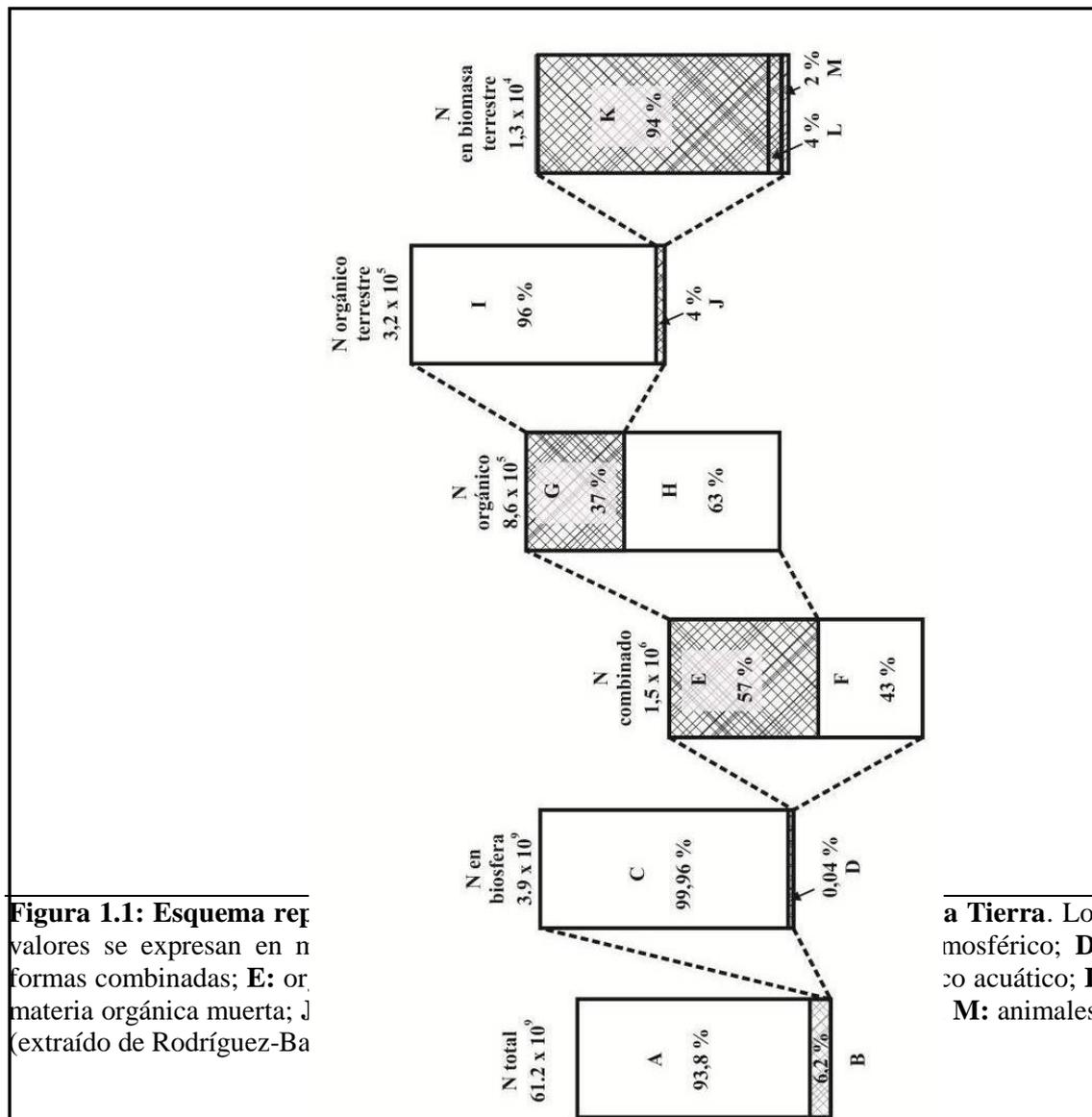
1.1- El Nitrógeno: elemento fundamental para la vida

El nitrógeno es uno de los elementos más abundantes de la Tierra pero tan solo una pequeña proporción (6 %) forma parte de la biosfera. El nitrógeno se encuentra mayormente en estado gaseoso (99,6 %) constituyendo los gases que componen la atmósfera; de esta forma solo una pequeña porción del nitrógeno total (0,4 %) esta presente como componente del agua, el suelo y los seres vivos (Fig. 1.1). En estos últimos, el nitrógeno, es uno de los nutrientes que limita el desarrollo y el crecimiento, ya que se trata del cuarto elemento más abundante, siendo el componente esencial de aminoácidos, ácidos nucleicos, hormonas y otros metabolitos (Sheppard & Wallander, 2004). A pesar de estar inmersos en una atmósfera en la que el nitrógeno dimolecular (N_2) es el componente mayoritario (78 %), este resulta relativamente inerte e inaprovechable para la mayoría de los seres vivos (Ogunseitán, O., 2005) dado que, no todos los organismos poseen la capacidad de catalizar la reducción del enlace triple covalente, excepcionalmente estable, presente en la molécula del nitrógeno gaseoso; solamente algunos microorganismos poseen la capacidad de hacerlo. En la naturaleza, el nitrógeno atraviesa cambios cíclicos por los cuales pasa del estado inorgánico al orgánico y viceversa logrando que este elemento se encuentre biodisponible para el resto de los seres vivos (Fig. 1.2). Este proceso, a través del cual el componente biótico de la tierra es activamente reciclado, se conoce como “ciclo biogeoquímico” en el cual ocurren cuatro procesos fundamentales: amonificación, fijación, nitrificación y denitrificación. Estos procesos están mediados principalmente por microorganismos pertenecientes a los dominios *Bacteria*, *Archaea* (Taiz & Zeiger, 2006; Hopkins & Hüner, 2009).

Las formas inorgánicas generadas a lo largo del ciclo, como nitratos (NO_3^-) y amonios (NH_4^+) presentes en el suelo, son la fuente principal de nitrógeno de las plantas, eslabón fundamental de la cadena alimenticia, ya que ellas, tanto directa como indirectamente, son la fuente del nitrógeno orgánico utilizado por los animales y el hombre.

1.2- Aspectos económicos y ecológicos del uso de fertilizantes nitrogenados en la agricultura

Para las plantas superiores, luego del agua, el nitrógeno es el principal limitante en el desarrollo vegetal, el cual es incorporado desde el suelo en formas combinadas, ya sea como NO_3^- o como NH_4^+ . Lamentablemente, el *pool* de nitrógeno del suelo se ve constantemente afectado, tanto por procesos naturales como antropológicos a través de los cuales, es continuamente removido ya sea por la inmovilización, la lixiviación, la volatilización del amonio, la denitrificación biológica, las extracciones por la cosecha y la erosión (Palma & Segat, 2000). Por esta razón, el mejoramiento del manejo del contenido de nitrógeno, es crucial para incrementar la productividad y la sustentabilidad económica (Shah *et al.*, 2003) y de esta manera satisfacer las demandas dadas por el aumento constante de la población mundial (Dyson, T., 1999).



Durante la llamada “Revolución Verde” (1940 – 1970), una de las principales estrategias utilizadas en la agricultura mundial, que dio lugar a un gran aumento en la producción de granos de cereales, fue el desarrollo y la aplicación de fertilizantes químicos, así como también el desarrollo de genotipos de plantas altamente sensibles a estos (Boddey *et al.*, 1995). Este tipo de práctica conlleva un alto costo energético ya que los procesos industriales para la producción de fertilizantes están basados en el uso de combustibles fósiles.

La síntesis de fertilizantes nitrogenados, demanda seis veces más energía que la necesaria para producir aquellos fosforados o potásicos (Gomes Da Silva *et al.*, 1978), consume aproximadamente el 50 % del combustible usado en la agricultura (Ferguson *et al.*, 2010), lo cual representa entre 1-2 % del consumo de la energía mundial (Jensen *et al.*, 2012). Se calcula que la fijación industrial del nitrógeno (FIN) para la producción de una tonelada de amonio por el método de Haber-Bosch demanda una tonelada de petróleo o 1000 cm^3 de gas natural (Maddonni *et al.*, 2003). A nivel mundial, la

División de estadística de la *Food and Agriculture Organization* (FAO) (2013) registró que el consumo de fertilizantes nitrogenados por hectárea de tierra cultivable tuvo un aumento de aproximadamente 10 kg/ha entre el 2002 y el 2009 (Fig. 1.3). A su vez la FAO (2011) estima un incremento en la demanda de fertilizantes nitrogenados que va desde 105,3 millones de toneladas en el 2011 hasta 112,9 millones de toneladas en el 2015.

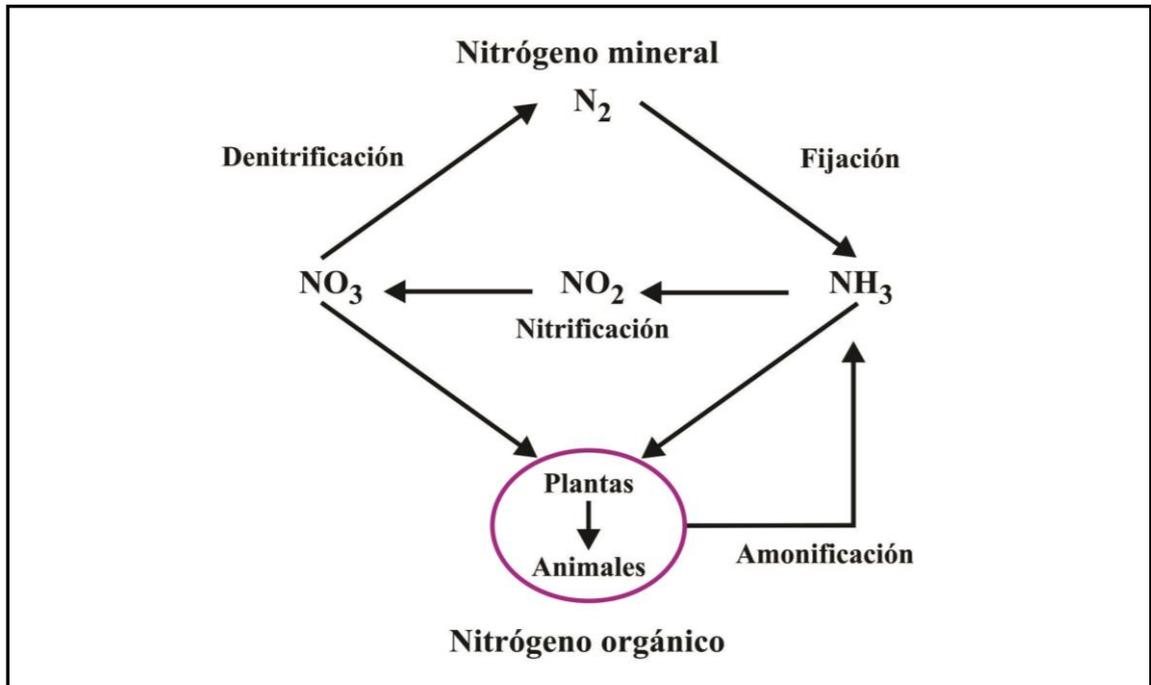


Figura 1.2: Representación esquemática del ciclo biogeoquímico del nitrógeno (extraído de Elmerich *et al.*, 2007).

Sumado al consumo de recursos no renovables, el uso de fertilizantes químicos nitrogenados contribuye al cambio climático global al producir un desbalance del ciclo biogeoquímico del nitrógeno que está dado por un incremento en las emisiones de óxido nitroso (NO_2) (Ogunseitán, O., 2005) (Fig. 1.2), siendo este último, uno de los componentes de los gases de efecto invernadero. Se considera que la agricultura es la segunda industria productora de gases invernaderos, con una producción del 68 % de NO_2 y del 13,5 % de dióxido de carbono (CO_2) liberado a la atmósfera (Jensen *et al.*, 2012). El uso de fertilizantes químicos contribuye tanto a la acidificación de los suelos y a la eutroficación de las aguas subterráneas, como a la pérdida de la biodiversidad de los microorganismos fijadores (Triplett, E., 1996; Dixon & Kahn, 2004).

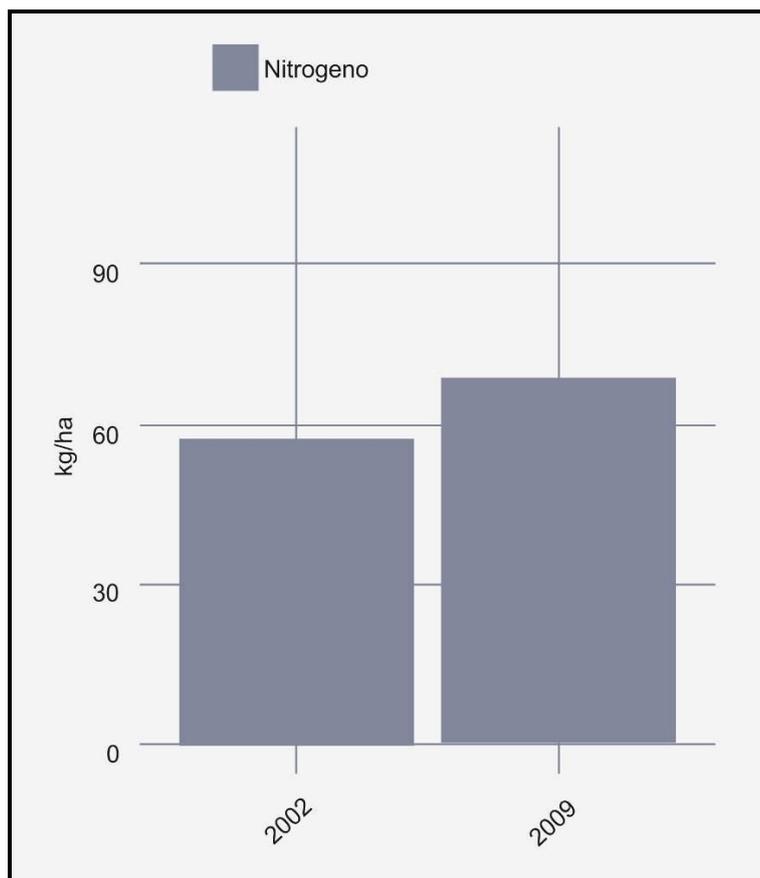


Figura 1.3: Consumo de fertilizantes nitrogenados por hectárea (ha) de tierra cultivable (2002 y 2009) (extraído de *Food and Agriculture Organization*, 2013).

El agotamiento progresivo de las reservas de petróleo, el aumento de los costos de producción, desde 1999 se registró un aumento >350 % (Commission of the European Communities, 2008), la baja eficiencia de los fertilizantes químicos nitrogenados, dado que, entre el 30-50 % de lo aplicado se pierde por lixiviación (Ferguson *et al.*, 2010) y el impacto ambiental que conlleva el uso de éstos, ha impulsado la búsqueda de fuentes complementarias y alternativas que permitan incrementar los niveles de nitrógeno en los suelos. Una de las estrategias propuestas para aumentar la concentración de nitrógeno en los suelos es a través de la fijación biológica del nitrógeno (FBN), la misma no implica el uso de combustibles fósiles, las emisiones de NO_2 por fijación son mucho menores que las producidas por los fertilizantes; el nitrógeno fijado es menos susceptible a la lixiviación y a la volatilización por lo tanto, su uso es mucho más eficiente dado que, el 60 % del nitrógeno fijado queda biodisponible en los suelos (Jensen *et al.*, 2012). Y además, permite ser utilizado *in situ* (Dixon & Kahn, 2004).

1.3- Fijación biológica del nitrógeno

La fijación biológica del nitrógeno es el proceso por el cual el nitrógeno atmosférico es reducido por microorganismos y se hace biodisponible para la biósfera como amonio (NH_4^+) (Peters & Szilagyi, 2006), siendo esta la fuente principal de nitrógeno para el suelo (Newton, W., 2007).

Aquellos organismos con la capacidad de fijar nitrógeno reciben el nombre de diazótrofos, los cuales se caracterizan por poseer un complejo metalo enzimático denominado nitrogenasa que reduce el triple enlace covalente de la molécula de nitrógeno gaseoso en amonio para lo cual consume 16 moléculas de ATPs por cada molécula de nitrógeno fijada.

Hasta el momento, todos los seres vivos en los cuales se ha descrito esta capacidad de reducir el nitrógeno gaseoso son microorganismos pertenecientes principalmente al dominio *Bacteria*, aunque también se observó en unos pocos *phyla* del dominio *Archaea* (Dos Santos *et al.*, 2012) (Fig. 1.4). La presencia de este complejo nitrogenasa en diversos grupos, de estos dominios, sugiere que los genes que codifican para este sistema enzimático se movilizaron a través de la transferencia horizontal (Raymond *et al.*, 2004; Kechris *et al.*, 2006). La transferencia horizontal ha sido descrita como el principal mecanismo evolutivo en la naturaleza dentro del dominio *Bacteria* (Frost *et al.*, 2005). Sin embargo, solo una pequeña proporción de ADN adquirido mediante este mecanismo es fijado, es decir, permanece en las siguientes generaciones (Dobrindt *et al.*, 2004). Para que dicha fijación ocurra es necesario que el ADN foráneo incremente el *fitness* de la célula huésped (Hacker & Carniel, 2001). A su vez, para que esto ocurra los genes presentes en este bloque de ADN deben expresarse. En este caso en particular, la disponibilidad de un complejo nitrogenasa le permitiría crecer a los microorganismos diazótrofos en condiciones de deficiencia de nitrógeno, incrementado su versatilidad para colonizar nichos pobres en nutrientes.

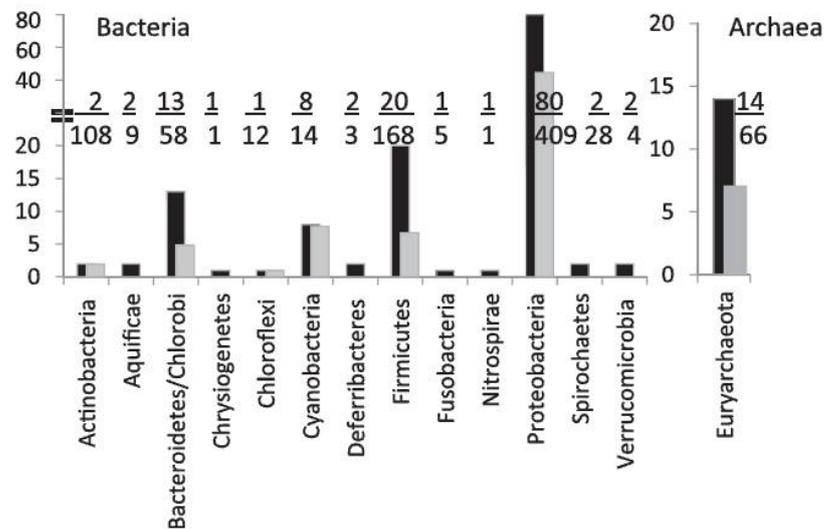


Figura 1.4: Diversidad taxonómica entre especies fijadoras de nitrógeno: Se realizó una predicción computacional a través de la evaluación de la presencia de seis genes esenciales para la fijación de nitrógeno que codifican componentes estructurales (NifHDK) y de biosíntesis (NifENB) en especies con genomas totalmente secuenciados (999 *Bacteria* y 93 *Archaea*). Se muestra la distribución taxonómica por *phylum* de las especies diazotróficas basándose en la evidencia experimental (barras grises) y en la predicción *in silico* de la fijación de nitrógeno (barras negras). Se indica la relación del número de especies propuestas en comparación con el número total de especies diferentes con genomas secuenciados dentro de cada *phylum* (extraído de Dos Santos *et al.*, 2012).

La transferencia del complejo nitrogenasa entre distintas especies de microorganismos ha sido sugerida en base a árboles filogenéticos de los genes responsables de la fijación (*nif*) que han sido incongruentes con los datos de ARNr 16S (Raymond *et al.*, 2004; Kerchis *et al.*, 2006; Latysheva *et al.*, 2012) y por la localización de los genes *nif* en elementos genéticos móviles, tales como megaplásmidos e islas genómicas. Las islas genómicas son bloques de ADN con un tamaño igual o superior a 10 kb con una estructura tipo mosaico generalmente flanqueadas por secuencias repetidas directas (Ayub, N., 2008). Dado su extenso tamaño, las islas genómicas tienen la capacidad de contener todos los genes necesarios para la biosíntesis y funcionamiento de un complejo nitrogenasa (Yan *et al.*, 2008).

Los diazótrofos son clasificados usualmente en base a la forma de vida: **1- vida libre**, se caracterizan por no encontrarse asociados a un huésped, generalmente el nitrógeno fijado es utilizado para su propio beneficio, no son considerados de importancia agronómica, pero si lo son para la ciencia por su facilidad de cultivo *in vitro*, el cual permite el estudio del complejo nitrogenasa que virtualmente sería idéntico al de diazótrofos simbióticos de importancia en la agricultura (Newton, W., 2007); **2- asociación simbiótica**, son aquellos con la capacidad de infectar y generar una nueva estructura especializada, denominada nódulo, a partir de la transformación de las células vegetales en las raíces de las plantas, que luego colonizan y en la cual fijan el nitrógeno que proveen a la planta huésped, a su vez, la planta huésped le brinda a la bacteria simbiote protección y la provee de los hidratos de carbonos necesarios para su crecimiento; **3- asociación no simbiótica o libre**, en este grupo se encuentran aquellos diazótrofos de vida libre que crecen bajo la influencia directa del huésped con el cual establecen una relación protooperativa, intercambian algunos nutrientes pero no forman estructuras diferenciales, la relación es más casual que cooperativa (Dalton & Kramer, 2006). Respecto al grado de asociación con la planta huésped se diferencian dos grupos: los rizoféricos y los endófitos⁽¹⁾. Estos últimos, se caracterizan principalmente por no poder persistir en el suelo (Franche *et al.*, 2009) y por la capacidad de colonizar el interior de los tejidos vegetales sin causar ningún daño aparente para el huésped (Van Dommelen & Vanderleyden, 2007).

En el Cuadro 1.1 se citan ejemplos de cada una de las formas de vida, se incluye la ubicación taxonómica a fin de mostrar la gran diversidad que poseen y el huésped más frecuente en el caso de aquellos fijadores de asociación simbiótica o libre. p. ej. *Azotobacter chroococcum* y *Dreuxia gummosa* (Newton, W., 2007; Kim & Gadd, 2008). La fijación del nitrógeno ocurre en varios contextos metabólicos (Cuadro 1.1) a pesar que el complejo nitrogenasa es inactivado irreversiblemente por el oxígeno molecular (O₂) (Dalton & Mortenson, 1972; Dalton & Kramer, 2006). Los diazótrofos desarrollaron diferentes estrategias para proteger al complejo nitrogenasa, ya sea a través de: **1-** una barrera física que limite el contacto con el O₂, p. ej. la corteza externa del nódulo de los rizobios⁽²⁾; **2-** proteínas de unión al O₂, la leghemoglobina, la cual posee una estructura y función similar a la hemoglobina animal; y disminuyen la

⁽¹⁾ Lodewyckx y colaboradores (2002) proponen que el término endófito debería ampliar su definición para incluir en ella a los microorganismos rizoféricos.

⁽²⁾ Rizobios: término que se utiliza para mencionar a los microorganismos pertenecientes a diversos géneros (p. ej. *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y *Azorhizobium*) del subphylum α -Proteobacteria.

concentración efectiva del O₂ sin alterar la disponibilidad del mismo para la respiración celular; **3-** incrementando la afinidad de la oxidasa terminal p. ej. *Azotobacter vinelandii*; **4-** en los microorganismos fotosintéticos a través de una separación espacial o temporal de los procesos de fijación de nitrógeno y fotosíntesis, p. ej. cianobacterias simbióticas (*Anabaena* y *Nostoc*) desarrollan a partir de sus células vegetativas filamentos, heterocistos, en los cuales se aloja la nitrogenasa y pierden el fotosistema II para protegerse del O₂ que este produce. En cambio, en las cianobacterias unicelulares (*Gloeocapsa*) la actividad nitrogenasa se produce durante el máximo período de división celular durante el cual los niveles de O₂ producidos por el fotosistema II son aún muy bajos; **5-** cambios reversibles en la estructura del complejo nitrogenasa, que protegen los sitios sensibles de la enzima ante niveles de O₂ elevados.

Cuadro 1.1: Microorganismos diazótrofos: En el cuadro se presentan ejemplos de microorganismos diazótrofos, la forma de vida, ubicación taxonómica y la planta huésped más frecuente para aquellos de asociación simbiótica o libre.

Forma de Vida	Ubicación Taxonómica		Metabolismo	Ejemplos *	
Vida Libre	B a c t e r i a	Proteobacteria	α	Aeróbico	<i>Azospirillum lipoferum</i>
					<i>Beijerinckia indica</i>
					<i>Methylosinus trichosporium</i>
				Anaerobio	<i>Rhodospseudomonas viridis</i>
					<i>Rhodospirillum rubrum</i>
			β	Aeróbico	<i>Azoarcus buckelii</i> , <i>A. evansii</i> , <i>A. toluclasticus</i> , <i>A. toluvarans</i>
					<i>Derrxia gummosa</i>
					<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>
			γ	Aeróbico	<i>Azotobacter paspali</i> , <i>A. vinelandii</i>
				Anaerobio	<i>Allochromatium vinosum</i>
		Facultativo		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
		δ	Anaerobio	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	
			Cyanobacteria	Aeróbico	<i>Anabaena</i> sp. PCC7120
					<i>Gloeocapsa</i> sp.
			Actinobacteria	Aeróbico	<i>Mycobacterium flavum</i>
Firmicutes	Anaerobio	<i>Clostridium pasteurianum</i>			
		<i>Desulfotomaculum ruminis</i>			
		<i>Helibacterium chlorum</i>			
Facultativo	<i>Bacillus polymyxa</i>				
Archaea	Anaerobio	<i>Methanococcus maripaludis</i> , <i>Methanococcus</i> sp.			
		<i>Methanosarcina barkeri</i> 227			
	Facultativo	<i>Halobacterium halobium</i>			

continuación cuadro

Asociación Simbiótica	B a c t e r i a	Proteobacteria	α	Aeróbico	<i>Azorhizobium caulinodans</i> (<i>Sesbania</i> sp.)
					<i>Bradyrhizobium</i> sp. (<i>Fabaceae</i> , <i>Parasponia</i>)
					<i>Ensifer</i> sp. (<i>Lotus</i> sp.)
					<i>Mesorhizobium</i> sp. (<i>Parasponia</i> sp.), <i>M. loti</i> (<i>Lotus japonicus</i>)
					<i>Photorhizobium</i> sp. (<i>Aeschemomene</i> sp., <i>Pisum sativum</i>)
					<i>Rhizobium</i> sp. (<i>Fabaceae</i> , <i>Parasponia</i> sp.)
		<i>Sinorhizobium</i> sp. (<i>Fabaceae</i>)			
		Cyanobacteria	Aeróbico	<i>Anabaena azollae</i> (<i>Azolla</i>)	
				<i>Calothrix</i> sp. (<i>Cycadaceae</i>)	
		Actinobacteria	Aeróbico	<i>Streptomyces thermoautotrophicus</i> (<i>Alnus</i> sp.)	
Facultativo	<i>Frankia alni</i> (<i>Alnus</i> sp. - <i>Casuarinas</i> sp.)				
Asociación libre (incluye Endófitos)	B a c t e r i a	Proteobacteria	α	Aeróbico	<i>Azospirillum</i> sp. (<i>Digitaria</i> sp., <i>Paspalum</i> sp., <i>Zea mays</i>)
				Facultativo	<i>Glucanacetobacter diazotrophicus</i> (<i>Saccharum officinarum</i>)
			β	Aeróbico	<i>Azoarcus indigens</i> , <i>A. communis</i> (<i>Leptochloa fusca</i>)
				Facultativo	<i>Burkholderia brasilensis</i> , <i>B. cepacia</i> , <i>B. tropicalis</i> (<i>Musa</i> sp., <i>Ananas comosus</i>), <i>H. lusitanum</i> (<i>Phaseolus vulgaris</i>)
			γ	Aeróbico	<i>Pseudomonas stutzeri</i> A15 (<i>Capparis spinosa</i> , <i>Oryza sativa</i> , <i>Sorghum</i> sp.)
				Facultativo	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>K. planticola</i> (<i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Oryza sativa</i> , <i>Triticum aestivum</i>)
		<i>Serratia marcescens</i> (<i>Oryza</i> sp.)			
		<i>Pantoea agglomerans</i> (<i>Gossypium</i> sp., <i>Triticum</i> sp., <i>Zea mays</i>)			

*Entre paréntesis se presentan las especies vegetales huéspedes más comunes.

Nota: Algunos microorganismos pueden ser considerados tanto de vida libre como de asociación no simbiótica dado que la distinción entre estos dos grupos aún no es clara (Dalton & Kramer, 2006).

Actualmente, en la agricultura, los microorganismos fijadores de nitrógeno de asociación simbiótica (rizobios) son ampliamente usados para satisfacer la demanda de nitrógeno en la producción de leguminosas (alfalfa, soja, trébol, etc.), permitiendo disminuir el uso de fertilizantes nitrogenados. Sin embargo, este tipo de asociación simbiótica no se observa entre los cultivos más importantes para la nutrición de la población mundial; arroz, maíz y trigo, especies pertenecientes a la familia de las *Poaceae* (ex *Gramineaceae*). Estas especies se caracterizan por poseer los mayores requerimientos de nitrógeno para obtener una producción óptima (Gutiérrez-Zamora & Martínez-Romero, 2001), pero no forman naturalmente estructuras simbióticas especializadas, a diferencia de las leguminosas (Van Dommelen & Vanderleyden,

2007). En estas especies se han encontrado algunos diazótrofos endófitos, y los más estudiados hasta el momento son: *Glucanacetobacter diazotrophicus*, endófito de caña de azúcar (*Saccharum sp.*) (Triplett, E., 2007); *Azoarcus sp.*, endófito de raíces de *kallar grass* (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth) (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993) y *Azospirillum sp.*, descrito como un endófito facultativo por tener la capacidad de habitar en el tejido vegetal o en la rizósfera de distintas especies (Dalton & Kramer, 2006).

A partir de las evidencias encontradas entre las principales especies de cultivo de la familia de Poáceas y de la gran diversidad de diazótrofos descrita hasta el momento (Triplett, E., 1996; Chelius & Triplett, 2001), la búsqueda de nuevos inoculantes se ha conducido entre aquellos de asociación libre (rizósfericos y/o endófitos). Si bien las inoculaciones realizadas tanto a campo como en invernáculo demuestran que estos diazótrofos son capaces de fijar nitrógeno en la rizósfera y promover eficazmente el crecimiento (Baldani *et al.*, 1983; James, E., 2000; Gutiérrez-Zamora & Martínez-Romero, 2001; Riggs *et al.*, 2001), el rendimiento potencial y por lo tanto, el posible impacto económico resulta limitado (Triplett, E., 1996).

1.4- Producción de nuevos diazótrofos mediante ingeniería genética

En la búsqueda de nuevas tecnologías que permitan disminuir o reemplazar el uso de fertilizantes químicos nitrogenados, una de las posibles herramientas a utilizar es la ingeniería genética para la obtención de organismos genéticamente modificados (OGM). La primera referencia del uso de la mencionada herramienta en microorganismos diazótrofos data del año 1971 cuando Dixon y Postgate transfieren por conjugación los genes *nif*, responsables de la síntesis del complejo nitrogenasa, de la cepa *Klebsiella pneumoniae* M5a1 (*nif*+) a mutantes que perdieron la capacidad de fijar nitrógeno (*nif*-); a pesar de observarse una muy baja frecuencia de recombinación se obtuvieron células capaces de expresar dicho complejo. Paralelamente, en ese mismo año, Streicher y colaboradores (1971) logran la transferencia de los genes *nif* a estas mismas mutantes pero, en este caso, por transducción a través del fago P1. Un año después, Dixon y Postgate (1972) realizan la primera transferencia por conjugación entre cepas de diferentes géneros, de una cepa fijadora de nitrógeno (*K. pneumoniae* M5a1) a una que naturalmente no tiene esta capacidad (*Escherichia coli* C603); si bien la frecuencia de recombinación fue muy baja se corroboró empíricamente la fijación de nitrógeno en las colonias de *E. coli* cuantificando actividad nitrogenasa. A pesar del éxito obtenido, la técnica empleada está limitada a cierto rango de huéspedes de factores sexuales determinados, fagos de transducción y similitud en la homología de la secuencia de nucleótidos entre el cromosoma dador y el receptor, razón por la cual, proponen la construcción de un plásmido que facilite la transferencia. En 1976, Dixon y colaboradores publicaron la construcción del plásmido propuesto. Se trataba de un plásmido conjugativo P (RP41) que porta los genes *nif* de *K. pneumoniae*, el cual posee un amplio rango de huéspedes y es transmisible a muchas bacterias Gram - negativas p. ej.: *Agrobacterium tumefaciens* 544, *Rhizobium meliloti* A1, *Azotobacter vinelandii* (*nif*-), siendo esta la primera referencia de la transferencia intergénica de un microorganismo anaeróbico estricto a uno aeróbico sin afectar la funcionalidad del complejo nitrogenasa (Cannon & Postgate, 1976); también fue transferido a: *Salmonella typhimurium*

(Postgate & Krishnapillai, 1977), *Pseudomonas fluorescens* cepa 6.2 – biotipo IV, primer transferencia con éxito al género *Pseudomonas*, ya que Dixon y colaboradores (1976) informan que la transferencia no fue posible en *P. aeruginosa*. Años más tarde, coincidiendo con lo reportado por Mergeay y Gerits (1978), se logran transferir los genes *nif* de *K. pneumoniae* a *P. putida* MT20-3 (Postgate & Kent, 1987) siendo esta, una evidencia inequívoca que los genes *nif* de *K. pneumoniae* pueden ser expresados funcionalmente en un microorganismo aeróbico obligado tal como, el género *Pseudomonas*. También, ese mismo año, Martínez y colaboradores (1987) describen la transferencia de los genes que controlan la nodulación, el rango de especificidad del huésped y la fijación de nitrógeno desde un microorganismo simbiote, *Rhizobium phaseoli* CFN299, a uno no simbiote, *A. tumefaciens* GMI9023, obteniendo células recombinantes que inducen la formación de nódulos y tienen la capacidad de reducir acetileno. Años después, Sullivan & Ronson (1998), luego de observar que la diversidad genética de los simbiotes surgía por transferencia horizontal de los elementos simbióticos ubicados en el cromosoma de las cepas de *Mesorhizobium loti* utilizadas como inoculantes hacia cepas no simbiotes presentes en la rizósfera (Sullivan *et al.*, 1995; Sullivan *et al.*, 1996); transfirieron dichos elementos (500 kb) a tres cepas no simbióticas por conjugación dentro del gen *phe-tRNA* que codifica una integrasa de la familia del fago P4.

A pesar del éxito en la transferencia del complejo nitrogenasa entre organismos, los diazótrofos recombinantes obtenidos presentaban una actividad nitrogenasa baja, por lo cual, mostraban poca aptitud para ser utilizados como inoculantes comerciales. Más aún, por tratarse de trabajos previos a la era de la secuenciación de los genomas, la ausencia de genes *nif* en las cepas receptoras (no fijadoras de nitrógeno) no puede ser descartada. De esta forma, la transferencia de un complejo nitrogenasa completo y funcional entre distintas especies no fue corroborada empíricamente en trabajos previos a la presente tesis doctoral.

1.5- Objetivos e Hipótesis

El objetivo general de la presente tesis es contribuir al desarrollo de herramientas novedosas para incrementar la productividad de cultivos en condiciones restrictivas de nitrógeno, a partir de la producción de una técnica específica de ingeniería genética que permita obtener bacterias fijadoras de nitrógeno recombinantes. Para llevar a cabo este objetivo, se seleccionaron cepas del género *Pseudomonas*. La fijación de nitrógeno es una característica poco común en este género bacteriano (Anzai *et al.*, 2000), sin embargo, se han reportado algunas cepas de *Pseudomonas* diazótrofes tales como *P. stutzeri* A1501 (Yan *et al.*, 2008) y *P. stutzeri* DSM4166 (Yu *et al.*, 2011), las cuales adquirieron los genes codificantes del complejo nitrogenasa por transferencia horizontal. A diferencia de otras especies de diazótrofos, estas cepas del género *Pseudomonas* que adquirieron recientemente la capacidad de fijar nitrógeno tienen los genes *nif* co-localizados en su genoma dentro de islas genómicas.

Las islas contienen todos los genes necesarios para la expresión del complejo nitrogenasa funcional en una región relativamente pequeña. Como se describirá con mayor detalle en el siguiente capítulo, este alto grado de empaquetamiento de la isla de

fijación de nitrógeno de la cepa *P. stutzeri* A1501 resulto esencial para el clonado y transferencia del complejo nitrogenasa entre distintas cepas del género *Pseudomonas*.

Por otro lado, como cepa receptora se eligió *Pseudomonas protegens* Pf-5, la cual vive en la rizósfera de una amplia variedad de especies vegetales, que es capaz de sobrevivir y competir con la microflora del suelo y además es utilizada como agente de control biológico por su capacidad de producir factores del crecimiento vegetal y péptidos antimicrobianos (Paulsen *et al.*, 2005; Mavrodi *et al.*, 2009). La elección del uso del género *Pseudomonas* para obtener un microorganismo capaz de incrementar la productividad de los cultivos de mayor importancia económica fue alentada por tratarse del género dominante en la asociación con cereales (Krotzky & Werner, 1987).

Surgen así, las siguientes hipótesis:

- 1- Los genes *nif*, responsables de la síntesis del complejo nitrogenasa de *Pseudomonas stutzeri* A1501, que se encuentran co-localizados en la isla genómica, pueden ser transferidos a la cepa *Pseudomonas protegens* Pf-5 por ingeniería genética y la cepa recombinante que se obtuvo será capaz de expresar un complejo nitrogenasa funcional.
- 2- La inoculación de plantas con *Pseudomonas protegens* Pf-5 recombinante expresando el complejo nitrogenasa de *Pseudomonas stutzeri* A1501 incrementa la productividad de dichas especies en suelos deficientes en nitrógeno.

Para poner a prueba las hipótesis planteadas se abordarán los siguientes objetivos específicos:

- ✓ Transferir los genes *nif*, responsables de la fijación de nitrógeno, que se encuentran co-localizados en una isla genómica de *P. stutzeri* A1501, a través de un cósmido recombinante a *P. protegens* Pf-5.
- ✓ Estudiar la fisiología de la bacteria *P. protegens* Pf-5 recombinante. Evaluar el crecimiento y la actividad nitrogenasa de esta cepa en medios semi-sintéticos con alta y baja disponibilidad de nitrógeno bajo distintas condiciones de aireación.
- ✓ Estudiar la regulación de los genes *nif* en *P. protegens* Pf-5 recombinante. Analizar la expresión de los genes *nif* (mediante RT-PCR en tiempo real) en las condiciones de crecimiento descritas en el punto anterior, y la relación de la información molecular - fisiológica.

- ✓ Evaluar el efecto de la inoculación de especies vegetales con la cepa *P. protegens* Pf-5 recombinante. Inocular plantas de monocotiledóneas: festuca alta (*Festuca arundinacea*) y maíz (*Zea mays*); y las dicotiledóneas, alfalfa (*Medicago sativa*) y arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), crecidas con alta y baja disponibilidad de nitrógeno.

- ✓ Evaluar la persistencia de *P. protegens* Pf-5 X940 en el suelo.

1.6- Glosario

Amonificación: formación de compuestos amoniacales por catabolismo de la materia orgánica del suelo realizada por microorganismos (bacterias y hongos) heterotrófos no especializados.

Denitrificación: proceso de reducción bioquímica a través del cual el nitrato del suelo vuelve a la atmósfera como óxido de dinitrógeno (óxido nitroso) y nitrógeno molecular. Es realizado por microorganismos anaerobios facultativos principalmente de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*.

Eutroficación de las aguas: la entrada excesiva de nutrientes tales como nitrógeno y fósforo en los sistemas acuáticos por la escorrentía de fertilizantes produce un impacto negativo por agotamiento del O₂ disuelto necesario para mantener el crecimiento de los organismos vivos (Ogunseitan, O., 2005).

Gases del Efecto Invernadero: gases liberados a la atmósfera tales como dióxido de carbono, óxido nitroso, metano, etc. que al aumentar su concentración producen un efecto climático debido al incremento de la temperatura.

Nitrificación: oxidación del amonio a nitrato, es realizada en dos etapas por distintos microorganismos quimiotrofos. La primera etapa es realizada por bacterias nitrificadoras de los géneros *Nitrosoma*, *Nitrococcus* y *Nitrosospira*, en la cual el amoníaco es oxidado a nitrito. La segunda etapa es realizada por bacterias nitrificadoras del género *Nitrobacter* que convierten el nitrito en nitrato.

Capítulo II

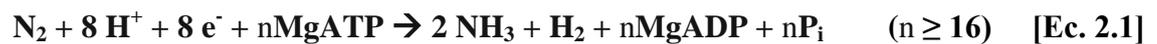
Producción de cepas de *Pseudomonas*
recombinantes fijadoras de nitrógeno por
ingeniería genética

CAPÍTULO 2

2.1- Introducción

2.1.1- Fisiología, bioquímica y biología molecular de la fijación biológica del nitrógeno

La fijación biológica del nitrógeno es el proceso por el cual el nitrógeno molecular (N_2), componente fundamental para la vida pero inerte para la mayoría de los seres vivos, es reducido por microorganismos y se convierte en una forma biodisponible para los mismos, amonio (NH_4^+) [Ecuación 2.1] (Halbleib & Ludden, 2000).



Para que esta reacción sea catalizada por seres vivos, se requiere de: 1- un complejo enzimático denominado nitrogenasa, el cual solo se encuentra en algunos microorganismos (diazótrofos) tanto del dominio *Bacteria* como *Archaea* (Dos Santos *et al.*, 2012) que ocupan un nicho ecológico indispensable ya que proveen el nitrógeno fijado a la biósfera siendo este proceso la principal fuente de ingreso a la misma; 2- grandes cantidades de poder reductor; 3- MgATP y un sistema de regeneración de ATP ya que el MgADP formado a partir de la hidrólisis del MgATP inhibe a la catálisis por competir por los sitios de unión de la dinitrogenasa reductasa (Newton, W., 2007) y 4- un ambiente anaeróbico o con baja presión de oxígeno (O_2) dado que la nitrogenasa es inhibida en forma irreversible en contacto con este gas (Dalton & Mortenson, 1972), por esta razón los microorganismos fijadores que requieren O_2 para su crecimiento utilizan diferentes estrategias para proteger a la nitrogenasa de la inactivación (Sección 1.3).

El complejo enzimático nitrogenasa, está formado por dos componentes metaloproteicos, altamente conservados en secuencia aminoacídica y estructura entre las bacterias fijadoras de nitrógeno conocidas hasta el momento (Halbleib & Ludden, 2000). El componente I, la hierro-molibdeno nitrogenasa (MoFe-proteína) o molibdoferredoxina denominada dinitrogenasa y el componente II, la hierro nitrogenasa (Fe-proteína) o azoferredoxina, también llamada dinitrogenasa reductasa. Estos componentes forman el complejo nitrogenasa con una proporción 2:1 (Fe-proteína: MoFe-proteína) (Kim & Gadd, 2008). En el caso de la MoFe-proteína se trata de un heterotetrámero, $\alpha_2\beta_2$, con un peso molecular de 230 kDa aproximadamente, posee 2 centros metálicos, el FeMo-cofactor (FeMo-co) grupo prostético donde tiene lugar la unión del sustrato (N_2) y ocurre la reacción de reducción propiamente dicha y el sitio P que participa en la transferencia de electrones entre las proteínas del complejo (Einsle *et al.*, 2002). Por otro lado, la Fe-proteína, es un homodímero, γ_2 , de aproximadamente 60 kDa, el cual posee un sitio de unión al MgATP/MgADP. Este componente del complejo nitrogenasa está involucrado en tres pasos básicos de la transferencia de electrones: 1- la reducción por parte de transportadores de electrones, como por ejemplo, ferredoxina o flavodoxina, 2- la transferencia unidireccional de electrones hacia la MoFe-proteína, proceso que requiere energía, dos moléculas de MgATP son hidrolizadas por cada electrón transferido, 3- la transferencia del protón al sustrato que se ubica en el FeMo-co; estos procesos ocurren en forma cíclica, por cada molécula de nitrógeno ocurren seis ciclos de oxidación – reducción con la hidrólisis de,

al menos, 16 moléculas de ATP y con un mínimo de 1 mol de H_2 producido (Fig. 2.1) (Georgiadis *et al.*, 1992; Rees & Howard, 2000; Newton, W. 2007; Kim & Gadd, 2008).

Este complejo nitrogenasa también puede reducir otros sustratos (Cuadro 2.1), para que esto ocurra, los mismos deben asemejarse a la molécula del nitrógeno respecto de la presencia en su estructura de enlaces dobles o triples.

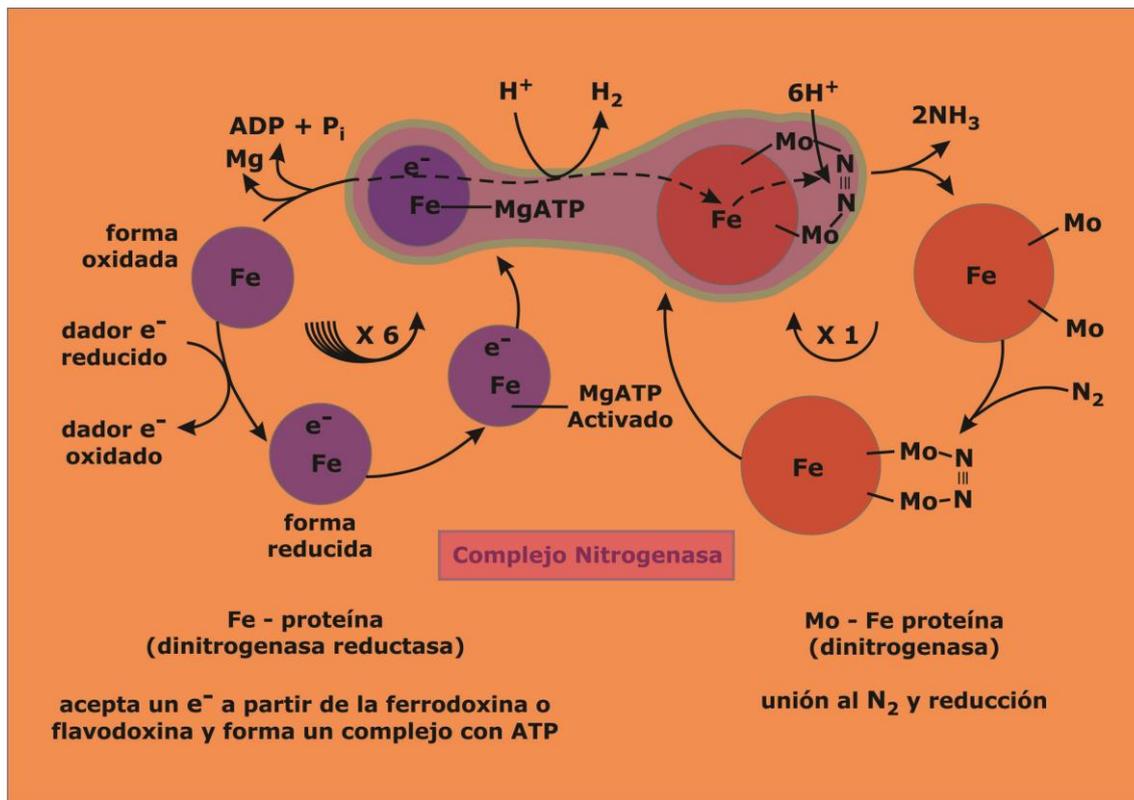


Figura 2.1: Reducción de la molécula de nitrógeno por el complejo nitrogenasa. La Fe-proteína (dinitrogenasa reductasa) es reducida luego de la oxidación de la ferredoxina o flavodoxina acoplada, y se une a dos moléculas de MgATP. La MoFe-proteína (dinitrogenasa) se une a la molécula de nitrógeno y forma el complejo nitrogenasa con la Fe-proteína-MgATP reducida. Los electrones requeridos para la reducción del N_2 son transferidos desde la Fe-proteína hacia la MoFe-proteína; esta reacción se repite 6 veces hasta reducir una molécula de N_2 . (adaptado de Kim & Gadd, 2008. *Bacterial Physiology and Metabolism*. Figura 6.3. Cambridge University Press, Cambridge.)

Esta capacidad resulta de sumo interés para la investigación científica: a partir de ella se diseñó un test de medición indirecta específico de la fijación del nitrógeno a través del monitoreo de la funcionalidad de la actividad nitrogenasa (Andrade *et al.*, 1997). En dicho test se utiliza como sustrato el acetileno, que como producto de reducción, produce etileno, un producto que fácilmente puede cuantificarse por cromatografía gaseosa. Esto permite la medición de la actividad nitrogenasa tanto *in vivo* como *in vitro* dado que ambos son permeables, sustrato y producto, para la membrana de la célula bacteriana (Halbleib & Ludden, 2000), sirviendo de indicador de la actividad de fijación de nitrógeno. En la naturaleza, también, se han encontrado

algunos microorganismos fijadores que tienen la capacidad de sintetizar dinitrogenasas alternativas, las cuales en lugar de poseer Mo, contienen como heterometal de su co-factor vanadio (VFe-proteína) o hierro (FeFe-proteína). Las mismas son activas, bajo condiciones limitantes de Mo, pero en menor medida que la MoFe-proteína dado que son menos eficientes en la unión y reducción del dinitrógeno (Georgiadis *et al.*, 1992; Peters & Szilagyi, 2006). Estas dos últimas características de la enzima nitrogenasa, la falta de especificidad del sustrato y el uso de diferentes cofactores metálicos, indicarían que la historia evolutiva de esta enzima fue influenciada por la presión selectiva de distintos ambientes (Ogunseitan, O., 2005).

Cuadro 2.1: Sustratos alternativos del complejo nitrogenasa: Se presentan los sustratos reducidos y el producto de la reacción.

Sustrato	Producto
N_3^-	N_2, NH_4^+
N_2O	N_2, NH_4^+
HCN	CH_4, NH_4^+, CH_3NH_2
CH_3CN	C_2H_6, NH_4^+
CH_2CHCN	C_3H_6, NH_4^+, C_3H_8
C_2H_2	C_2H_4
$2H^+$	H_2

La presencia de los genes de fijación de nitrógeno en plásmidos fue observada en varios microorganismos que adquirieron la capacidad de fijar nitrógeno. En casi todos los casos, los genes *nif* se encuentran dentro de varios operones co-transcriptos o regulones (Raymond *et al.*, 2004) distribuidos en el genoma, que no solo son responsables de la síntesis de los componentes de la nitrogenasa, sino también de la regulación, activación de la nitrogenasa y del transporte de metales (Fig. 2.2).

Dados los altos requerimientos de energía y el poder reductor del complejo nitrogenasa, la maquinaria celular ejerce una estricta regulación para el control de la transcripción de los genes *nif* de manera de asegurarse que el proceso de fijación de nitrógeno solo ocurre cuando las condiciones fisiológicas son las adecuadas. En el *phylum Proteobacteria*, se describieron 3 niveles de regulación, dos transcripcionales y uno post-transcripcional. El primer nivel de esta cascada de regulación se produce a través del sistema regulatorio NtrB – NtrC (factor sigma de la ARNpolimerasa, σ^{54} – dependiente de un activador transcripcional, llamado *enhancer-binding protein*, EBP), que provee un control global de la fijación en respuesta a la fuente de nitrógeno (NH_4^+) a través de la regulación de la transcripción del gen *nifA*, este último es responsable de la síntesis de la proteína NifA, principal regulador del proceso de fijación, miembro de la familia de EBP como el factor NtrC antes mencionado. NifA

con hidrólisis de ATP cataliza el cambio conformacional en el factor σ^{54} permitiendo la formación de la holoenzima σ^{54} - ARN polimerasa (Martínez-Argudo *et al.*, 2005), activador transcripcional responsable de la regulación de la mayoría de los genes *nif* (Halbleib & Ludden, 2000). El control de la actividad de la proteína NifA es el segundo nivel de la cascada de regulación, en este caso la detección de la concentración de nitrógeno (NH_4^+) es más estricta. NifA es regulado a través de la interacción proteína - proteína con NifL (Xie *et al.*, 2006), una proteína represora, que censa directamente la concentración de O_2 y los cambios de estado redox intracelular.

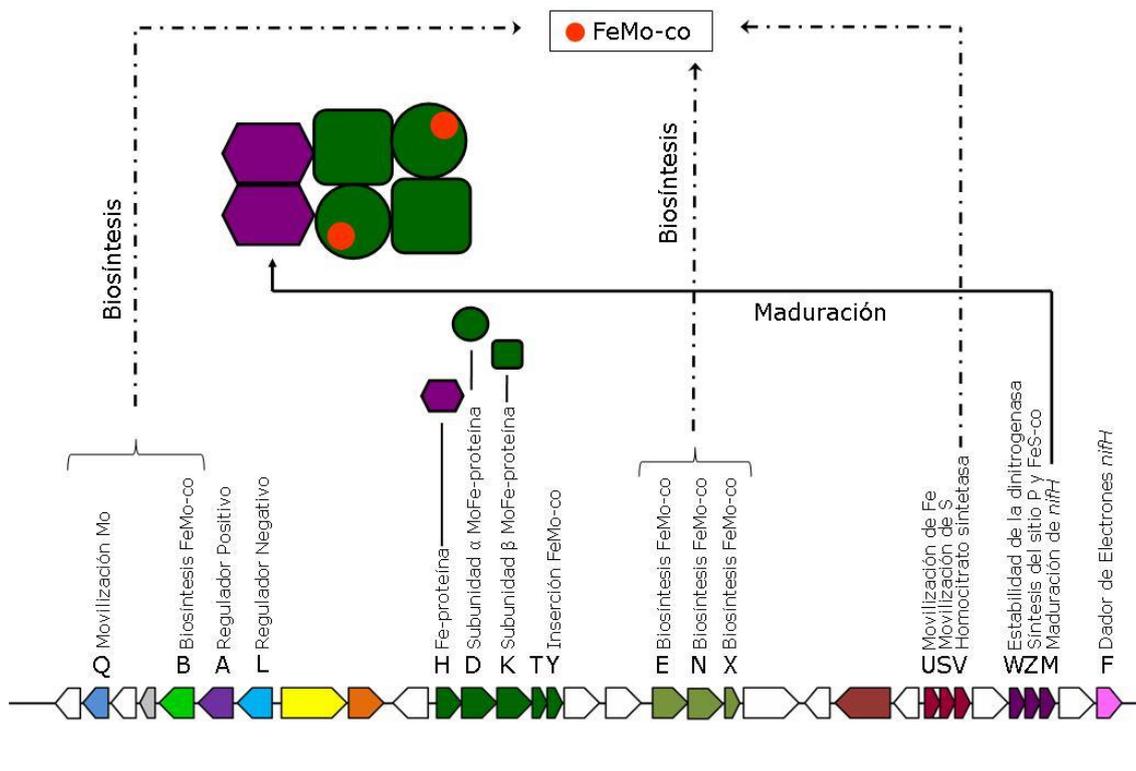


Figura 2.2: Genes de fijación de nitrógeno (*nif*): Esquema de la organización y función de los genes *nif* de *Pseudomonas stutzeri* A1501 con las funciones putativas de los productos de cada uno. Los genes indicados con el mismo color poseen funciones afines. (adaptado de Newton, W. 2007. *Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology of Nitrogen Fixation*. Figura 8.6. Elsevier, Amsterdam)

El tercer nivel de regulación es post-transcripcional, ejerce control sobre la actividad de la dinitrogenasa reductasa (Fe-proteína), en este caso se produce un efecto de *switch – off / switch – on* (apagado/encendido), el cual se apaga ya sea por un aumento de la concentración de amonio, aumento de la presión parcial de O_2 o en el caso de los microorganismos fotótrofos en oscuridad. El “prendido y apagado” (*switching*), está dado por la ADP-ribosilación reversible de la Fe-proteína reacción catalizada por el sistema DRAT/DRAG que bajo condiciones de fijación, DRAT es inactivo y DRAG es activo. Ante un estímulo negativo, tal como aumento de la concentración exógena de amonio o reducción de la energía DRAT es activado, produciendo la ADP-ribosilación de la Fe-nitrogenasa resultando en la pérdida de la actividad nitrogenasa y volviéndose DRAG inactivo (Zhang *et al.*, 2000). Los 3 niveles de regulación involucran la proteína de transducción de señal, P_{II} , que comunica la

concentración de nitrógeno a varios blancos para el control de la transcripción de los diferentes genes que intervienen, esto se debe a que dicha concentración no es censada *per se*, sino a través de la asimilación del nitrógeno por la vía glutamino sintetasa – glutamato sintetasa. Los metabolitos de esta vía, 2-oxoglutarato y glutamina son las moléculas a las cuales responde el sistema P_{II} (Dixon & Kahn, 2004; Masepohl & Forchhammer, 2007).

2.1.2- El género *Pseudomonas* como fijador de nitrógeno

Entre los microorganismos fijadores de nitrógeno, se han aislado algunas cepas pertenecientes al género *Pseudomonas*, p. ej. *Pseudomonas* sp. K1 (Mirza *et al.*, 2006), *P. azotifigens* 6H33b^T (Hatayama *et al.*, 2005), *P. putida* MT20-3 “gamma”, *P. rubrisubalbicans* “beta”, *P. stutzeri* JM300 “gamma” (Chan *et al.*, 1994) *P. stutzeri* A1501 (Yan *et al.*, 2008), *P. stutzeri* DSM4166 (ex *P. stutzeri* CMT.9) (Krotzky & Werner, 1987; Yu *et al.*, 2011), *P. stutzeri* var. *mendocina* (Andrade *et al.*, 1997) y *Azotobacter vinelandii* AvOP (Setubal *et al.*, 2009), el cual puede incluirse entre estos ejemplos dado que, estudios recientes demuestran que el género *Azotobacter* podría ser asignado al género *Pseudomonas* (Rediers *et al.*, 2004; Young & Park, 2007; Özen & Ussery, 2012). Estos diazotrofos recibieron especial atención dado que, esta característica por mucho tiempo se creyó excluyente entre las cepas del género *Pseudomonas sensu stricto* (Young, 1992 en Desnoues *et al.*, 2003), ya que, como indican Chan y colaboradores (1994) si bien para Palleroni (1984), las *Pseudomonas* no poseen la capacidad de fijar nitrógeno, ellos consideran que esta característica no ha sido evaluada correctamente debido a problemas tales como: 1- la identificación incierta o errónea de la cepa; 2- la falta de test más rigurosos para las *Pseudomonas* diazotróficas; 3- la naturaleza multigenérica propia del género, ya que no parece haber ninguna barrera fisiológica para la expresión estable de los genes *nif* en este género (Krotzky & Werner, 1987) tal como fue demostrado por Mergeay y Gerits (1978) y por Postgate y Kent (1987) quienes transfirieron los genes *nif* de *Klebsiella pneumoniae* M5a1 a *P. fluorescens* cepa 6.2 – biotipo IV y *P. putida* MT20-3 respectivamente demostrando que adquirieron la capacidad de fijar nitrógeno a partir de esta transformación. Una de las posibles explicaciones propuestas para la ocurrencia de genes *nif* funcionales en este género es la transferencia horizontal de genes, ya sea por conjugación, transformación o transducción (Vermeiren *et al.*, 1999). A pesar de ello se podría argumentar que la transferencia del *cluster* completo de genes necesarios para la fijación del nitrógeno es poco probable debido a su tamaño (p. ej. 25 kb en *Klebsiella pneumoniae* o 49 kb en *Pseudomonas stutzeri* A1501), sin embargo existen evidencias de la transferencia de elementos móviles de gran tamaño que pueden incorporarse directamente en el genoma bacteriano donde forman “islas genómicas” (Hacker & Carneil, 2001), tales como las islas de patogenicidad que a veces poseen más de 200 kb y aún así son transferidas entre cepas (Hacker & Carniel, 2001), o la adquisición de la isla simbiótica de 500 kb por un microorganismo no simbiótico del género *Mesorhizobium* (Sullivan & Ronson, 1998). La inclusión de genes *nif* en elementos móviles de gran tamaño no solo apoya la hipótesis de la transferencia horizontal, sino que también ofrece un mecanismo de acción para la misma.

En este trabajo de tesis se propone transferir los genes *nif* de una *Pseudomonas* fijadora de nitrógeno a otra cepa del mismo género pero que no posee nitrogenasa a

través del desarrollo de una nueva técnica de ingeniería genética. Como bacteria **donante** se eligió *Pseudomonas stutzeri* A1501, una bacteria promotora del crecimiento vegetal que fue reaislada de raíces de arroz inoculadas previamente con la cepa *Pseudomonas stutzeri* A15 (ex *Alcaligenes faecalis*), un endófito ampliamente utilizado como promotor del crecimiento en los cultivos de China (Desnoues *et al.* 2003).

P. stutzeri A1501 se caracteriza por presentar los genes *nif* co-localizados en una isla genómica adquirida por transferencia horizontal, denominada isla de fijación o isla roja; dicha región tiene un tamaño de 49 kb (PST_1302-PST_1359), consiste en 59 genes, los cuales, en su organización general e identidad aminoacídica, presentan un alto grado de similitud con los genes *nif* de *A. vinelandii*, un microorganismo fijador ampliamente estudiado, excepto que los genes *nif* de *A. vinelandii* no se encuentran co-localizados sino que están distribuidos en dos sectores de su genoma (Yan *et al.*, 2008). Como cepa **receptora** de los genes *nif* se eligió *Pseudomonas protegens* Pf-5, una cepa comensal aislada de la rizósfera de la planta de algodón (Howell & Stipanovic, 1979); a esta bacteria se la considera una promotora del crecimiento vegetal ya que tiene la capacidad de suprimir microorganismos patógenos a través de la producción de metabolitos secundarios tales como: pirrolnitrina, pioluteorin, 2,4-diacetilfloroglucinol, hidrógeno de cianamida y los sideróforos pioquelina y pioverdinas (Paulsen *et al.*, 2005; Loper *et al.*, 2007). Esta cepa bacteriana es reconocida también, como un modelo de estudio no solo porque su genoma fue secuenciado y para este caso en particular podemos afirmar que la misma no posee genes *nif*, sino también por su capacidad de controlar patógenos de una gran variedad de especies vegetales tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas. También se seleccionaron otras cepas de *Pseudomonas* (*P. baleárica* SP1402, *P. putida* KT2440, *P. stutzeri* CCUG11256, *P. taetrolens* IAM1653 y *P. veronii* DSM11331), no fijadoras, pertenecientes al género *sensu stricto* para poner a prueba la técnica desarrollada en otros contextos genómicos y evaluar la factibilidad de su aplicación para el desarrollo de nuevos inoculantes.

2.1.3- Hipótesis y Objetivos

En este marco se plantea la siguiente hipótesis:

“Los genes *nif* responsables de la síntesis del complejo nitrogenasa de *Pseudomonas stutzeri* A1501, que se encuentran co-localizados en una isla genómica, pueden ser transferidos a la cepa *Pseudomonas protegens* Pf-5 por ingeniería genética y que esta exprese un complejo nitrogenasa funcional”.

Para poner a prueba la misma se abordarán los siguientes objetivos específicos:

- ✓ Transferir los genes *nif*, responsables de la fijación de nitrógeno, que se encuentran co-localizados en una isla genómica de *P. stutzeri* A1501, a través de un cósmido recombinante a *P. protegens* Pf-5.
- ✓ Estudiar la fisiología de la bacteria *P. protegens* Pf-5 recombinante. Se evaluará el crecimiento y la actividad nitrogenasa de esta cepa en medios semi-sintéticos con alta y baja disponibilidad de nitrógeno, bajo distintas condiciones de aireación.

- ✓ Estudiar la regulación de los genes *nif* en *P. protegens* Pf-5 recombinante. Se analizará la expresión de los genes *nif* (mediante RT-PCR en tiempo real) en las condiciones de crecimiento descritas en el punto anterior, y se analizará la relación de la información molecular - fisiológica.

2.2- Materiales y Métodos

2.2.1- Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas a lo largo del desarrollo de esta tesis fueron: *Escherichia coli* S17-1 (Simon *et al.*, 1983) *E. coli* X1-Blue (Stratagene, EUA, N° Catálogo: 200249), *Pseudomonas balearica* SP 1402, *P. stutzeri* CCUG 11256 (Bennasar *et al.*, 1996), *P. protegens* Pf-5 (ex *P. fluorescens*) (Howell & Stipanovic, 1979; Ramette *et al.*, 2011), *P. putida* KT 2440 (Nelson *et al.*, 2002), *P. stutzeri* A1501 (Desnoues *et al.*, 2003), *P. taetrolens* IAM 1653 (Anzai *et al.*, 1997) y *P. veronii* DSM 11331 (Elomari *et al.*, 1996).

2.2.2- Construcción del cósmido recombinante X940

La construcción del cósmido recombinante X940 requirió de numerosos pasos de clonado que se describen a continuación. En primer lugar, se modificó la isla genómica roja de la bacteria *P. stutzeri* A1501 (Fig 2.1_{M&M}), en la cual se encuentran co-localizados los genes *nif* (PST_1302-PST_1359) responsables de la síntesis del complejo nitrogenasa, de forma tal de incorporarle un marcador de selección (KmR) y disminuirle su extensión (delección de la región PST_1307-PST_1312). Para esto, se amplificaron dos fragmentos de 255 pb cada uno correspondientes a las regiones intergénicas PST_1306-PST_1307 y PST_1312-PST_1313. Se utilizaron los siguientes *primers*: **A1**: CGGGATCCCCGAATAGAGGTCTGTCCCG, **A2**: CGGGATCCCCG GGGCGCTGGTGC, **A3**: CGGTCGACTCGGTGCGGCGCTCG, **A4**: CGGTCGACG CCAAGGCCGCCCGC, en los cuales se subrayaron los sitios de restricción correspondientes a las enzimas de restricción (*Bam*HI y *Sal*I). El fragmento obtenido de la región PST_1306-PST_1307 fue digerido con la enzima *Bam*HI (Promega, EUA) y ligado al gen de resistencia de kanamicina (KmR) del plásmido pUC4K (*Acc.* # X06404), previamente digerido con *Bam*HI. En este plásmido recombinante se clonó el fragmento amplificado de la región PST_1312-PST_1313 digerido previamente con la enzima *Sal*I (Promega, EUA). El plásmido resultante se utilizó para transformar células termocompetentes de *P. stutzeri* A1501.

Las células competentes fueron preparadas a partir de cultivos con una densidad óptica (DO) de 0,3 medida en 600 nm de longitud de onda; el cultivo fue centrifugado a 3.500 rpm por 5 min a 4 °C y se resuspendió en 10 ml de 0,1 M de MgCl₂ por 2 h. Luego, las células fueron centrifugadas a 3.500 rpm por 5 min a 4 °C y resuspendidas nuevamente en 0,1 M de MgCl₂ con 15% (P/V) de glicerol (Lee *et al.*, 2005). Las células transformadas fueron seleccionadas en medio Luria – Bertani (LB) agar, que contiene en g/l: 10 de Triptona, 5 de Extracto de Levadura, 10 de NaCl, 15 de Agar, pH: 7,0 (Sambrook *et al.*, 1989) con 50 µg/ml de kanamicina; se eligió una única colonia (clon) a la que se llamó A1501C (Fig. 2.1_{M&M}). De acuerdo con el análisis por PCR, la bacteria recombinante A1501C posee un doble evento de recombinación homóloga. De

esta última también se evaluó la capacidad de crecer en condiciones deficientes de nitrógeno (ver medio L sin $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en la sección 2.2.8).

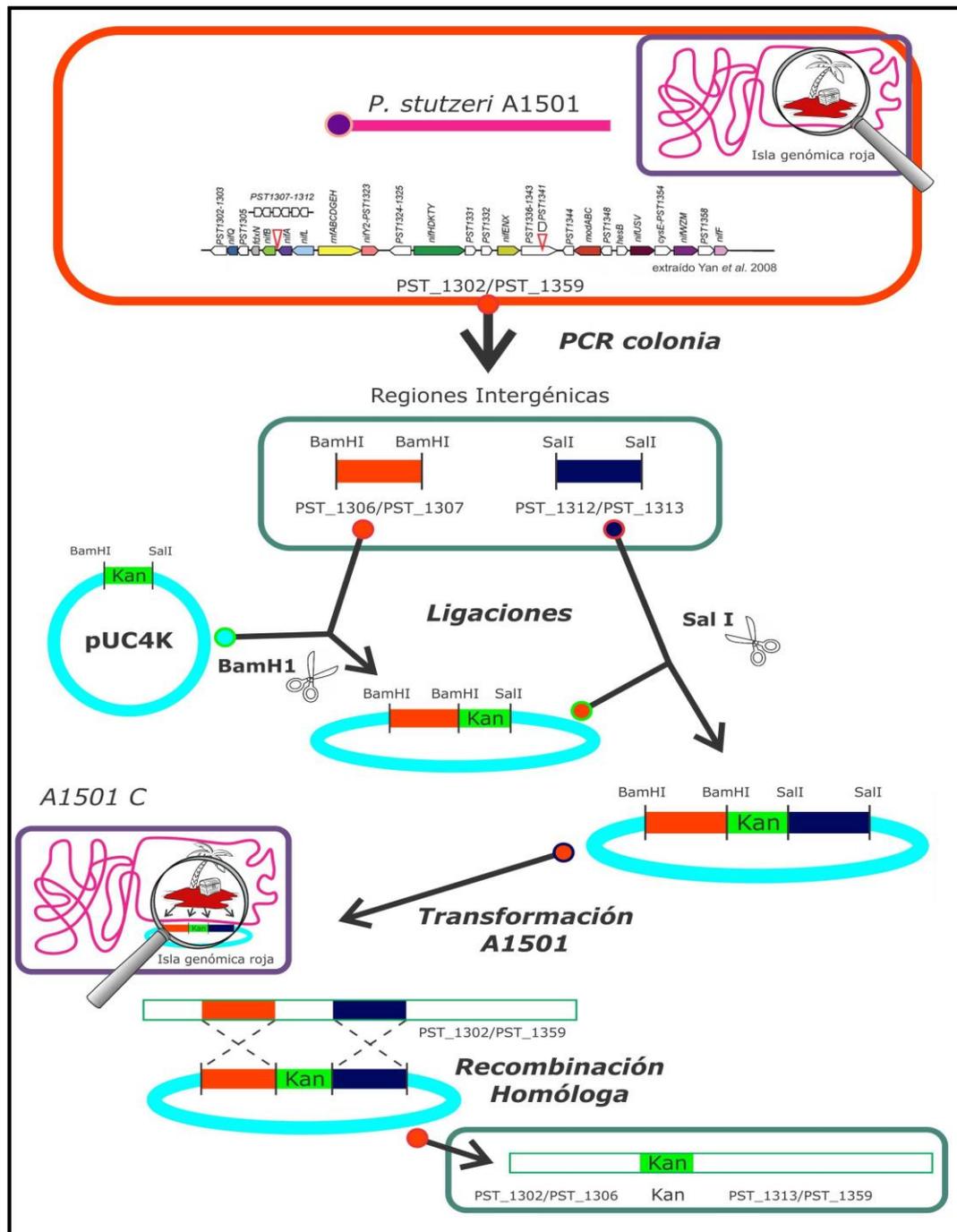


Figura 2.1_{M&M}: Esquema de obtención de la cepa doble recombinante A1501 C.

El cósmido X940 fue construido sobre la base del cósmido denominado SuperCos1 (Acc. # M99566.1 Kit Agilent Technologies, EUA. N° Catálogo: 251301). Este último fue seleccionado por su pequeño tamaño (7,9 kb) y por su capacidad para empaquetar insertos de gran tamaño. Para disminuir aún más su tamaño fue digerido con la enzima *Ava*I y ligado nuevamente para eliminar el promotor pSV40 y la resistencia a neomicina de uso en células eucariotas, los cuales no son necesarios para el objetivo de esta construcción. El vector resultante, al que se llamó pSC2 (Fig. 2.2_{M&M}). Fue digerido con *Xba*I, desfosforilado y posteriormente digerido con *Bam*HI, siguiendo las instrucciones dadas por el fabricante, para permitir la reacción de ligación con los fragmentos obtenidos por digestión parcial con *Mbo*I del ADN genómico de A1501C. Los productos de ligación se empaquetaron en bacteriófagos λ , los cuales fueron utilizados para la infección de células competentes de *Escherichia coli* XL1- Blue. El *screening* se realizó en LB agar conteniendo kanamicina 50 μ g/ml y ampicilina 100 μ g/ml que permitió la selección de células portadoras del cósmido (AmpR) y de la isla genómica roja (KmR) recombinante (Fig. 2.3_{M&M}).

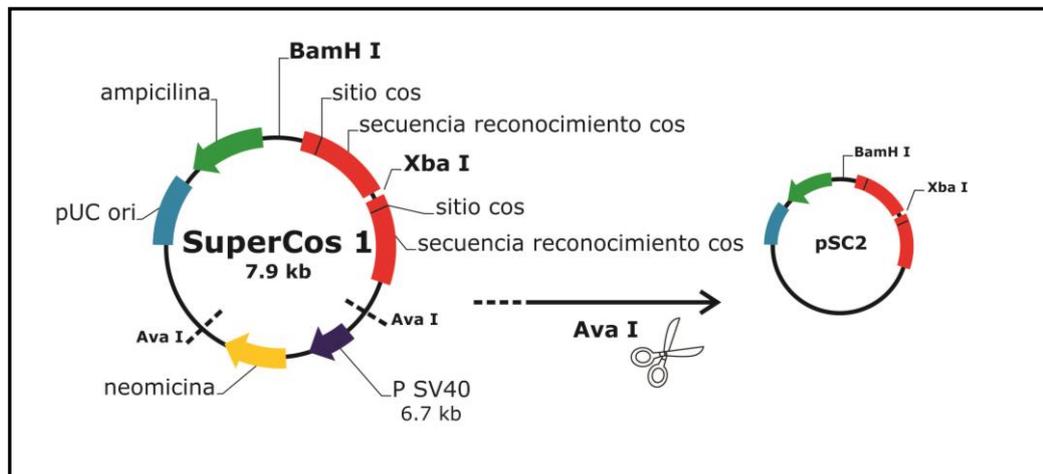


Figura 2.2_{M&M}: Esquema de obtención del cósmido pSC2.

El cósmido resultante, denominado X940, fue secuenciado por MacroGen Inc. (Corea) (Datos Suplementarios, Setten *et al.*, 2013). En la Figura 2.4_{M&M} se muestra un esquema del cósmido recombinante

2.2.3- Transformación de cepas de *Pseudomonas* con el cósmido X940

El cósmido X940 fue introducido en células termocompetentes de las siguientes bacterias: *P. balearica* SP 1402, *P. protegens* Pf-5, *P. putida* KT 2440, *P. stutzeri* CCUG 11256, *P. taetrolens* IAM 1653 y *P. veronii* DSM11331. Para la transformación se utilizó la misma metodología descrita en la sección 2.2.2 para *P. stutzeri* A1501. La selección se realizó en placas de LB agar con kanamicina 50 μ g/ml; las células recombinantes obtenidas se denominan agregándoles al final del nombre la sigla X940, que identifica al cósmido.

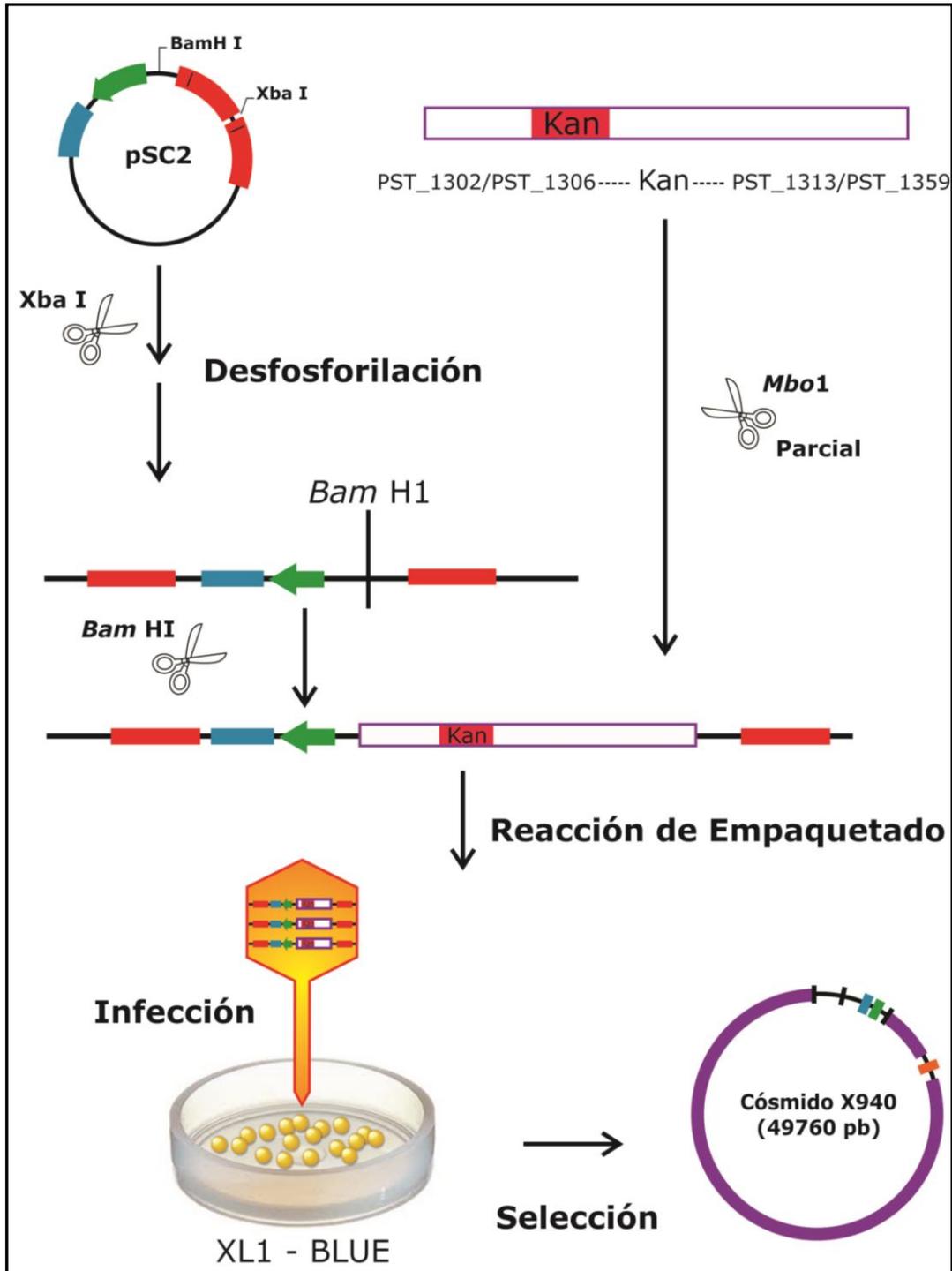


Figura 2.3_{M&M}: Esquema de la construcción de la biblioteca genómica de A1501C para la obtención del cósmido recombinante X940.

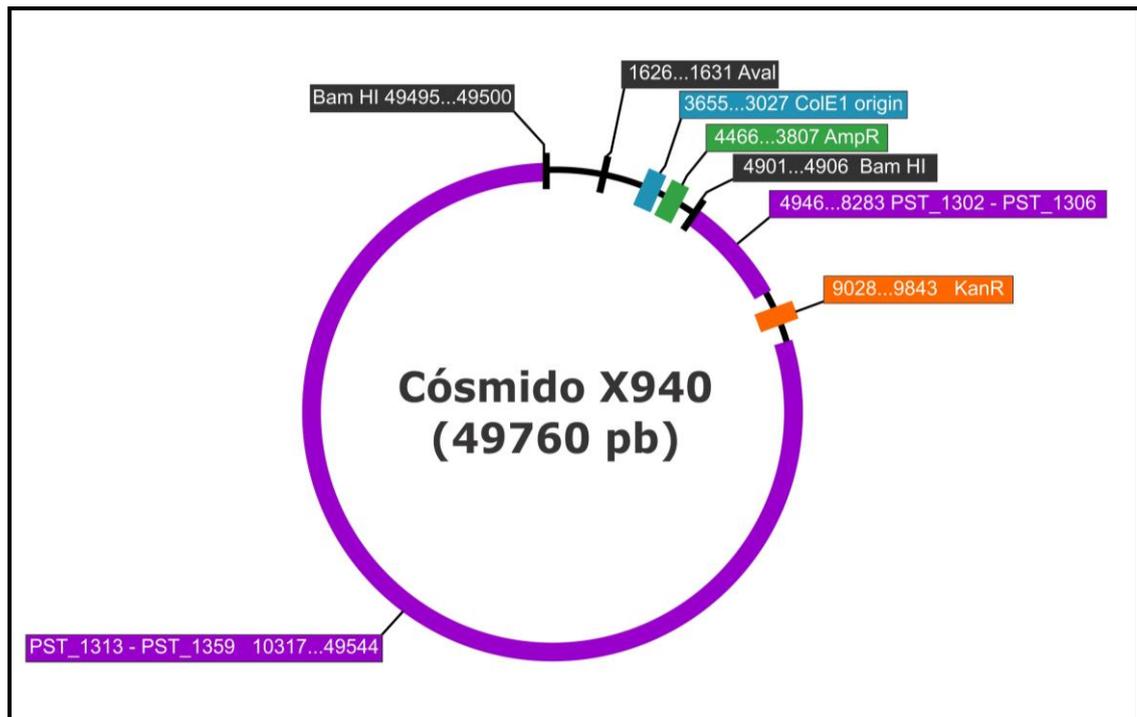


Figura 2.4_{M&M}: Esquema del cósmido recombinante X940: Se muestra un esquema desarrollado a partir de la secuenciación del cósmido X940, en donde se pueden observar los genes *nif* de *P. stutzeri* A1501 (PST_1302-PST_1306 y PST_1313-PST_1359), la resistencia a kanamicina (KanR) y los sitios de restricción *Bam*HI y *Ava*I.

2.2.4- Construcción de la cepa *Pseudomonas protegens* Pf-5 X940(2)

Con el fin de determinar si la región PST_1307-PST_1312 de la isla genómica roja de *P. stutzeri* A1501, la cual fue deletada para permitir la construcción del cósmido recombinante X940 (ver Sección 2.2.2), tenía efecto sobre la regulación del complejo nitrogenasa, se construyó la cepa *P. protegens* Pf-5 X940(2). Para ello se amplificó por PCR dicha región, utilizando los *primers*: **p07**: GAAGTAGTGGTGC GCCTCCTCGGAG y **p13**: CGGGTCGGGCGGCAGC GT a partir de los cuales se obtuvo un fragmento de 6,23 kb, el cual fue subclonado en el plásmido pBBR1MCS-3 (*Acc. #* U25059) digerido con *Sma*I; el vector resultante se denominó pENZO; éste fue introducido en células electrocompetentes de *Escherichia coli* S17-1, por electroporación (25 μ F, 2,5 kV y 200 ohm) (Sambrook *et al.*, 1989); y luego por conjugación se transfirió a la bacteria *P. protegens* Pf-5 X940. Para ello se tomaron 250 μ l de cada cultivo crecido *overnight*, se colocaron en un mismo tubo, se mezclaron por inversión y luego se plaquearon 250 μ l en placas de medio NE2, conteniendo en g/l; 10 de K_2HPO_4 , 0,2 de $MgSO_4 \cdot H_2O$, 3,5 de $NaNH_4HPO_4 \cdot 4H_2O$, 2 de Ácido Cítrico $\cdot H_2O$, 0,1 % V/V de Solución Micronutrientes MT [en g/l, 2,78 de $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$, 1,47 de $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$, 0,17 de $CuCl_2 \cdot 2 H_2O$, 0,29 de $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$, 1,98 de $MnCl_2 \cdot 4 H_2O$, 2,81 de $CoSO_4 \cdot 7 H_2O$ (Lageveen *et al.*, 1988)], 15 de Agar, pH: 7,0 (Huisman *et al.*, 1992) sin glucosa, suplementado con caprilato de sodio (0,25 % P/V) y tetraciclina (5 μ g/ml).

Se seleccionó una colonia (clon) que fue repicada nuevamente en medio NE2 con tetraciclina (5 µg/ml), y luego se confirmó la obtención de la cepa *P. protegens* Pf-5 X940(2) por PCR utilizando los *primers* arriba mencionados **p07** y **p13**.

2.2.5- Análisis por PCR del gen *nifH* en ADN genómico de *Pseudomonas protegens* Pf-5 X940

Mediante la técnica de PCR se comprobó la presencia del gen *nifH* en *P. protegens* Pf-5 X940 para ello, a partir de la secuencia del gen se diseñaron los *primers*, **N1**: TTTAGAAACGCTGGCACAAA y **N2**: CGACGATGGTCATGTCT TCC, con un tamaño de banda esperado de 950 pb. Las PCRs se realizaron sobre ADN genómico, extraído a partir de cultivos *overnight* utilizando el kit de purificación Wizard® Genomic DNA (Acc. # A1120 – Promega, EUA). Para la reacción de amplificación se utilizaron 3 mM de MgCl₂; 4 mM de dNTP's; 1 µM de cada *primer*, *Buffer* de Reacción 10X y 0,25 U de *Taq* ADN polimerasa recombinante (Invitrogen®, EUA). La reacción se llevó a cabo con una desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min; 34 ciclos de 94 °C por 1 min, 50 °C por 30 seg. y 72 °C por 2 min 30 seg. y una extensión final a 72 °C por 10 min. En iguales condiciones se realizaron PCRs para las cepas salvajes *P. balearica* SP 1402, *P. stutzeri* CCUG 11256, *P. protegens* Pf-5, *P. putida* KT 2440, *P. stutzeri* A1501, *P. taetrolens* IAM 1653, *P. veronii* DSM 11331 y sus recombinantes.

Como control de la calidad del ADN extraído, se realizó una PCR en iguales condiciones que las anteriores pero con los *primers* **E9Fw**: GAGTTTGATCCTGG CTAG y **E1541Rv**: AAGGAGGTGATCCANCCRCA (Baker *et al.*, 2003), que amplifican una banda de 1500 pb del gen 16S del ARNr. Los resultados fueron evaluados en un gel de agarosa al 1 % en *Buffer* TAE (Tris-Acético-EDTA) 1 X con Bromuro de etidio 0,05 mg/ml.

2.2.6- Análisis por *Southern blot* del número de copias insertadas del cósmido X940 en el genoma de la bacteria *Pseudomonas protegens* Pf-5 X940

El número de copias insertadas del cósmido X940 en la bacteria *P. protegens* Pf-5 X940 se determinó por la técnica de *Southern blot* (Southern, E., 1975), utilizando un sistema DIG *Filter Hybridization* (Roche, Suiza). Como primer paso se diseñó la sonda DIG sobre la región PST_1302-PST_1306 del cósmido. A partir del ADN genómico de la bacteria recombinante (Pf-5 X940) obtenido como se describe en la sección 2.2.5 se realizó una PCR para obtener un fragmento de 2 kb con los *primers* **PST1302up**: CAGGCCGAGGATGATGTC y **PST1306low**: GCTGGAGGTG TACCAGGAAA. Para la reacción de amplificación se utilizaron: 2 mM de MgCl₂; 0,125mM de cada dNTPs; 1 µM de cada *primer*, *Buffer* de Reacción 10 X y 0,25 U de *Taq* ADN polimerasa recombinante (Invitrogen®, EUA) y un programa de ciclado con una desnaturalización inicial de 94 °C por 5 min; 34 ciclos de 94 °C por 1 min, 50 °C por 30 seg y 72 °C por 2 min 30 seg y una extensión final a 72 °C por 10 min. Como control negativo se utilizó la cepa salvaje *P. protegens* Pf-5. La PCR se evaluó en un gel de agarosa al 1 % en *Buffer* TAE 1 X con Bromuro de etidio 0,05 mg/ml (Fig. 2.5_{M&M}).

A partir de lo observado, se realizó por PCR el marcado de la sonda en iguales condiciones pero con el agregado de una relación 1:6 de DIG- 11 – dUTP : dTTP en la mix de reacción. Para su uso, la sonda marcada fue purificada con el kit PCR *Purification* (N° 28104 - QIAGEN, Alemania) y luego cuantificada en un gel de agarosa al 1 % en *Buffer* TAE 1 X con Bromuro de etidio 0,05 mg/ml, obteniéndose 40 ng/μl.

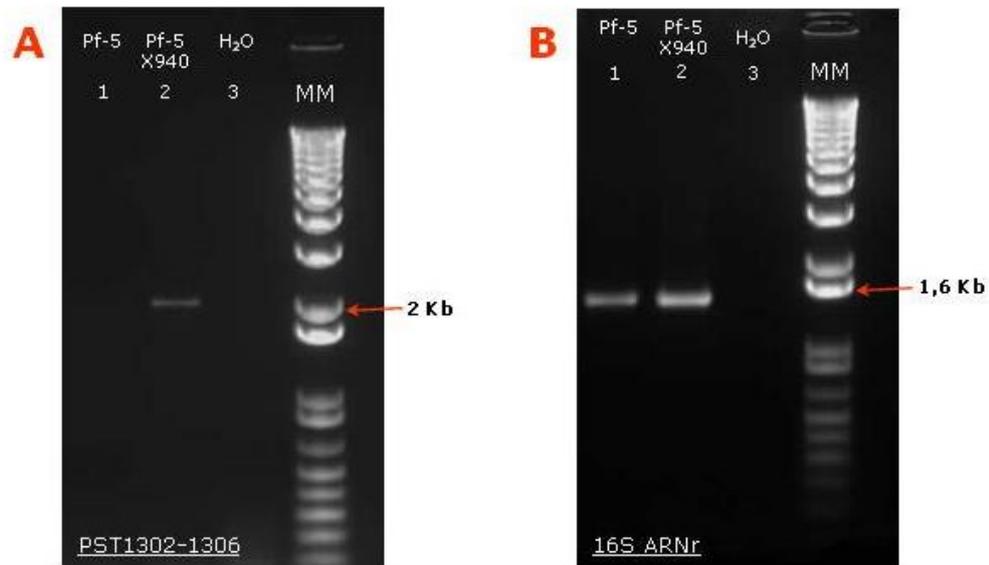


Figura 2.5_{M&M}: Obtención de la sonda *DIG* por PCR a partir de ADN genómico de *P. protegens* Pf-5 X940: Las imágenes corresponden a geles de agarosa en los que se observan: **A-** una banda de 2000 pb correspondiente a la región PST_1302-PST_1306 y **B-** como control de carga una banda de 1.500 pb correspondiente al gen16S ARNr. **1-** *P. protegens* Pf-5, **2-** *P. protegens* Pf-5 X940, **3-** Control negativo, H₂O. Marcador de Peso Molecular (MM): 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®, EUA).

Para digerir el ADN genómico se utilizaron las enzimas *Xho*I y *Hind*III (Promega, EUA), ambas con baja frecuencia de corte en el genoma de *P. protegens* Pf-5. Las digestiones se realizaron de acuerdo al siguiente esquema, a- *Xho*I, b- *Hind*III, c- Doble Digestión (*Xho*I - *Hind*III) (Fig. 2.3.B). Para cada reacción se siguieron las recomendaciones del proveedor (*Buffer* de reacción B 10 X, BSA 100 X, volumen final 400 μl) utilizando una masa de 0,05 μg/μl de ADN genómico y una incubación *overnight* a 37 °C. Los productos de la digestión fueron evaluados en un gel de agarosa 1 % en *Buffer* TAE 1 X con Bromuro de etidio 0,05 mg/ml (Fig. 2.6_{M&M}).

Luego de la digestión, los fragmentos de ADN fueron precipitados con acetato de sodio 3 M y etanol absoluto frío a -70 °C *overnight* y resuspendidos en 30 μl de H₂O estéril y 10 μl de *Loading Buffer* 10 X. Los fragmentos de ADN precipitados fueron sembrados en un gel de agarosa al 1 % (en TAE 1 X con Bromuro de etidio 0,05 mg/ml). Se utilizaron los marcadores de peso molecular, 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®, EUA) para la observación previa del gel en el UV-transiluminador y el DIG – labeled Marker III (Roche, Suiza) como referencia en la hibridación. La corrida electroforética se realizó *overnight* a 20 mV.

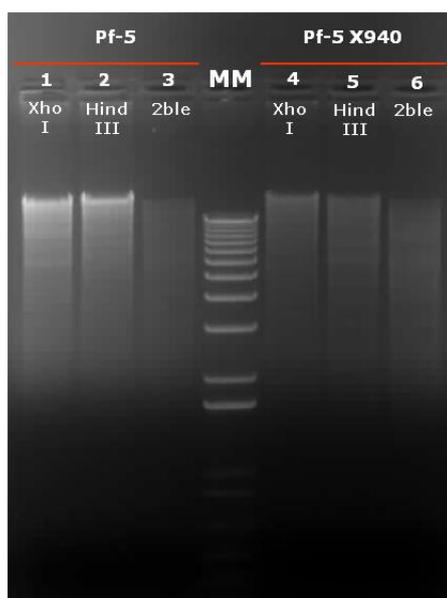


Figura 2.6_{M&M}: Digestión de ADN genómico de *P. protegens* Pf-5 y *P. protegens* Pf-5 X940: En el gel de agarosa se sembraron 20 µl de las digestiones realizadas con diferentes enzimas de restricción. **1-** *P. protegens* **Pf-5** digerido con *Xho*I, **2-** *P. protegens* **Pf-5** digerido con *Hind*III, **3-** *P. protegens* **Pf-5** doble digestión (*Xho*I – *Hind*III), **4-** *P. protegens* **Pf-5 X940** digerido con *Xho*I, **5-** *P. protegens* **Pf-5 X940** digerido con *Hind*III, **6-** *P. protegens* **Pf-5 X940** doble digestión (*Xho*I – *Hind*III). Marcador de Peso Molecular (MM): 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®, EUA).

Para la transferencia se utilizó una membrana de Nylon cargada positivamente (Roche, Suiza) en la que fue fijado el ADN con el *UV – Crosslinking* (120.000 µjoule/cm² ó 30 seg a 253 nm). Se prehibridó a 65 °C por 4 h e hibridó a 68 °C *overnight*, siguiendo las instrucciones del proveedor. La detección se realizó por quimioluminiscencia con *CDP-Star* (Roche, Suiza).

2.2.7- Caminado Genómico de *Pseudomonas protegens* Pf-5 X940

Para conocer la posición de la inserción del cósmido recombinante dentro del genoma de la cepa *P. protegens* Pf-5 se solicitó al servicio de secuenciación de Macrogen Inc. (Corea) la realización de un caminado genómico y secuenciación. Para ello se utilizaron los *primers*; **2a:** CTGGTGGCGCGACTCGATGCCG, **2b:** TCGATGCCGCACTTGC GGCGGAA, **59a:** GGCGCCTGGTTGCGACAG ATCGCT, **59b:** CACCGAGGAGCGGCTGGGCG, todos ellos diseñados en la presente tesis doctoral sobre los bordes izquierdo y derecho de la región *nif* del cósmido recombinante X940, respectivamente (Fig. 2.4).

2.2.8- Crecimiento bacteriano en condiciones restrictivas de nitrógeno

Para evaluar el crecimiento de las bacterias *P. protegens* Pf-5 y *P. protegens* Pf-5 X940 en condiciones restrictivas de nitrógeno como primer paso fue necesario seleccionar un medio de cultivo semi-sintético, se eligió el medio K (Franche & Elmerich, 1981); que fue ajustado basándose en los medios propuestos por

Gerhardt y colaboradores (1994), Lageveen y colaboradores (1988) y Vogel & Bonner (1956) a partir de los cuales se formuló el medio L (Cuadro 2.1_{M&M}). Luego, a partir de pre-cultivos de *P. protegens* Pf-5 y *P. protegens* Pf-5 X940 crecidos *overnight* en medio L con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se obtuvo el inóculo, el cual fue lavado dos veces con medio L sin nitrógeno, para iniciar cultivos líquidos con una DO_{580} de 0,05 (aproximadamente 10^6 UFC/ml) en Erlenmeyers de 125 ml con 25 ml de medio L con y sin suplemento de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; a estos se les otorgaron ambientes con distinta disponibilidad de O_2 : “aerobiosis” (Erlenmeyers cubiertos con *parafilm*) y “microaerobiosis” (Erlenmeyers con tapas plásticas); los Erlenmeyers se incubaron a $28\text{ }^\circ\text{C} \pm 1^\circ$ en agitación (250 rpm).

Cuadro 2.1_{M&M}: Composición del medio de cultivo L.

Componentes	Molaridad [mM]
KH_2PO_4	7,35
K_2HPO_4	17,22
NaCl	3,42
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	7,57
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1,014
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,037
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$9,97 \times 10^{-4}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,001
$\text{MnCl}_2 \cdot 1 \text{H}_2\text{O}$	0,0073
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,01
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,0016
Ácido cítrico	3,4
Glucosa	0,028
Extracto de levadura	1 mg/l
pH	7

Para evaluar el crecimiento se midió la DO₅₈₀ y luego de 48 h se determinó el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) en placas de LB que fueron incubadas a 28 °C por 24 h. Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente a través de un análisis de la varianza, ANOVA, seguido de un contraste de medias por la prueba de *Tukey*.

2.2.9- Análisis de la expresión de genes *nif* por RT-qPCR

Para analizar la expresión de los genes *nif*, en primer lugar se extrajo el ARN de las bacterias *P. protegens* Pf-5 X940 y *P. protegens* Pf-5 X940(2), las cuales fueron preparadas a partir de pre-cultivos *overnight* en medio L suplementado con (NH₄)₂SO₄, incubados a 28 °C ± 1° en agitación (250 rpm). Luego se iniciaron cultivos en iguales condiciones con una DO₅₈₀ inicial 0,05 los cuales fueron crecidos hasta una DO₅₈₀ 0,5; se tomaron alícuotas, las cuales fueron peleteadas y congeladas en N₂ líquido. A partir de estos mismos cultivos se realizó un subcultivo en medio L sin (NH₄)₂SO₄, para el cual las células fueron previamente sedimentadas y lavadas una vez con medio L sin (NH₄)₂SO₄; luego de 3 h de incubación se tomaron nuevamente alícuotas que fueron sedimentadas y congeladas en N₂ líquido.

La extracción de ARN se realizó con el kit RNeasy Mini (QIAGEN, Alemania) y se lo trato con DNAase I (Promega, EUA), 1 U por µg de ARN, como indica el proveedor, a modo de ejemplo en la Fig. 2.7_{M&M} se presenta un gel de agarosa al 1 % en *Buffer* TAE 1 X con Bromuro de etidio 0,05 mg/ml con algunas de las diluciones obtenidas. El ADNc se obtuvo utilizando 1 µg de ARN, *random primers* (N₆) (Promega, EUA) y la retrotranscriptasa AMV (N° M9004 – Promega, EUA) de acuerdo con la recomendación del fabricante, en 25 µl de volumen final de reacción. En el Cuadro 2.2_{M&M} se especifican los genes *nif* seleccionados y los *primers* utilizados para el análisis de la expresión de los mismos por RT- PCR en tiempo real (RT-qPCR).

Para llevar a cabo la RT-qPCR se utilizó la *supermix* SYBR[®] iQ – Biorad (EUA) de acuerdo con la recomendación del fabricante con 0,4 µM *primer*. Las muestras fueron analizadas en diluciones 1:10 para los genes *nifA* y *gap-1* y en diluciones 1:1000 para los genes *nifB* y *nifH*. Las condiciones de ciclado fueron 1 ciclo a 94 °C por 3 min; 34 ciclos a 94 °C por 45 seg; 59,1 °C por 1 min y 72 °C por 1 min. Se utilizó un Icycler iq3 (Bio-Rad, EUA) (Soto *et al.*, 2008; Soto *et al.*, 2010). La eficiencia del *primer binding* fue determinada por regresión lineal y se graficó el valor Ct (*cycle threshold*) versus el logaritmo de la dilución del ADNc (Soto *et al.*, 2011). Las RT-qPCR se hicieron tres veces por duplicado con resultados comparables. Los niveles de expresión alcanzados por los genes en estudio fueron normalizados respecto de la expresión del gen *gap-1*, un gen con expresión constitutiva en *Pseudomonas* (*housekeeping*), (Markel *et al.*, 2011).

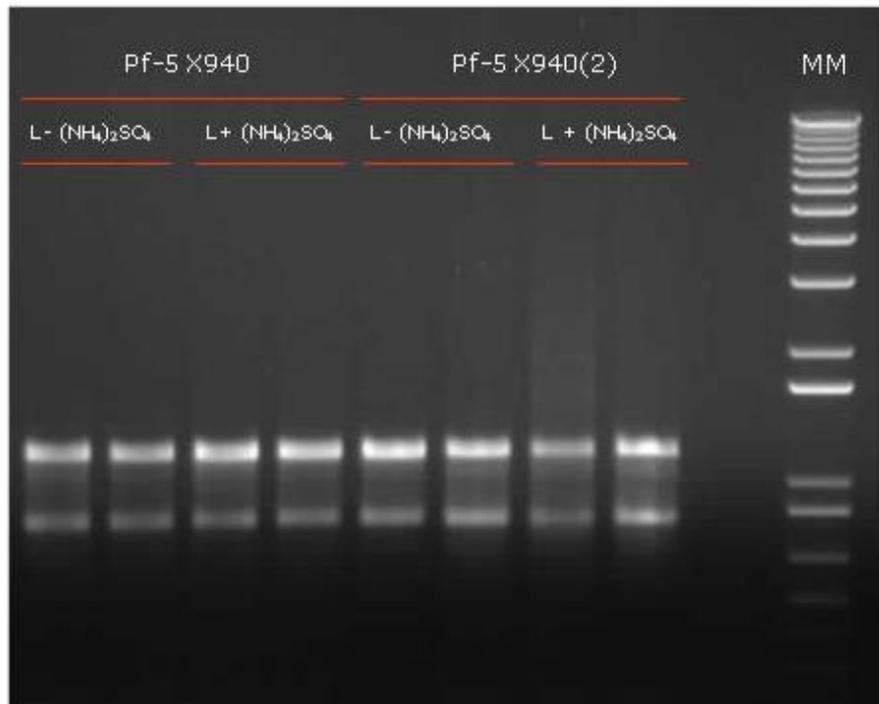


Figura 2.7_{M&M}: Extracción ARN de *P. protegens* Pf-5 X940 y *P. protegens* Pf-5 X940(2): En el gel de agarosa se presentan diluciones de ARN total extraído de células de *P. protegens* Pf-5

Cuadro 2.2_{M&M}: Genes *nif* estudiados por RT-qPCR: Genes *nif* presentes en *P. protegens* Pf-5 X940 y *P. protegens* Pf-5 X940(2), características de los mismos y primers utilizados para su análisis.

Genes	Descripción de la Función	Primer utilizado
<i>nifA</i>	regulador transcripcional positivo de <i>nifB</i> y <i>nifH</i>	up: 5' AGTAGGCGGGCGACGATTTCCATC3'
		low: 5' GCTGTACGACATGGACCTGCCCTTC3'
<i>nifB</i>	proteína requerida para la biosíntesis del cofactor FeMo de la nitrogenasa	up: 5' ATCCCCTGCCTGGGGCTGAAC3'
		low: 5' GCACCAGCCGCATACGTTCTCCTC3'
<i>nifH</i>	Fe-proteína estructural del complejo nitrogenasa	up: 5' GAATCGGCAAATCCACCACGAC3'
		low: 5' GGCCATTTCCATGATGGTGTCTGC3'
<i>gap-1</i>	gen de expresión estable y constitutiva en <i>Pseudomonas</i> (<i>housekeeping</i>)	up: 5' GGCAAAGGCAAGCTGAAGAACATCG3'
		low: 5' ACCGTTGATGATGCCGAACCTGTCA3'

2.2.10- Evaluación de la actividad nitrogenasa y medición de producción de amonio liberado

La medición de la actividad nitrogenasa se realizó mediante la técnica de reducción de acetileno, también denominada actividad reductora de acetileno. La misma está basada en la capacidad del complejo nitrogenasa de utilizar el acetileno como sustrato y reducirlo a etileno [Ecuación 2.2] (Newton & Dilworth, 2011).



A partir de pre-cultivos crecidos *overnight* en medio LB conteniendo 50 mM de glucosa, los cuales, fueron centrifugados y resuspendidos, se iniciaron cultivos en erlenmeyers de 50 ml conteniendo 10 ml de medio L sin $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ suplementado con 100 mM de glucosa a una DO_{580} inicial de 0,1. La suspensión fue incubada por 3 h a $28\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ con agitación vigorosa bajo una atmósfera de argón conteniendo 1 % de O_2 y 10 % de acetileno (Desnoues *et al.*, 2003). Se midió la producción de etileno por cromatografía gaseosa (Franche & Elmerich, 1981) por un período de 8 h, cada 60 min; y se determinó el contenido proteico por el método de Bradford (Bradford, M., 1976); todas las mediciones se realizaron tres veces en forma independiente. De igual manera se realizaron mediciones pero en condiciones de exceso de nitrógeno (medio L con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).

La producción de amonio liberada al medio se realizó en cultivos en medio L sin $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ crecidos a $28\text{ }^\circ\text{C} \pm 1$ en agitación con una atmósfera de dinitrógeno. Del cultivo se tomaron muestras secuenciales de las que se eliminaron las células por centrifugación y el sobrenadante se utilizó para realizar la reacción catalítica del indofenol (Chaney & Marbach, 1962) permitiendo, de esta manera, cuantificar el amonio liberado al medio de cultivo. La cuantificación de la actividad nitrogenasa y medición de la producción de amonio liberado fueron realizadas en iguales condiciones tanto para las cepas salvajes *P. protegens* Pf-5, *P. stutzeri* A1501 como para las cepas recombinantes; *P. protegens* Pf-5 X940, *P. protegens* Pf-5 X940(2), *P. balearica* SP 1402 X940, *P. putida* KT 2440 X940, *P. stutzeri* A1501 X940, *P. stutzeri* CCUG 11256 X940, *P. taetrolens* IAM 1653 X940 y *P. veronii* DSM11331 X940.

2.2.11- Programa Estadístico

En cada figura se detalla el análisis estadístico utilizado para cada caso en particular. Los mismos fueron realizados con el *software* GraphPadPrism[®] 6.0 (Graphpad Software Inc., EUA).

2.3- Resultados

2.3.1- Transferencia de genes *nif* a *Pseudomonas protegens* Pf-5

Para lograr la transferencia de los genes *nif* en *Pseudomonas protegens* Pf-5 y obtener el microorganismo recombinante, *Pseudomonas protegens* Pf-5 X940, y evaluar la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico fue necesario el clonado de los genes involucrados en la producción de un complejo nitrogenasa funcional. Para lograr dicho clonado, se utilizó como cepa dadora de genes de fijación de nitrógeno a la bacteria *Pseudomonas stutzeri* A1501, la cual presenta los genes de fijación de nitrógeno (*nif*) co-localizados en su genoma, más específicamente dentro de un elemento móvil, una isla genómica llamada isla roja o isla de fijación. Sin embargo, el tamaño que posee esta isla genómica constituyó un desafío a superar ya que se trataba de un bloque de ADN de 49 kb, lo cual, de acuerdo con la estrategia elegida, no es clonable en los vectores bacterianos que soportan mayor cantidad de ADN, es decir, los cósmidos recombinantes. Para solucionar esta problemática se requirió de varios pasos de clonado que se resumen en las Figuras 2.1_{M&M}, 2.2_{M&M} y 2.3_{M&M}.

En primer lugar, se comparó el *set* de genes *nif* presentes en la isla roja de *P. stutzeri* A1501 y en el genoma de *Azotobacter vinelandii* AvOP. Si bien, ambas cepas tienen un conjunto de genes *nif* muy similar en cuanto a la identidad aminoacídica y organización de genes en operones, los seis genes presentes en la región PST_1307-PST_1312 de *P. stutzeri* A1501, de los cuales se desconoce su función, no estarían presentes en el genoma de *A. vinelandii* AvOP (Fig. 2.1), lo cual sugirió que estos genes no eran esenciales para la formación de un complejo nitrogenasa funcional.

Considerando esta especulación, basada en un análisis bioinformático, se realizó una mutagénesis dirigida sobre *P. stutzeri* A1501 donde la región PST_1307-PST_1312 (7,4 kb) fue reemplazada por un *cassette* de kanamicina (0,8 kb), de forma tal de adicionarle un marcador de selección y disminuir el tamaño de la isla roja. La cepa recombinante que se obtuvo en este proceso de mutagénesis fue denominada A1501C (Fig. 2.1_{M&M}).

En segundo lugar, para mediar la transferencia desde A1501C hacia *P. protegens* Pf-5 de la isla roja marcada con kanamicina que posee un tamaño de 42,5 kb, fue necesario un cósmido de un tamaño inferior a 7,5 kb ya que para alcanzar una buena eficiencia en el empaquetamiento en la cápside del bacteriófago λ es recomendable que la molécula a transferir, no supere un tamaño de 50 kb. Teniendo en cuenta estas limitaciones, se seleccionó el cósmido más pequeño disponible en la actualidad: SuperCos1 (7,9 kb). Como se mencionó anteriormente, este tamaño no es suficientemente pequeño, por lo tanto, fue necesario modificarlo para disminuir su tamaño, aún más. Para ello, se delecionaron regiones que no son necesarias para el funcionamiento del cósmido en bacterias pero sí en la transformación de células eucariotas, se delecionó del cósmido SuperCos1 el promotor pSV40 y el gen de resistencia a neomicina (Fig. 2.2_{M&M}). De esta forma, se obtuvo el cósmido recombinante pSC2, que mantiene la funcionalidad en bacterias del cósmido original, pero posee un tamaño de tan solo 6,7 kb (Fig. 2.2_{M&M}).

Luego, se construyó una biblioteca de cósmidos recombinantes conteniendo el ADN genómico de la cepa A1501C. Por selección con los antibióticos kanamicina (KmR), presente en la isla genómica, y ampicilina (AmpR), resistencia dada por el cósmido, se identificó el cósmido X940 el cual posee los 52 genes *nif* correspondientes a las regiones PST_1302-PST_1306 y PST_1313-PST_1359 de la bacteria *P. stutzeri* A1501.

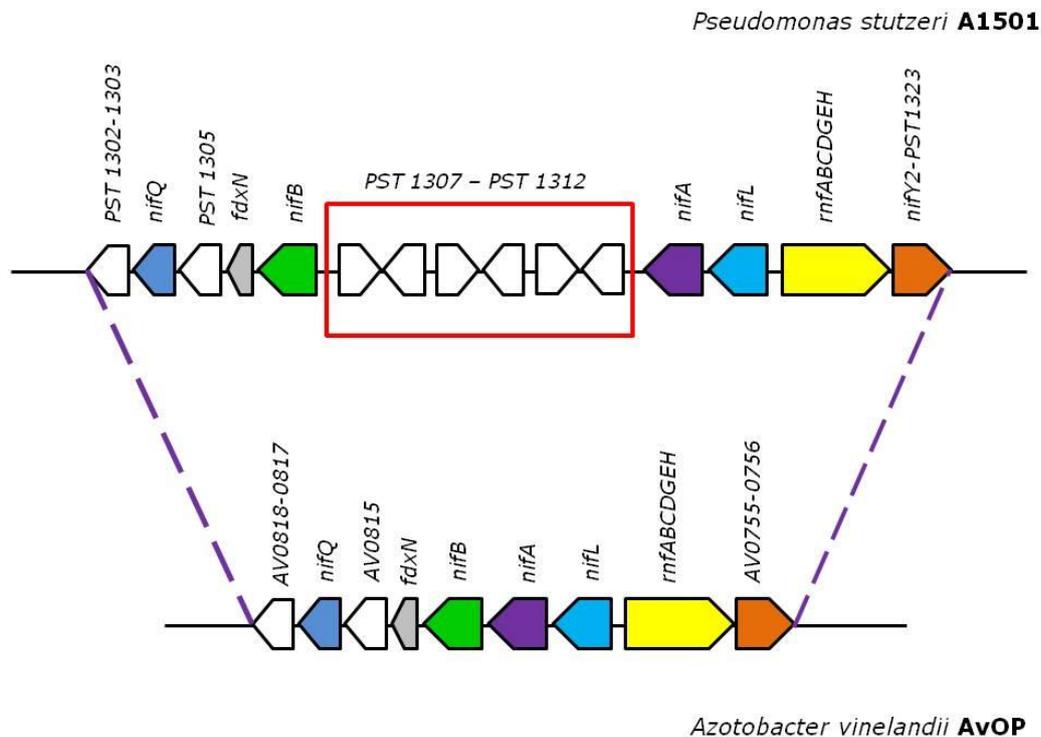


Figura 2.1: Esquema de la organización de un *clusters* de genes *nif* de *Pseudomonas stutzeri* A1501: Comparación de un *cluster* de genes *nif* ortólogos con alta homología a nivel de proteína de *Azotobacter vinelandii* AvOP con *P. stutzeri* A1501. Los segmentos con el mismo color corresponden a ortólogos. Segmentos sin color corresponden a genes adicionales de los cuales se desconoce su función dentro o fuera del *cluster* de genes *nif* (adaptado de Yan *et al.*, 2008).

Una vez obtenido el cósmido X940, el cual no replica en bacterias del género *Pseudomonas*, se transformó la cepa *P. protegens* Pf-5, la cual fue elegida como bacteria receptora ya que su genoma se encuentra secuenciado y se puede afirmar que no posee genes *nif*, además de ser una bacteria ampliamente utilizada como modelo de posibles inoculantes por su capacidad de producir factores del crecimiento vegetal y péptidos antimicrobianos, los cuales contribuyen a aumentar la productividad de los cultivos y ayuda a controlar un amplio espectro de enfermedades fúngicas y bacterianas. La cepa recombinante obtenida se denominó *P. protegens* Pf-5 X940. En dicha cepa, se confirmó la presencia del gen *nifH* por PCR a partir de ADN genómico de *P. protegens* Pf-5 X940, obteniéndose de la reacción de amplificación una banda de 950 pb correspondiente a un fragmento del gen *nifH*, que coincide con el tamaño encontrado en la cepa dadora de los genes *nif*, esta es *P. stutzeri* A1501.

Además, no se observó amplificación en la cepa salvaje, *P. protegens* Pf-5 lo que permitió confirmar la ausencia de genes *nif* en dicha cepa (Fig. 2.2.A). Para verificar la integridad del ADN genómico utilizado en estas reacciones de PCR, se amplificó un fragmento del gen 16S ARNr en estas tres cepas. En todos los casos, se obtuvieron productos del tamaño esperado (Fig. 2.2.B).

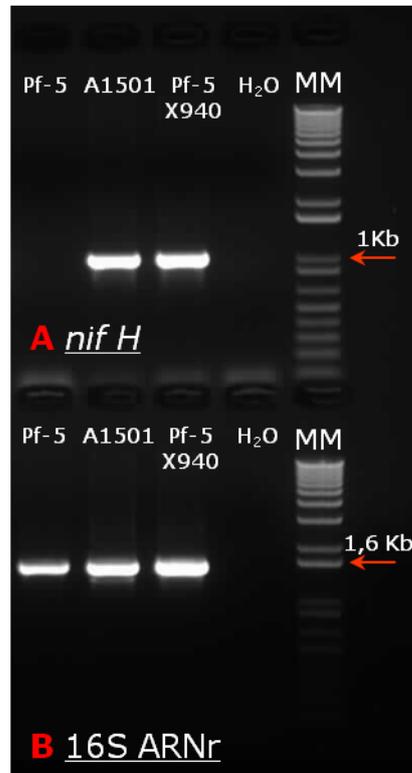


Figura 2.2: Análisis por PCR a partir del ADN genómico para evaluar la presencia del gen *nifH*: Se presenta un gel de agarosa con bandas de 950 pb obtenidas por PCR de ADN genómico del gen *nifH* (A) y bandas de 1500 pb correspondientes al gen 16S ARNr usado para evaluar la integridad/calidad del ADN (B) 1- *P. protegens* Pf-5, 2- *P. stutzeri* A1501 (control positivo), 3- *P. protegens* Pf-5 X940, 4- Control Negativo (H₂O). Marcador de Peso Molecular (MM): 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®, EUA).

Luego de confirmar la presencia del gen *nifH* en la bacteria *P. protegens* Pf-5 X940, se determinó el número de copias del cósmido X940 insertadas en el genoma de esta cepa recombinante. Para ello, se utilizó la técnica de *Southern blot*, la misma se llevó a cabo en fragmentos de ADN genómico digeridos con diferentes enzimas de restricción, *Xho*I, *Hind*III y ambas combinadas, en los tres casos, se pudo corroborar la inserción de una única copia del cósmido X940 con fragmentos de digestión de un peso molecular entre 16 y 18 kb (Fig. 2.3).

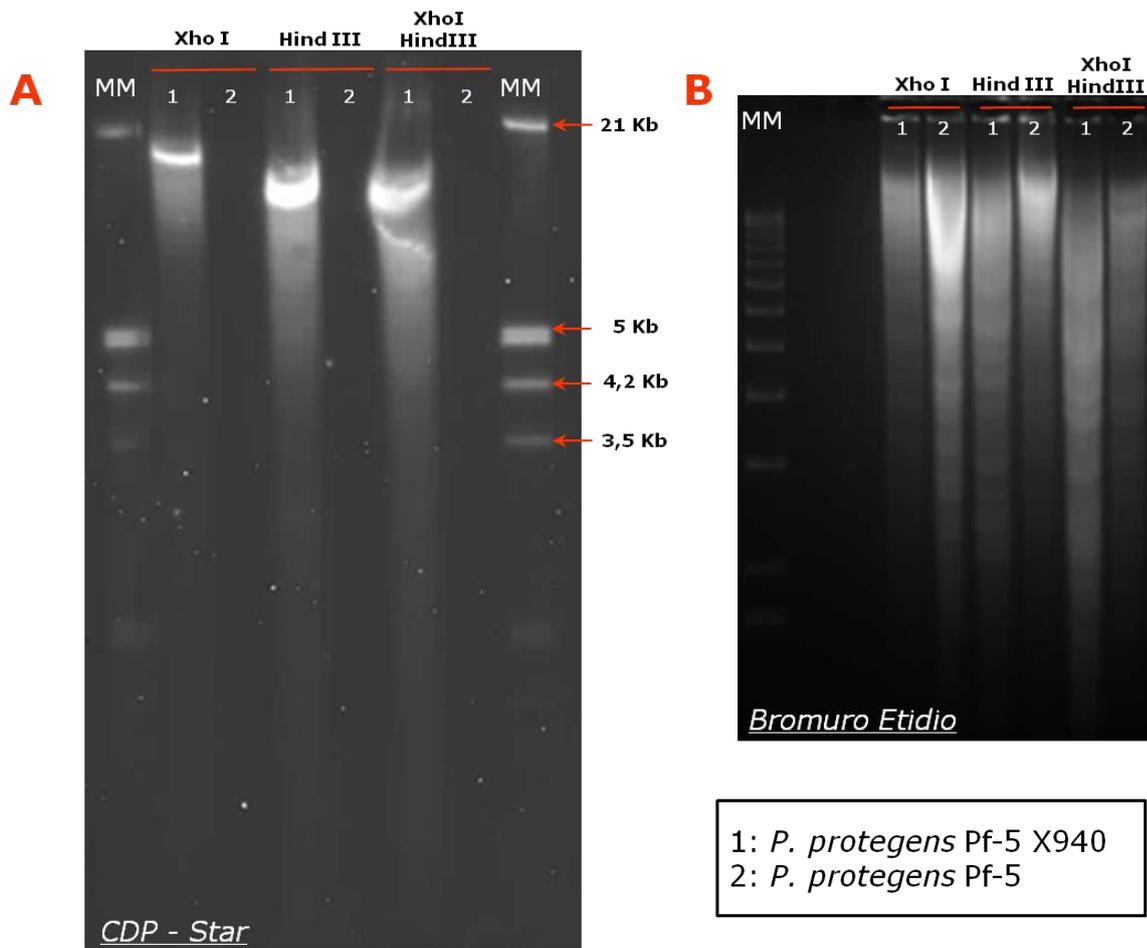


Figura 2.3: Análisis por *Southern blot* del número de copias insertadas del cósmido X940 en el genoma de la bacteria *P. protegens* Pf-5 X940: **A-** Detección por quimioluminiscencia CDP-Star de la región PST_1302-PST_1306 en ADN genómico de *P. protegens* Pf-5 X940 (1) y *P. protegens* Pf-5 (2) digerido con *XhoI*, *HindIII* o Doble digestión *XhoI* + *HindIII*, MM: Dig marker III (Roche, Suiza) **B-** Digestión de ADN genómico en gel de agarosa al 1% (en TAE 1X con Bromuro de etidio 0,05 mg/ml) Marcador de Peso Molecular (MM): 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®, EUA) revelado con bromuro de etidio.

Además, mediante un caminado genómico, realizado directamente sobre el ADN genómico, fue posible determinar el lugar de inserción del cósmido X940 dentro del genoma de la cepa salvaje, *P. protegens* Pf-5. La secuenciación, de estos fragmentos, del caminado genómico, indicó que el cósmido X940 fue insertado en la región intergénica localizada entre los siguientes *loci*: PFL_0092 – PFL_0093 (Fig. 2.4).

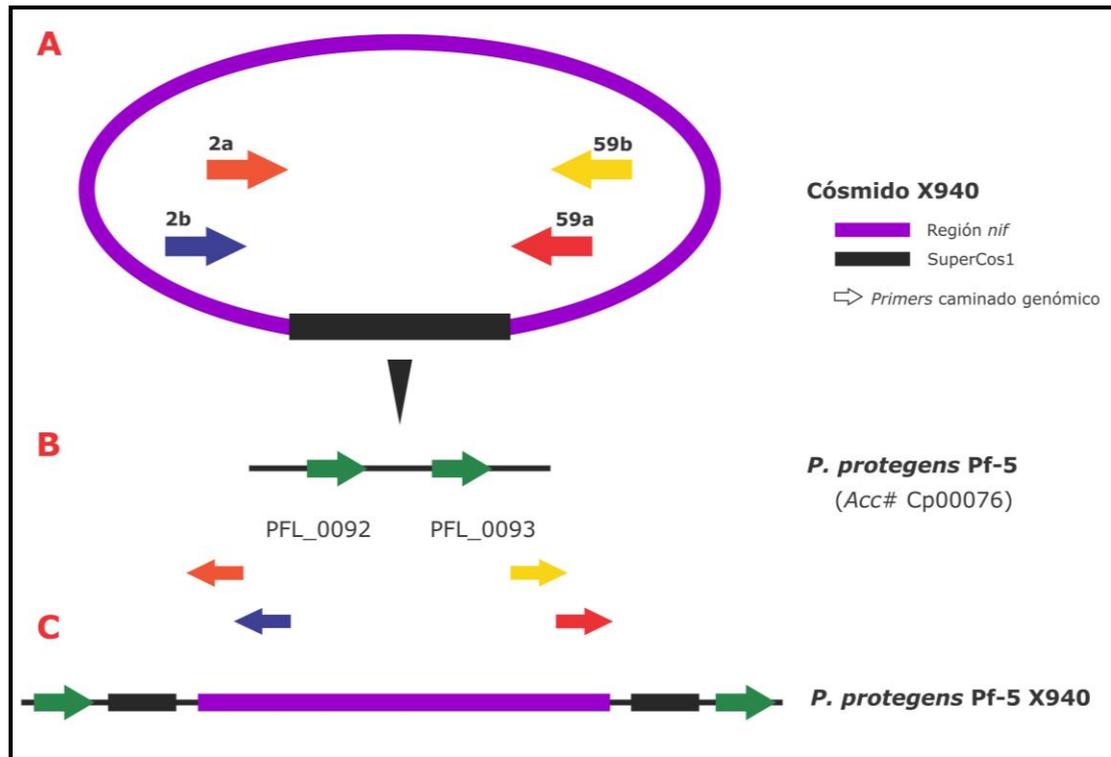
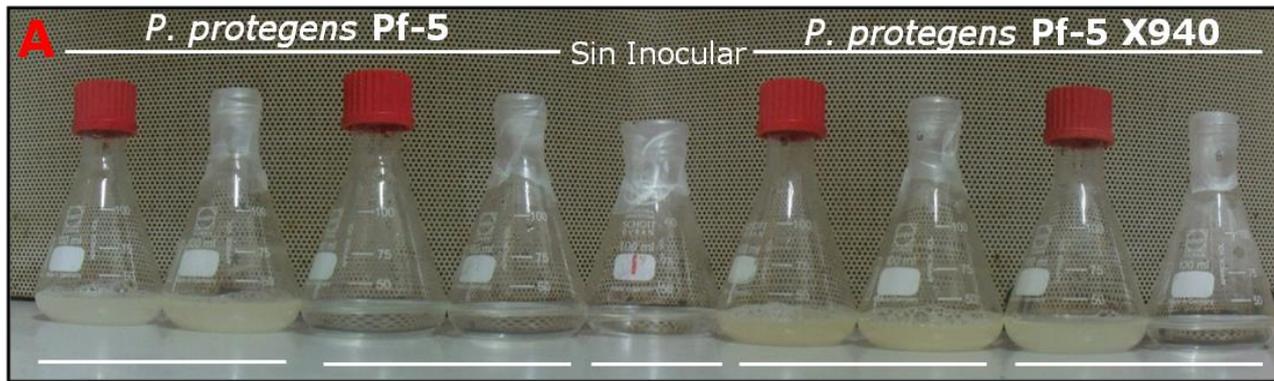


Figura 2.4: Esquema de la inserción del cósmido recombinante X940 en el genoma de *P. protegens* Pf-5: **A-** Esquema del cósmido X940 en la que se indican el cósmido pSC2 (negro), la región *nif* (violeta), los *primers* diseñados para el caminado genómico (flechas de colores). **B-** Región intergénica PFL_0092 – PFL_0093 (flechas verdes) del genoma de *P. protegens* Pf-5 (Acc. #: CP000076). **C-** Punto de inserción del cósmido X940 en el genoma de *P. protegens* Pf-5 X940.

2.3.2- Evaluación del crecimiento de *Pseudomonas protegens* Pf-5 X940 en condiciones restrictivas de nitrógeno

Como un primer paso para estudiar la posible funcionalidad del complejo nitrogenasa heterólogo, se evaluó tanto el crecimiento de la cepa salvaje (*P. protegens* Pf-5) como de la cepa recombinante (*P. protegens* Pf-5 X940) durante 48 horas por medición de la densidad óptica (DO₅₈₀) del medio de cultivo (dato no mostrado) (Fig. 2.5.A) y por recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) (Fig. 2.5.B). El crecimiento se evaluó en cultivos realizados en medio semi-sintético L con el agregado de sulfato de amonio [+ (NH₄)₂SO₄] o sin el agregado de este [- (NH₄)₂SO₄]. Se les otorgaron ambientes con distinta disponibilidad de O₂; para ello se utilizaron Erlenmeyers cerrados con *parafilm* o con tapa plástica, y estas condiciones fueron denominadas como: “aerobiosis” y “microaerobiosis”, respectivamente.



+[(NH₄)₂SO₄] - [(NH₄)₂SO₄] +[(NH₄)₂SO₄] +[(NH₄)₂SO₄] - [(NH₄)₂SO₄]

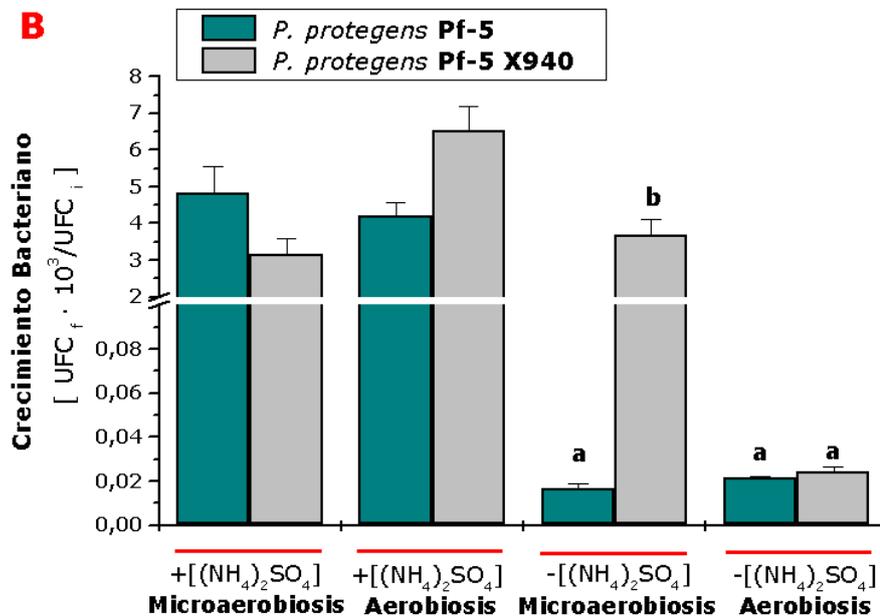


Figura 2.5: Evaluación del crecimiento de *P. protegens* Pf-5 X940 en condiciones restrictivas de nitrógeno con diferente disponibilidad de O₂ (“aerobiosis” vs. “microaerobiosis”). El crecimiento de *P. protegens* Pf-5 (verde) y *P. protegens* Pf-5 X940 (gris) de cultivos líquidos crecidos en medio L con + [(NH₄)₂SO₄] y sin - [(NH₄)₂SO₄] en condiciones de “microaerobiosis” (Erlenmeyers con tapa plástica) o de “aerobiosis” (Erlenmeyers cubiertos con *parafilm*). **A-** Se analizó por comparación, luego de 48 h de incubación, por turbidimetría. **B-** Se estableció la relación entre el recuento de unidades formadoras de colonia iniciales (UFC_i) y finales (UFC_f). El análisis estadístico se realizó por un ANOVA seguido de un contraste mediante la prueba de *Tukey*. Las letras corresponden a los tratamientos comparados, misma letra corresponde a tratamientos sin diferencia significativa, entre (a) y (b) presentan una diferencia significativa con un $p < 0,001$.

Durante las primeras 24 horas, se observó crecimiento solo en los cultivos con agregado de nitrógeno (datos no mostrados), mientras que después de 48 horas, también se observó un crecimiento significativo en el cultivo *P. protegens* Pf-5 X940 en medio L sin adición de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bajo la condiciones de “microaerobiosis”, lo cual sugiere que la bacteria recombinante es capaz de fijar nitrógeno y crecer en medios deficientes en nitrógeno (Fig. 2.5.A). Esta bacteria recombinante no mostró un crecimiento significativo en medio L deficiente en nitrógeno en condiciones de “aerobiosis” lo que sugiere que el complejo nitrogenasa heterólogo sería activo solo con baja tensión de O_2 , aunque el experimento desarrollado no permita especificar cuan baja debe ser la tensión de O_2 . En el medio L sin agregado de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y en condiciones de “aerobiosis” el número de bacterias de *P. protegens* Pf-5 aumentó tan solo dos veces (probablemente debido a una división celular residual), mientras que el número de bacterias de *P. protegens* Pf-5 X940 aumentó más de tres órdenes de magnitud (que correspondería a aproximadamente 12 generaciones) (Fig. 2.5.B), lo que sugiere que la cepa recombinante tendría un mayor *fitness* que la cepa salvaje en condiciones restrictivas de nitrógeno en “microaerobiosis”

2.3.3- Adaptación del complejo heterólogo nitrogenasa a *Pseudomonas protegens* Pf-5

Para evaluar la adaptación del complejo nitrogenasa a la nueva bacteria huésped, se analizó la actividad nitrogenasa de *P. protegens* Pf-5 X940 en medio L, tanto en condiciones de exceso [+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] como de deficiencia [- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] de nitrógeno bajo una atmósfera de argón (1% de O_2 , 10% de acetileno). Como se esperaba, no se observó actividad nitrogenasa en la bacteria salvaje, *P. protegens* Pf-5 (< 1nmol etileno/h/mg de proteína). Por el contrario, la bacteria recombinante, que posee los genes *nif*, mostró actividad nitrogenasa (> 4000 nmol etileno/h/mg de proteína), pero presenta un fenotipo atípico (Fig. 2.6.A). En primer lugar, la actividad nitrogenasa de esta cepa, *P. protegens* Pf-5 X940, en presencia de amonio, esta presente, contrastando con el comportamiento de las cepas naturales tales como *P. stutzeri* A1501 en medio L con amonio, sugiriendo que la actividad nitrogenasa de *P. protegens* Pf-5 X940 es constitutiva (Fig. 2.6.A). Además, no hubo evidencia de desrepresión de la nitrogenasa. Por otra parte, se analizó por RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR) la expresión de un regulador transcripcional positivo (*nifA*) y de dos componentes del complejo nitrogenasa, uno de biosíntesis (*nifB*) y otro estructural (*nifH*) en *P. protegens* Pf-5 X940 crecida en condiciones de exceso y deficiencia de nitrógeno. En ambas condiciones se pudo detectar la expresión de los tres genes estudiados, con una fuerte inducción de los genes *nifB* y *nifH* en ausencia de amonio (Fig. 2.7). También, se pudo observar que independientemente del contenido de nitrógeno en el medio de cultivo, el gen *nifA* presenta niveles de expresión menores respecto de los observados para los genes *nifB* y *nifH* como es esperable para un regulador transcripcional.

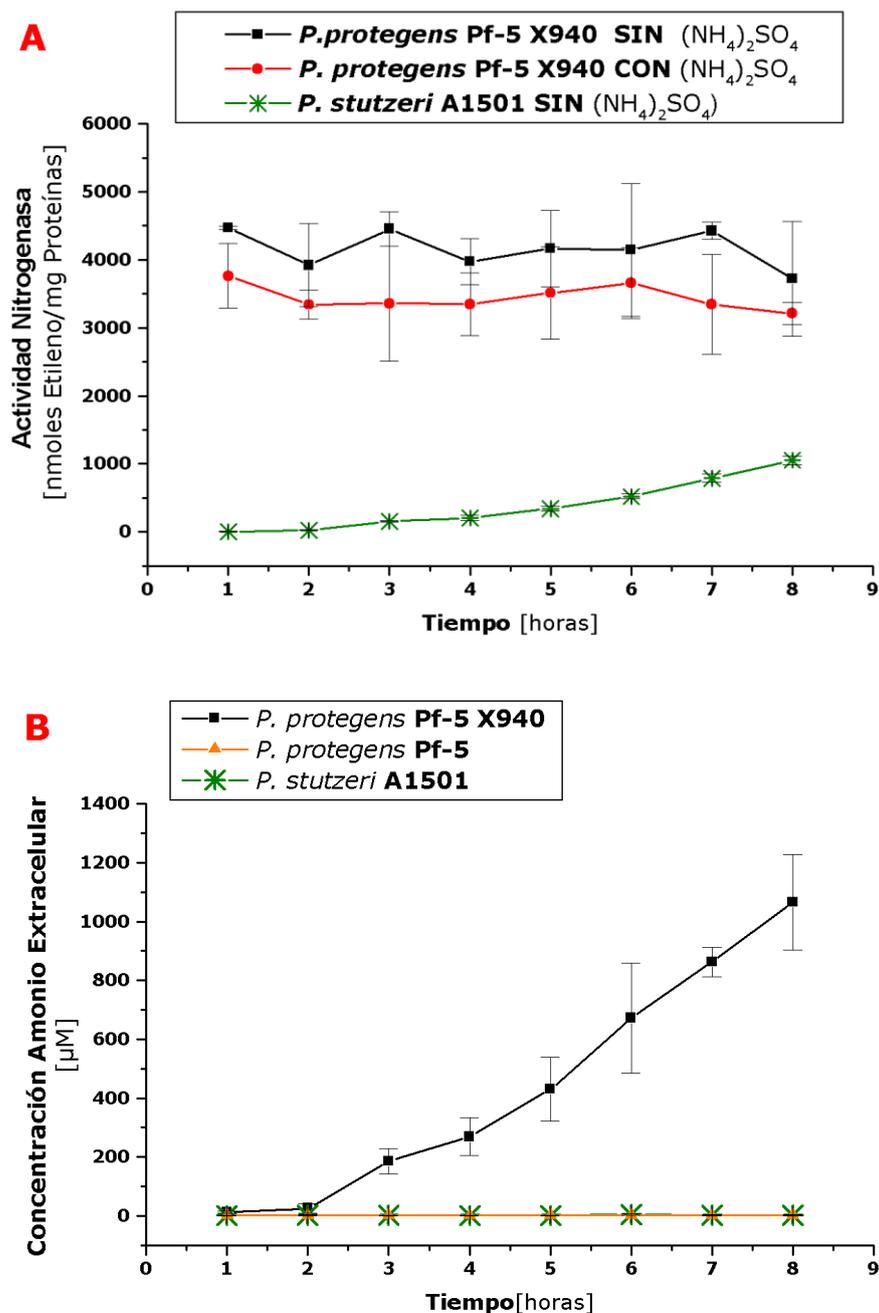


Figura 2.6: Evaluación de la actividad nitrogenasa y medición de los niveles de producción de amonio extracelular en cultivos de *P. protegens* Pf-5 X940: **A-** Se evaluó la actividad nitrogenasa por reducción de acetileno en cultivos bajo una atmósfera de argón con 1% de O₂ y 10% de acetileno en medio L sin (NH₄)₂SO₄ en *P. protegens* Pf-5 X940 (cuadrado negro) y en *P. stutzeri* A1501 (estrella verde); también en medio L con (NH₄)₂SO₄ en *P. protegens* Pf-5 X940 (puntos rojos). Los valores corresponden a la media ± SEM de la concentración medida tres veces en forma independiente. **B-** La concentración de amonio liberado al espacio extracelular se midió en cultivos en medio L sin (NH₄)₂SO₄ bajo una atmósfera de dinitrógeno, determinado por el método del indofenol. *P. protegens* Pf-5 X940 (cuadrado negro), *P. stutzeri* A1501 (estrella verde) y *P. protegens* Pf-5 (triángulo invertido naranja). Las concentraciones graficadas corresponden a la media ± SEM medida tres veces en forma independiente.

Esto es consistente con las funciones descriptas para estos tres genes dado que, los factores de transcripción se expresan en menor medida que los genes estructurales. Si bien los niveles de expresión encontrados para el gen *nifA* no presentan una diferencia significativa en presencia o ausencia de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; en presencia de este compuesto nitrogenado se registró una menor expresión del regulador transcripcional (Fig. 2.7.A), lo cual, probablemente, es responsable de la menor expresión de sus genes blanco, *nifB* y *nifH* (Fig. 2.7. B-C). Este resultado sugiere que la cepa *P. protegens* Pf-5 X940 conserva, al menos en parte, el sistema de represión de la expresión de genes *nif* bajo condiciones de exceso de nitrógeno. Además, la actividad nitrogenasa constitutiva en *P. protegens* Pf-5 X940 se asoció con una alta producción de amonio encontrada en el medio L en condiciones deficientes de nitrógeno (Fig. 2.6.B). Con el fin de evaluar el posible rol de la región PST_1307-PST_1312, presente en la cepa *P. stutzeri* A1501 pero ausente en la cepa *P. protegens* Pf-5 X940, en este fenotipo inusual de expresión de genes *nif* y actividad nitrogenasa descrita en la cepa *P. protegens* Pf-5 X940, se construyó la cepa recombinante *P. protegens* Pf-5 X940(2), la cual deriva de la bacteria *P. protegens* Pf-5 X940 pero con el agregado de la región PST_1307-PST_1312. Por lo tanto, *P. protegens* Pf-5 X940(2) posee la isla roja completa de la cepa *P. stutzeri* A1501 (PST_1302-PST_1359). Esta nueva bacteria recombinante muestra una actividad nitrogenasa, producción de amonio y un patrón de expresión génica similar a *P. protegens* Pf-5 X940, lo que sugiere que la región PST_1307-PST_1312 no participaría en la adaptación de los genes *nif* a un nuevo huésped (Fig. 2.8; Fig. 2.9).

2.3.4- Transferencia de los genes *nif* a otras cepas del género *Pseudomonas*

Para evaluar si es posible transferir a otras cepas la capacidad de fijar nitrógeno a través de la metodología de ingeniería genética desarrollada en este trabajo, se transformaron con el cósmido recombinante X940 las siguientes bacterias: *Pseudomonas balearica* SP 1402, *P. putida* KT 2440, *P. stutzeri* CCUG 11256, *P. taetrolens* IAM 1653 y *P. veronii* DSM11331. En primer lugar, se chequeó la transferencia del cósmido recombinante a través de una PCR sobre el gen *nifH* utilizando ADN genómico como templado; en ninguna de las cepas salvajes se observó amplificación, confirmando que no poseían estos genes antes de la transformación; en cambio en las cepas recombinantes se obtuvo una banda de 950 bp correspondiente a un fragmento del gen *nifH* coincidiendo con el fragmento obtenido en la cepa dadora, *P. stutzeri* A1501 (Fig. 2.10).

Con el fin de conocer si el complejo nitrogenasa heterólogo es funcional en diversas especies del género *Pseudomonas*, se evaluó la actividad nitrogenasa de cada una de estas cepas recombinantes; este análisis experimental permitió corroborar la actividad nitrogenasa en todas las bacterias recombinantes (Fig. 2.11.A).

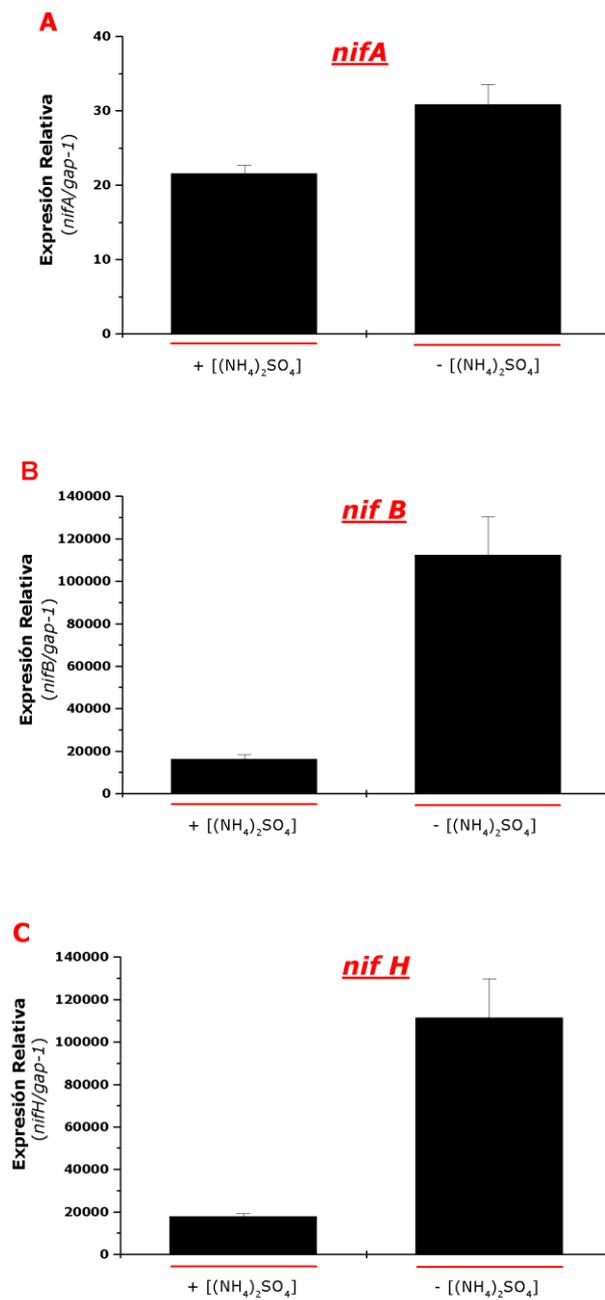


Figura 2.7: Estudio de la expresión de los genes *nifA*, *nifB* y *nifH* en la bacteria *P. protegens* Pf-5 X940: Se realizó el estudio de la expresión de los genes: **A-** *nifA*, **B-** *nifB* y **C-** *nifH* de *P. protegens* Pf-5 X940 en presencia [+ (NH₄)₂SO₄] o ausencia [- (NH₄)₂SO₄] de nitrógeno por RT-qPCR. La abundancia de transcripción de los genes estudiados fue relativizada para un gen de expresión constitutiva en *Pseudomonas* (*gap-1*). Los valores representan la media ± SEM de tres experimentos independientes.

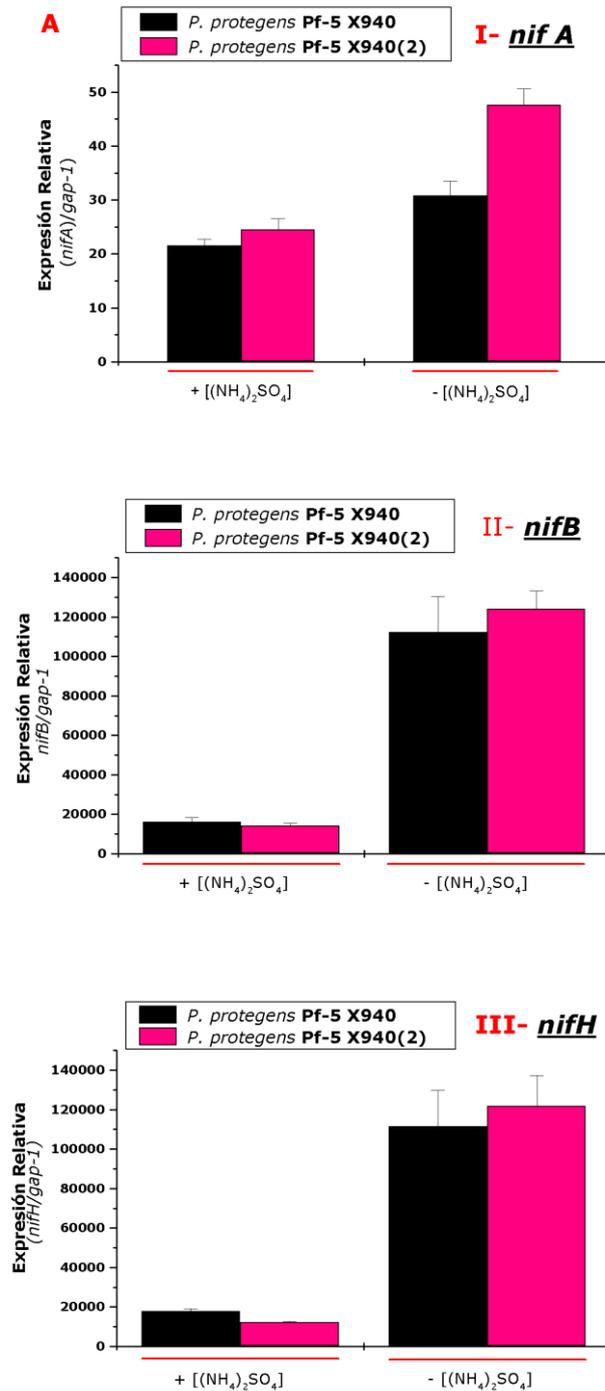


Figura 2.8: Comparación de la expresión de los genes *nifA*, *nifB* y *nifH* de las bacterias *P. protegens Pf-5 X940* vs. *P. protegens Pf-5 X940(2)*: A- El estudio de la expresión de los genes *nifA* (I), *nifB* (II) y *nifH* (III) se realizó mediante RT-qPCR en presencia +[(NH₄)₂SO₄] o ausencia -[(NH₄)₂SO₄] de nitrógeno en cultivos de *P. protegens Pf-5 X940* (negro) y *P. protegens Pf-5 X940(2)* (fucsia). Los resultados se expresan relativizados para el gen *gap-1*.

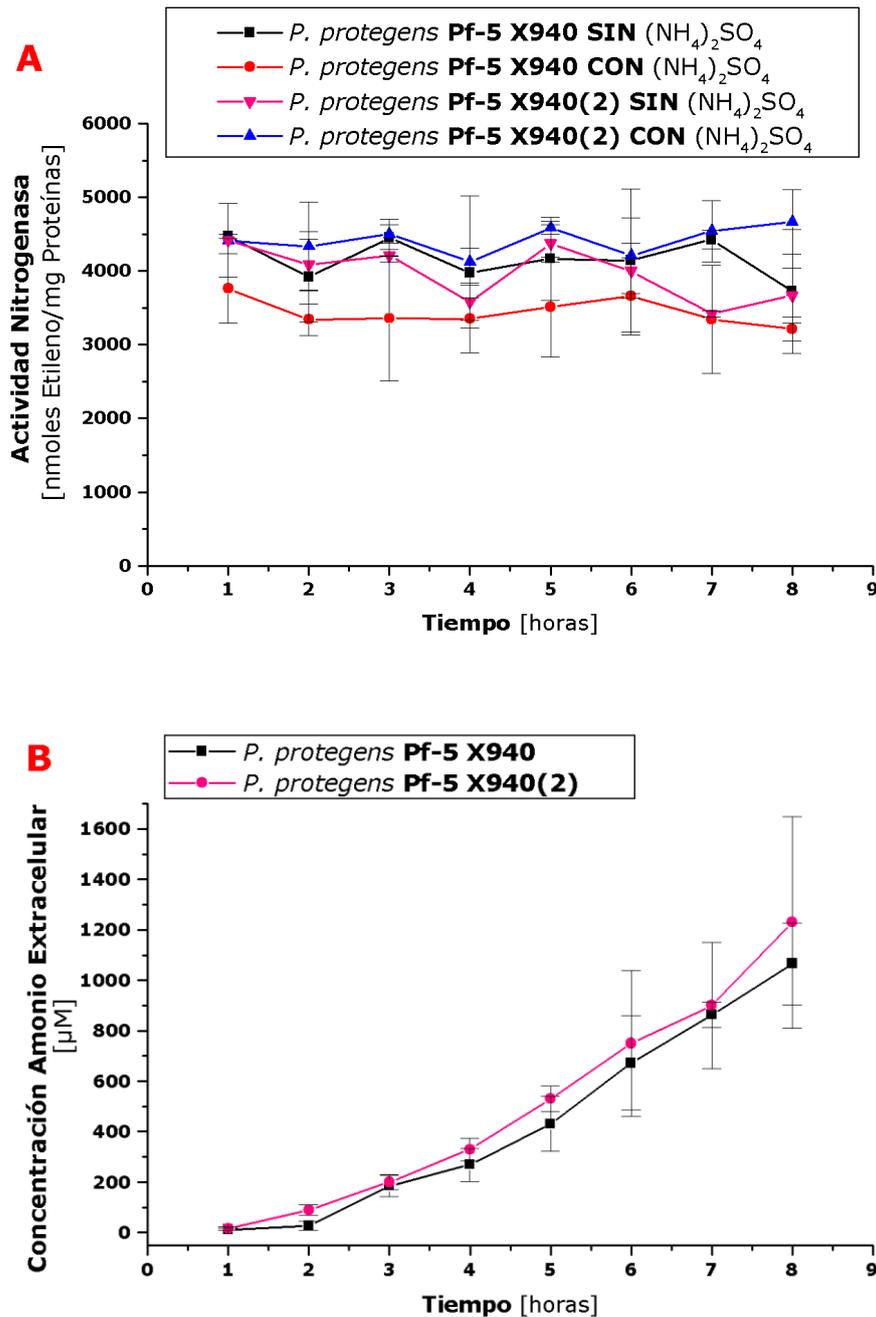


Figura 2.9: Comparación de la actividad nitrogenasa y producción de amonio extracelular de las bacterias *P. protegens* Pf-5 X940 vs. *P. protegens* Pf-5 X940(2): **A-** La evaluación de la actividad nitrogenasa por reducción de acetileno bajo una atmósfera de argón con 1% de O_2 y 10% de acetileno en medio L en cultivos de *P. protegens* Pf-5 X940 SIN $(NH_4)_2SO_4$ (cuadrado negro), *P. protegens* Pf-5 X940 CON $(NH_4)_2SO_4$ (círculo rojo) *P. protegens* Pf-5 X940(2) SIN $(NH_4)_2SO_4$ (triángulo invertido rosa) y *P. protegens* Pf-5 X940(2) CON $(NH_4)_2SO_4$ (triángulo azul). **B-** La medición de la concentración de amonio liberado al espacio extracelular en cultivos en medio L sin $(NH_4)_2SO_4$ bajo una atmósfera de dinitrógeno fue determinada por el método del indofenol en *P. protegens* Pf-5 X940 (cuadrado negro) y *P. protegens* Pf-5 X940(2) (triángulo invertido rosa). Las mediciones graficadas corresponden a la media \pm SEM medida tres veces en forma independiente.

Los resultados obtenidos sugirieron que la metodología desarrollada en este trabajo para la transferencia de un complejo nitrogenasa no está restringida a la cepa *P. protegens* Pf-5. Además, se observó que las cepas *P. balearica* SP1402 X940 y *P. stutzeri* CCUG11256 X940, presentan el típico patrón de desrepresión de actividad nitrogenasa como el observado en *P. stutzeri* A1501; en cambio las cepas *P. putida* KT2440 X940, *P. taetrolens* IAM1653 X940 y *P. veronii* DSM11331 X940 presentan un patrón de actividad similar a *P. protegens* Pf-5 X940 indicando, nuevamente, que en este caso la actividad es constitutiva (Fig. 2.11.A).

Esta misma relación se observa al evaluar los niveles de producción de amonio (Fig. 2.11.B) donde las bacterias *P. putida* KT2440 X940, *P. taetrolens* IAM1653 X940 y *P. veronii* DSM11331 X940 presentan una alta producción de amonio, no observándose un incremento de la concentración del mismo en el medio extracelular de *P. balearica* SP1402 X940 y *P. stutzeri* CCUG11256 X940. Este fenotipo observado en las distintas cepas recombinantes sugiere que la adaptación del complejo nitrogenasa a la célula huésped depende del contexto genómico.

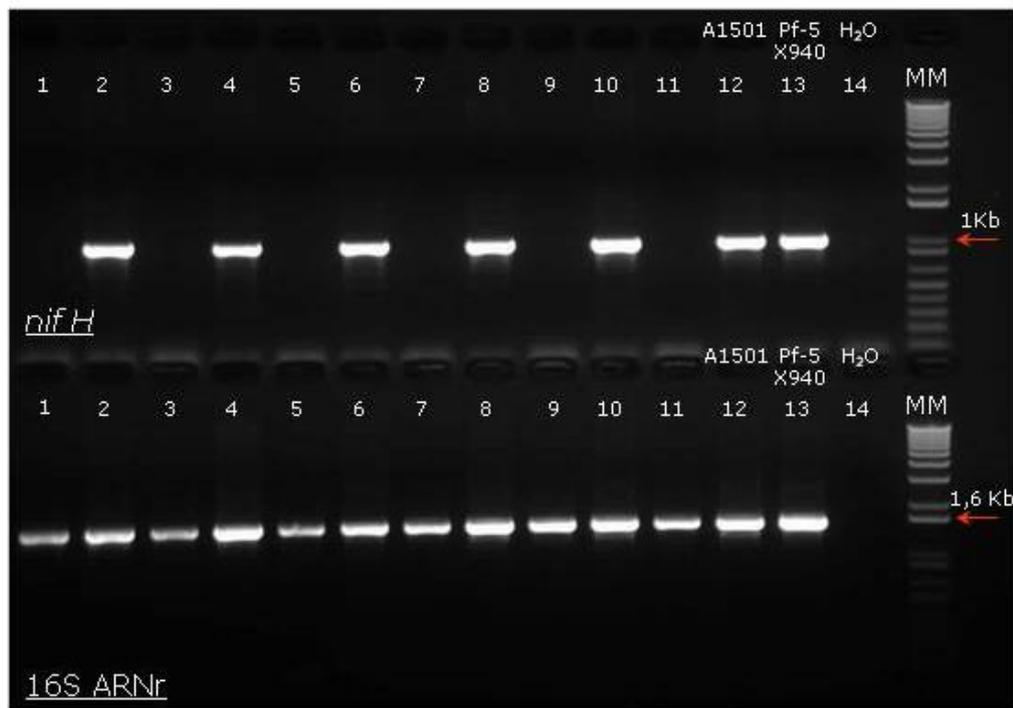


Figura 2.10: Análisis por PCR a partir del ADN genómico para evaluar la presencia del gen *nifH*: Se presenta un gel de agarosa con bandas de 950 pb obtenidas por PCR de ADN genómico del gen *nifH* (A) y bandas de 1500 pb correspondientes al gen 16S ARNr usado como control positivo de la integridad del ADN genómico como templado de la PCR (B) 1- *P. stutzeri* CCUG 11256, 2- *P. stutzeri* CCUG 11256 X940, 3- *P. putida* KT 2440, 4- *P. putida* KT 2440 X940, 5- *P. veronii* DSM 11331, 6- *P. veronii* DSM 11331 X940, 7- *P. taetrolens* IAM 1653, 8- *P. taetrolens* IAM 1653 X940, 9- *P. balearica* SP 1402, 10- *P. balearica* SP 1402 X940, 11- *P. protegens* Pf-5, 12- *P. stutzeri* A1501 (control positivo), 13- *P. protegens* Pf-5 X940, 14- Control Negativo (H₂O). Marcador de Peso Molecular (MM): 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®, EUA).

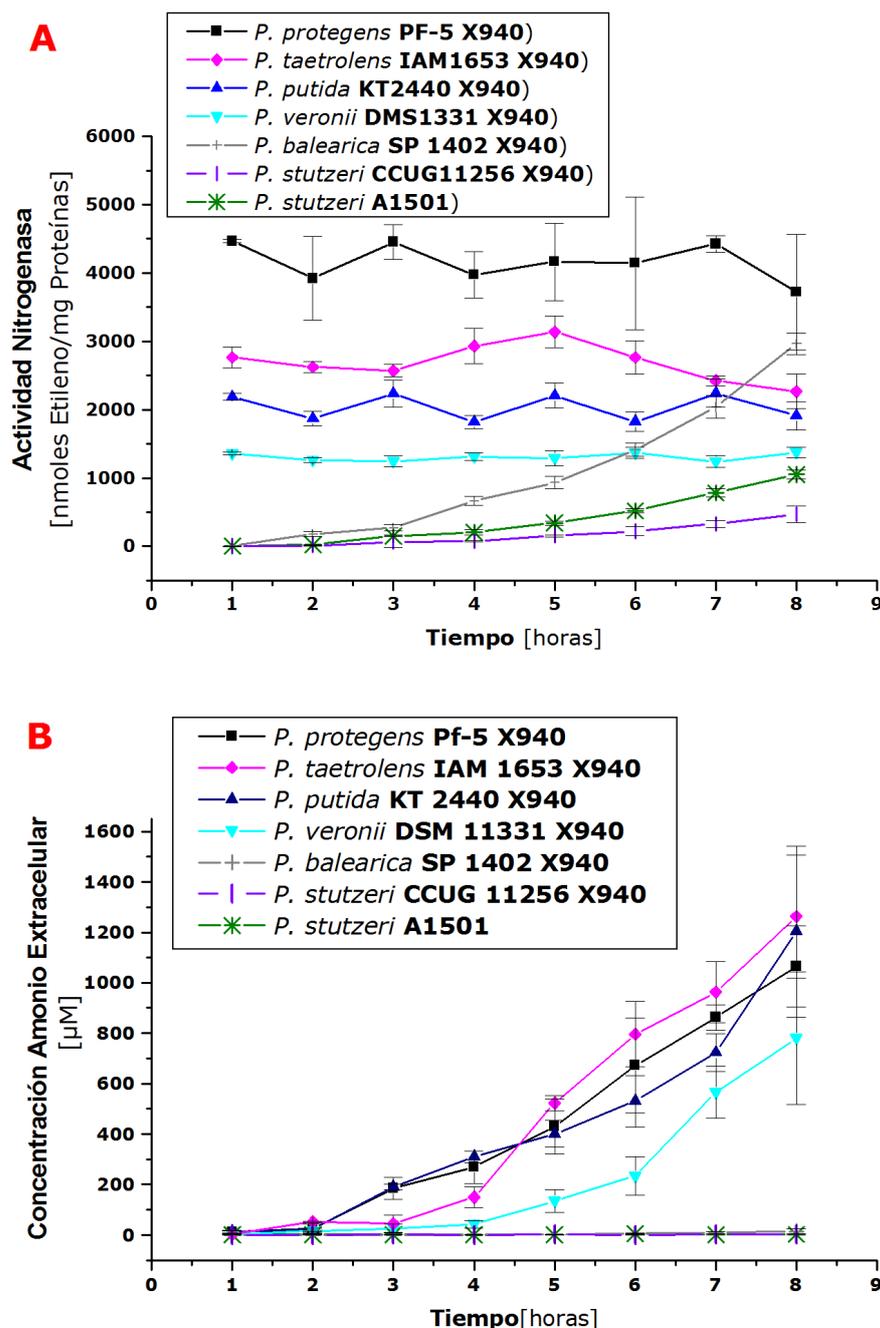


Figura 2.11: Evaluación de la actividad nitrogenasa y producción de amonio extracelular en *Pseudomonas* recombinantes portadoras del cósmido X940. A- Se evaluó la actividad nitrogenasa por reducción de acetileno en condiciones de microaerobiosis bajo una atmósfera de argón con 1% de O_2 y 10% de acetileno en medio L sin $(NH_4)_2SO_4$. y B- Se midió la concentración de amonio liberado al espacio extracelular en cultivos en medio L sin $(NH_4)_2SO_4$ bajo una atmósfera de dinitrógeno por el método del indofenol en cultivos de *P. protegens* PF-5 X940 (cuadrado negro), *P. taetrolens* IAM 1653 X940 (diamante rosa), *P. putida* KT 2440 X940 (triángulo azul francia), *P. veronii* DSM11331 X940 (triángulo celeste invertido), *P. balearica* SP 1402 X940 (cruz gris), *P. stutzeri* CCUG 11256 X940 (barra violeta) y *P. stutzeri* A1501 (estrella verde). Las concentraciones graficadas corresponden a la media \pm SEM medida tres veces en forma independiente.

2.4- Discusión

Las secuencias genómicas disponibles y la identificación *in silico* de las islas genómicas que contienen los genes *nif* en los genomas de las especies pertenecientes al género *Pseudomonas sensu stricto*⁽³⁾ (Yan *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2011) sugiere que en su origen este género bacteriano no contenía una nitrogenasa y que la misma fue adquirida solo por algunos miembros por transferencia horizontal vía islas genómicas. Sin embargo, esto no es más que una especulación basada en un análisis bioinformático. Como se discute con mayor detalle más adelante. El presente trabajo ofrece evidencias empíricas de la transferencia funcional de un complejo nitrogenasa entre cepas del género *Pseudomonas*, no solo por la detección de la transferencia del cósmido X940, sino también, por la detección de la expresión de los genes *nif* y la actividad nitrogenasa heteróloga. Por lo tanto, los resultados presentados en este trabajo, son consistentes con la hipótesis de transferencia horizontal de genes *nif* en *Pseudomonas*.

En términos de manipulación genética y biotecnológica, el principal obstáculo para lograr una transferencia controlada y eficiente de genes *nif* entre cepas se debe a que aún no se conocen exactamente el número mínimo de genes esenciales para la biosíntesis de un complejo nitrogenasa funcional. En base a estudios experimentales y bioinformáticos se ha especulado que la biosíntesis y funcionalidad del complejo nitrogenasa requiere de un gran conjunto de genes, al menos 16 genes *nif* (Dixon *et al.*, 1997), que por lo general se localizan en diferentes regiones del genoma bacteriano (Dos Santos *et al.*, 2012), pero un estudio reciente ha identificado un microorganismo con una reducida complejidad genética, *Paenibacillus sp.* WLY78, el cual presenta un único operón con tan solo 9 genes *nif* (Wang *et al.*, 2013).

En el presente trabajo se utilizó la cepa *Pseudomonas protegens* Pf-5 como receptora de los genes *nif* de *P. stutzeri* A1501 (Fig. 2.1_{M&M}; Fig. 2.3_{M&M}; Fig. 2.2; Fig. 2.3). Dado que la secuencia del genoma completo de *P. protegens* Pf-5 está disponible (Paulsen *et al.*, 2005; Loper *et al.*, 2007), se puede afirmar que esta cepa no posee genes de fijación de nitrógeno. Por consiguiente, el crecimiento en ausencia de nitrógeno (Fig. 2.5), la expresión de los genes *nif* (Fig. 2.7) y la actividad de la nitrogenasa (Fig. 2.6) observados en la bacteria recombinante, *P. protegens* Pf-5 X940, es una fuerte evidencia empírica de la factibilidad de transferencia de un complejo nitrogenasa funcional entre dos cepas de *Pseudomonas*. El sistema de transferencia eficiente y controlada de los genes *nif* propuesto permitirá evaluar el número mínimo de genes esenciales requeridos para formar un complejo nitrogenasa funcional; lo cual se podría lograr ya sea, a través de deleciones de diferentes regiones del cósmido recombinante X940 o de nuevas construcciones. También, permitirá estudiar la adaptación de los genes *nif* a diferentes huéspedes, a partir del estudio de los perfiles de transcripción de estos genes y su actividad nitrogenasa de nuevas bacterias recombinantes.

⁽³⁾ *sensu stricto*: término que se añade al nombre científico con el propósito de especificar que el taxón se entiende en un sentido restringido o estrecho.

La cepa *P. protegens* Pf-5 X940 mostró una expresión constitutiva de los genes *nif* y altos niveles de actividad nitrogenasa ya sea en presencia como en ausencia de amonio en el medio (Fig. 2.6; Fig. 2.7). En este contexto, se podría explorar si el control positivo de la expresión de los genes *nif* se debe al rol de los factores de transcripción sigma nativos de la cepa huésped, presentes en el genoma de *P. protegens* Pf-5, o a través de NifA proveniente de *P. stutzeri* A1501. De acuerdo a los resultados obtenidos, el patrón diferencial de expresión génica y actividad enzimática de la nitrogenasa en los contextos genómicos de *P. stutzeri* A1501 y *P. protegens* Pf-5 pone de manifiesto que la regulación del complejo nitrogenasa depende de dicho contexto. Si bien no hay estudios de los mecanismos basales de la represión del complejo nitrogenasa por amonio en la cepa *P. stutzeri* A1501, es posible que las cepas de *Pseudomonas* recombinantes desarrolladas en este trabajo y aquellas que puedan derivar del mismo contribuyan a explorar más a fondo este mecanismo. Por otra parte, este trabajo ofrece un marco sólido para la manipulación genética del complejo nitrogenasa y un fenotipo de fijación de nitrógeno como el encontrado en la bacteria *P. protegens* Pf-5 X940 donde claramente no parece existir una represión de la nitrogenasa en condiciones de exceso de nitrógeno en el medio de cultivo (Fig. 2.6.A).

En asociación con la actividad nitrogenasa constitutiva de las cepas transformadas con el cósmido recombinante X940, se observó que: *P. protegens* Pf-5, *P. putida* KT2440, *P. veronii* DSM11331 y *P. taetrolens* IAM1653 liberan gran cantidad de amonio al medio (Fig. 2.11.B), lo que sugiere que la manipulación de la expresión de los genes *nif* y la actividad nitrogenasa podría tener efecto directo sobre la liberación de amonio al espacio extracelular. Del mismo modo, recientemente, se observó que los niveles de amonio liberado aumentan cuando un doble mutante *amtB* de *P. stutzeri* A1501 porta un plásmido que expresa el gen *nifA* bajo un promotor constitutivo en condiciones de fijación de nitrógeno (Zhang *et al.*, 2012).

La explicación más sencilla para este fenotipo es la acumulación intracelular de amonio producto de la actividad nitrogenasa constitutiva, y la posterior liberación del mismo al espacio extracelular. Esto se podría corroborar empíricamente, en el futuro, a través de la cuantificación de las concentraciones de amonio intra y extracelular de la bacteria *P. protegens* Pf-5 X940 que crece en medios libres o altamente deficientes en nitrógeno.

2.5- Conclusiones

A lo largo del desarrollo de este capítulo se encontró una fuerte evidencia empírica de que la capacidad de fijar nitrógeno en algunas cepas del género *Pseudomonas* se debe a que esta característica fue adquirida por transferencia horizontal vía isla genómica, a través de la cual adquirieron los genes responsables de la síntesis del complejo nitrogenasa. La herramienta de ingeniería genética propuesta hizo posible “empaquetar” los genes *nif* de *P. stutzeri* A1501, co-localizados en la isla genómica roja, en un cósmido recombinante, que permitió la transferencia de dichos genes a una cepa que carece de ellos, *P. protegens* Pf-5; en la cual no solo se observó la presencia del cósmido X940 sino que la presencia del mismo le otorgó la capacidad de crecer en un medio con baja disponibilidad de nitrógeno.

Bajo estas mismas condiciones se detectó la expresión de genes *nif* y que la actividad nitrogenasa heteróloga era constitutiva. Esta última característica también fue observada al transferir el cósmido X940 a otras cepas del mismo género.

La construcción del cósmido recombinante X940, portando los genes *nif*, ofrece una nueva tecnología no solo para lograr un mayor entendimiento del proceso de fijación biológica del nitrógeno sino también una alternativa para el desarrollo de bacterias recombinantes fijadoras cuya aplicación como inoculante podría aumentar la productividad de los cultivos en suelos deficientes de nitrógeno.

Capítulo III

Efecto de la inoculación de
Pseudomonas protegens Pf-5 recombinante
fijadora de nitrógeno en la productividad de
las plantas en condiciones
deficientes en nitrógeno

CAPÍTULO 3

3. Efecto de la inoculación de *Pseudomonas protegens* Pf-5 recombinante fijadora de nitrógeno en la productividad de las plantas en condiciones deficientes en nitrógeno

3.1- Introducción

3.1.1- Fijación biológica del nitrógeno: estudio como una nueva alternativa para aumentar la concentración de nitrógeno en suelos deficientes

Desde principios del siglo XX Sir William Crookes, director de la *British Association*, ya presentaba su preocupación acerca de la sustentabilidad de la producción de alimento respecto del incremento de la población mundial y presagia que la hambruna ocurriría en aproximadamente 30 años. Crookes reconoce que la producción de trigo fue limitada por el nitrógeno fijado disponible en el suelo y que la crisis podría ser una advertencia, para lo cual propone mejorar el suelo con el agregado de cantidades suficientes de fertilizantes nitrogenados (Rees *et al.*, 2005). Se podría decir que, desde ese entonces, esta propuesta guió la actividad agrícola y condujo a la llamada Revolución Verde en la cual se seleccionaron variedades altamente productoras que exhiben una diversidad genética limitada en presencia de fertilizantes químicos (Gutiérrez-Zamora & Martínez-Romero, 2001). Actualmente, debido al creciente costo en el precio de los fertilizantes, que se debe a la disminución constante en las reservas de petróleo; así como la baja eficiencia en el uso del fertilizante por parte de las plantas y el alto impacto en la salud ambiental (el aumento en las emisiones de óxido nítrico (NO₂), principal gas del efecto invernadero; la acidificación de los suelos; la eutroficación de las aguas subterráneas y la pérdida de la biodiversidad de los microorganismos fijadores) es necesario emprender la búsqueda de nuevas estrategias para aumentar la concentración del nitrógeno fijado en el suelo. Una de las propuestas es el uso de microorganismos fijadores de nitrógeno, diazótrofos. Actualmente, los diazótrofos son ampliamente utilizados en cultivos de leguminosas (alfalfa, haba, maní, soja, trébol, etc.) por la capacidad de estas especies de establecer asociaciones simbióticas con dichos microorganismos, los cuales le proveen entre 200 a 300 kg N/ha, dependiendo de la especie y las condiciones de cultivo, (Franche *et al.*, 2009). Lamentablemente, este tipo de simbiosis aún no han sido encontradas en la naturaleza entre los principales cultivos de cereales (p. ej. arroz, maíz y trigo), todos ellos con altos requerimientos de nitrógeno. Se estima que para producir una tonelada de grano con espiguillas se requiere agregar en arroz, maíz y trigo aproximadamente 16,5; 10 y 27 kg de fertilizante nitrogenado respectivamente (Kennedy *et al.*, 2004).

Una de las alternativas que se utilizan, en la actualidad, es el uso de inoculantes conocidos como biofertilizantes: sustancias que contiene microorganismos vivos, que al ser aplicados en la semilla, la superficie de las plantas o el suelo son capaces de colonizar, la rizósfera o el interior de la planta; y entonces promueven el crecimiento vegetal al incrementar la disponibilidad de los nutrientes primarios de la planta con la cual interactúan (Vessey, J., 2003). Los microorganismos utilizados son conocidos como promotores del crecimiento vegetal (PGPR); si bien algunos son diazótrofos, p. ej.: *Azoarcus sp.*, *Azospirillum brasilense*, *Burkholderia sp.*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*; las inoculaciones, en condiciones

controladas con estos microorganismos, no han podido revertir eficientemente los síntomas de deficiencia de nitrógeno en especies no fertilizadas (Kennedy *et al.*, 2004; Riggs *et al.*, 2001). Por lo tanto, su capacidad de incrementar los niveles de producción de los cultivos está dada por otros mecanismos tales como la inducción de fitohormonas y la liberación de sustancias antifúngicas en la rizósfera.

3.1.2- Hipótesis y objetivos

La cepa recombinante obtenida, *P. protegens* Pf-5 X940, mostró una alta actividad nitrogenasa tanto en condiciones restrictivas como en presencia de nitrógeno en el medio de cultivo y la capacidad de liberar altas concentraciones de amonio producido. Estas características observadas permiten pensar en el uso de esta cepa como un inoculante. Surge de esta manera la siguiente hipótesis:

“La inoculación de plantas superiores con *Pseudomonas protegens* Pf-5 recombinante expresando el complejo nitrogenasa de *Pseudomonas stutzeri* A1501 incrementa la productividad de dichas especies en suelos deficientes en nitrógeno”.

Para poner a prueba esta hipótesis se abordarán los siguientes objetivos:

- ✓ Evaluar el efecto de la inoculación de especies vegetales con la cepa *P. protegens* Pf-5 recombinante (X940) plantas monocotiledóneas: festuca alta (*Festuca arundinacea*) y maíz (*Zea mays*); y dicotiledóneas: alfalfa (*Medicago sativa*) y arabis (*Arabidopsis thaliana*), crecidas con baja disponibilidad de nitrógeno.
- ✓ Evaluar la persistencia de *P. protegens* Pf-5 X940 en el suelo.

Para el desarrollo del primer objetivo propuesto las especies vegetales elegidas fueron: arabis, seleccionada por ser una planta modelo; alfalfa, elegida entre las leguminosas dado sus altos requerimientos de nitrógeno y por la amplia experiencia del laboratorio en su cultivo; y como representantes de las monocotiledóneas se eligieron: festuca alta, por su importancia como forrajera, y maíz, por ser uno de los cereales más importantes a nivel mundial.

3.2- Materiales y Métodos

3.2.1- Material vegetal

Para el desarrollo de los ensayos de inoculación descritos en este capítulo fueron utilizadas las siguientes especies vegetales: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (arabis Columbia-0), *Medicago sativa* L. (alfalfa Forage Genetics 969), *Festuca arundinacea* Schreb. (festuca alta-TAITA Gentos), *Zea mays* L. (maíz PANNAR Pan 6326 RR2).

3.2.2- Ensayos de inoculación en hidropónia

Las especies utilizadas para realizar los ensayos de inoculación en hidropónia fueron: arabidopsis, alfalfa y festuca alta. Las semillas fueron esterilizadas superficialmente con una solución de cloro activo 55 mg/l y sembradas en macetas plásticas de 1 litro. Fueron lavadas, previamente, con alcohol etílico al 70 % (V/V), con sustrato estéril por calor seco: 350 °C por 30 minutos, luego se lavó dos veces con agua destilada estéril por inundación. Para cada especie se utilizaron distintas mezclas: perlita:turba:vermiculita (1:1:1 V/V) para arabidopsis; solo vermiculita para alfalfa y perlita:vermiculita (1:1 V/V) para festuca alta. Las semillas fueron vernalizadas por 5 días a 4 °C en oscuridad para sincronizar su crecimiento. El riego se realizó con la solución nutritiva INTA 13 (Cuadro 3.1_{M&M}); con el agregado de 1mM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ o sin este agregado; para comparar condiciones de cultivo con disponibilidad versus deficiencia de nitrógeno.

Los inóculos se prepararon a partir de cultivos de *P. protegens* Pf-5 X940, *P. protegens* Pf-5 y *P. stutzeri* A1501 crecidos *overnight* a $28^\circ \pm 1$ °C, en agitación (250 rpm), en medio L; se tomó una alícuota del cultivo (1 ml), centrifugó y resuspendió en 1 ml de solución fisiológica (0,9 % NaCl P/V).

Cuadro 3.1_{M&M}: Composición de la solución nutritiva INTA 13.

Componentes	Molaridad
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,88 mM
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1,014 mM
Na_2HPO_4	0,99 mM
KH_2PO_4	0,73 mM
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	4,13 μM
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	3,55 μM
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	4,01 μM
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	3,48 μM
H_3BO_3	16,17 μM
$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	14,8 μM
pH	6,5

Luego de la vernalización, se agregaron 200 μl de la solución bacteriana ($8 \times 10^8 - 2 \times 10^9$ UFC⁽⁴⁾/ml) directamente en el sustrato de cada maceta. También, a modo de control, se evaluaron plantas sin inocular. La inoculación con *P. stutzeri* A1501 solo se realizó para los ensayos de arabidopsis.

⁽⁴⁾ Unidades formadoras de colonias

Todas las especies fueron cultivadas en una cámara de cultivo a 23 °C con un fotoperíodo de 16 h luz y una intensidad lumínica de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$.

Luego de 40 días de cultivo se evaluaron los niveles de productividad de cada especie a través de la observación de distintos parámetros: para *arabidopsis* se midió el diámetro de la roseta medida en centímetros [cm], de ápice a ápice de las hojas más desarrolladas pasando por el centro de la roseta; en alfalfa se evaluó el peso fresco de planta entera en gramos [g] y en festuca alta se consideró el ancho de la segunda hoja, medida en la región medial en centímetros. En todos los casos se evaluaron 36 plantas en tres experimentos independientes (n=3), los resultados fueron analizados por ANOVA seguidos de un contraste de medias por la prueba de *Tukey*.

En el caso de *arabidopsis*, semanalmente se tomó una muestra de 500 μl de la solución de riego de cada tratamiento para medir la concentración de amonio; dicha medición se realizó por el método de indofenol (Chaney & Marbach, 1962) y los resultados fueron analizados por ANOVA de dos factores seguido de una prueba de *Tukey*.

3.2.3- Ensayos de inoculación en tierra

Los ensayos de inoculación en tierra se realizaron con maíz. Las semillas fueron sembradas en macetas plásticas de 10 litro, lavadas con alcohol etílico al 70 % (V/V); en este caso se utilizó como sustrato una mezcla de tierra:perlita (4:1 V/V). En el Cuadro 3.2_{M&M} se especifican las características de la tierra utilizada en este experimento, según el análisis brindado por el proveedor.

Los inóculos de *Pseudomonas protegens* Pf-5 y *P. protegens* Pf-5 X940 se prepararon como se describe en la sección 3.2.2, pero en este caso se utilizó 1 ml de la solución bacteriana ($8 \times 10^8 - 2 \times 10^9$ UFC/ml) que se agregó directamente en el sustrato de cada maceta; a modo de control se utilizaron plantas sin inocular. También, para evaluar condiciones de exceso de nitrógeno, se incluyó un tratamiento de fertilización con sulfato de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$; se realizaron dos aplicaciones de este compuesto nitrogenado: cada una con una concentración de 400 mg/kg, la primera dosis se aplicó al momento de la siembra y la segunda dosis se aplicó luego de la expansión de la primera hoja. Las plantas fueron regadas diariamente con agua de pozo cuya conductividad varía entre 0,5 y 1 dS/m y cultivadas en una cámara de cultivo a 23 °C con un fotoperíodo de 16 h luz y una intensidad lumínica de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$.

Las evaluaciones se realizaron cuando las plántulas presentaban la tercera hoja expandida (V_3) para ello se determinó el área foliar de cada una, la cual fue calculada como;

K x largo x ancho

K= 0,75 (Ruget *et al.*, 1996)

Se midieron 36 plantas en tres experimentos independientes (n=3). Los resultados fueron analizados por ANOVA seguidos de una prueba de *Tukey*.

Cuadro 3.2_{M&M}: Caracterización de la tierra utilizada.

Parámetro	Unidad	Medición
pH	01:01	4,96
Conductividad Eléctrica	mS/cm	0,25
NO ₃ ⁻	ppm	2,94
Ca ⁺²	ppm	2,3
Mg ⁺	ppm	3,42
K ⁺	ppm	12,81
Na ⁺	ppm	17,63
Humedad	%	57,24
Materia Seca	%	42,76
Materia Orgánica	%	56,33
Sólidos	%	12,97
Granulometría:		
> 3,35	%	6,89
3,35 - 1,0		36,56
< 1,0		56,56

Nota: Determinaciones realizadas por el Instituto de Floricultura de INTA - Castelar.

Posteriormente, en el suelo se realizaron determinaciones de nitrógeno mineral. De cada maceta se muestrearon 40 g de suelo, los cuales fueron secados 8 h a 40 °C. El NH₄⁺ fue extraído con una solución 1M de KCl, se utilizó una relación 1:4 (suelo: KCl). Para el NO₃⁻ se utilizó agua en una relación suelo:agua de 1:2,5; la extracción se realizó en agitación por 1 h a 250 rpm. Luego, las muestras fueron centrifugadas a 4000 rpm por 30 min y el sobrenadante filtrado. El nitrógeno mineral se cuantificó por métodos colorimétricos como NH₄⁺- N y NO₃⁻- N (AQA assay, GTLab, Argentina) basándose en dos diferentes reacciones de salicilato de sodio. La absorbancia fue medida en un espectrofotómetro DR6000 (Hach-EUA) (Krom, M., 1980; Wheatley *et al.*, 1989).

3.2.4- Microcosmos del suelo

Se evaluó la persistencia de las cepas *P. protegens* Pf-5 y *P. protegens* Pf-5 X940 en el suelo mediante un estudio de microcosmos. Se utilizó el mismo sustrato que en los experimentos de inoculación (Cuadro 3.2_{M&M}), el cual primero se pasó por un tamiz de 0,5 cm de tamaño de poro para descartar los restos grandes, luego se esterilizó por calor húmedo (121 °C, 1,1 atm por 1 h) en placas de Petri con 50 g de tierra seca (Trevors, J., 1996). Para chequear la esterilidad se realizaron diluciones de 10⁻¹ y 10⁻² en solución fisiológica y se plaquearon 100 µl en

LB, las cuales se incubaron a temperatura ambiente y 28 °C por 7 días. No observándose contaminaciones. Luego cada placa fue inoculada con 1×10^6 UFC/g (Angle *et al.*, 1995), los inóculos fueron preparados como se describe en la sección 3.2.2. Las placas se mantuvieron en cámara de cultivo a $24^\circ \pm 1^\circ \text{C}$ en oscuridad.

Semanalmente, de cada placa, se tomaron muestras de 100 mg para realizar un recuento de unidades formadoras de colonias, se plaquearon por triplicado 100 μl de las diluciones seriadas 10^{-5} y 10^{-6} en solución fisiológica en medio LB, las cuales fueron cultivadas a 28 °C por 24 h. Los resultados fueron expresados como tasa de persistencia relativizada a 1 en el tiempo 0 días (comienzo del experimento).

3.2.5- Programa Estadístico

En cada figura se detalla el análisis estadístico utilizado para cada caso en particular. Los mismos fueron realizados con el *software* GraphPadPrism[®] 6.0 (Graphpad Software Inc., EUA).

3.3- Resultados

Para analizar el efecto potencial de la inoculación con la cepa *Pseudomonas protegens* Pf-5 X940 en la productividad vegetal, se seleccionaron las siguientes especies; arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), alfalfa (*Medicago sativa*) y festuca alta (*Festuca arundinacea*). Estas especies fueron evaluadas en un sistema hidropónico utilizando como solución de riego el medio mínimo INTA 13 sin nitrógeno [- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$] o suplementado con nitrato de calcio [+ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$]. Además del tratamiento con la bacteria recombinante, *P. protegens* Pf-5 X940, se establecieron tres controles: 1- inoculado con la bacteria salvaje *P. protegens* Pf-5 (no fijadora de nitrógeno), 2- inoculado con la cepa *P. stutzeri* A1501 (bacteria fijadora natural de nitrógeno) y 3- sin inocular.

En arabidopsis la productividad de estas plantas se evaluó mediante el diámetro de la roseta. Las plantas sin inocular mostraron una reducción significativa en la productividad cuando se utilizó la solución INTA 13 sin nitrógeno [- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$] respecto a las plantas suplementadas con nitrógeno [+ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$] (Fig. 3.1). Una reducción similar en la productividad se observó en las plantas inoculadas con las cepas salvajes, *P. protegens* Pf- 5 y *P. stutzeri* A1501, en condiciones de déficit de nitrógeno (Fig. 3.1). Sin embargo, las plantas inoculadas con *P. protegens* Pf-5 X940, no presentan diferencias significativas en los niveles de productividad alcanzados con o sin nitrógeno (Fig. 3.1.A), lo cual indicaría que la inoculación con esta cepa recombinante pudo revertir el déficit.

Este importante efecto en el crecimiento vegetal fue asociado a una capacidad inusual de la cepa *P. protegenes* Pf-5 X940 de producir y excretar amonio (Fig. 3.1.D). No se observaron diferencias significativas en el crecimiento de las plantas inoculadas con ninguna de las tres cepas respecto del control sin inocular utilizando la solución nutritiva INTA 13 con nitrógeno. Esto sugiere que *P. protegens* Pf-5 no sería un promotor del crecimiento en arabidopsis, al menos bajo las condiciones analizadas.

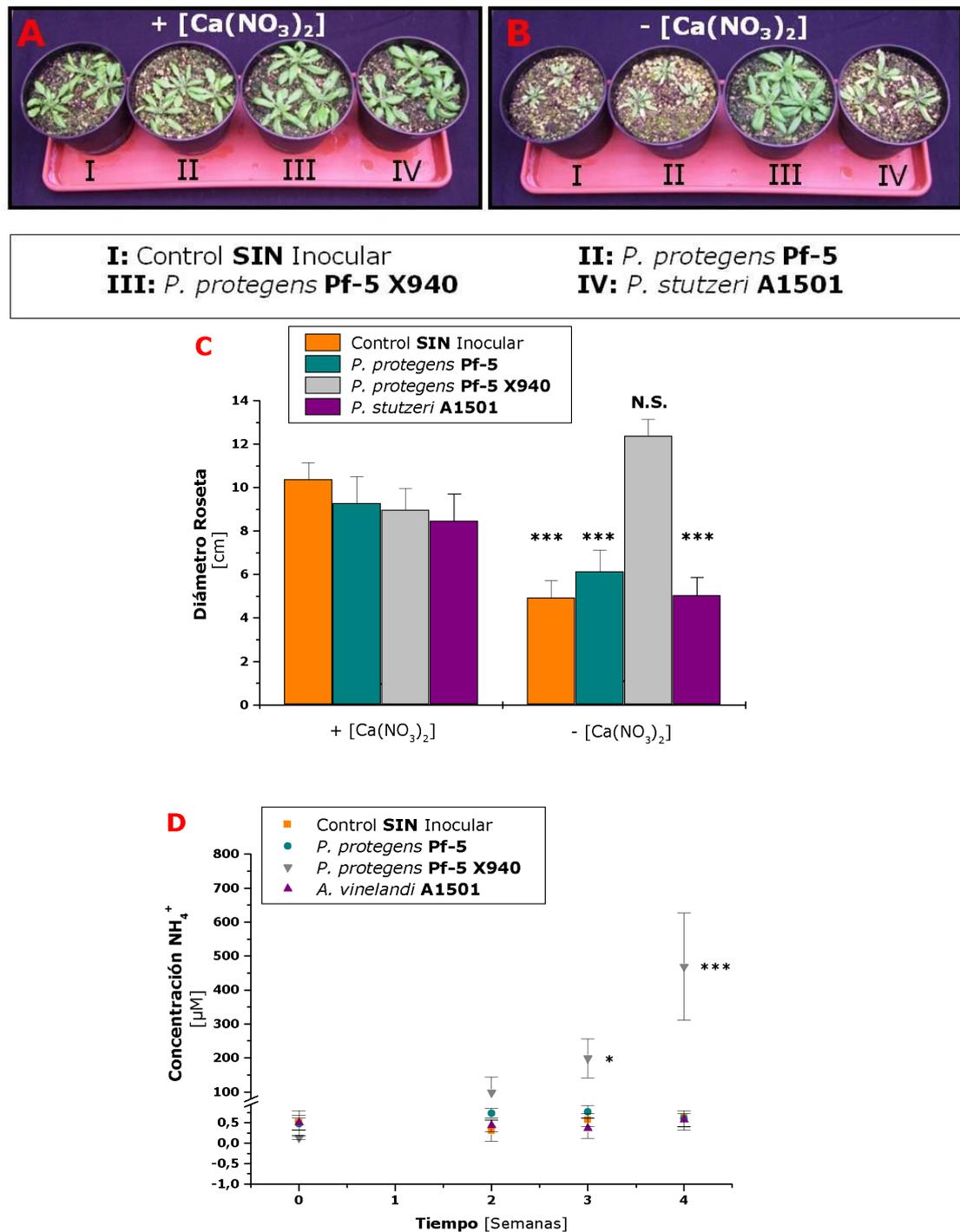


Figura 3.1: Efecto de la inoculación con *P. protegens* Pf-5 X940 sobre la productividad de *Arabidopsis thaliana*: Se midieron los niveles de productividad por el diámetro de la roseta y la presencia de amonio en el sustrato de plantas no tratadas, sin inocular (**I**), inoculadas con *P. protegens* Pf-5 (**II**), con *P. protegens* Pf-5 X940 (**III**) y con *P. stutzeri* A1501 (**IV**) crecidas en hidropónia con la solución nutritiva INTA 13; **A-** En presencia de nitrógeno + [Ca(NO₃)₂] o **B-** En ausencia del mismo - [Ca(NO₃)₂]. **C-** La productividad se analizó por un ANOVA de 1-factor seguido de la prueba de *Tukey* factores (* p < 0,05, ***p < 0,001, **N.S.** No Significativo) respecto de las plantas crecidas en presencia de nitrógeno. **D-** El análisis de producción de amonio liberado al sustrato por un ANOVA de 2 factores (* p < 0,05, ***p < 0,001).

En los ensayos realizados en alfalfa y festuca alta, los niveles de productividad fueron medidos por peso fresco de planta entera (Fig. 3.2) y la medición del ancho en la región medial de la segunda hoja (Fig. 3.3) respectivamente.

Al igual que en el caso de arabidopsis, la inoculación de estas especies con *P. protegens* Pf-5 X940 permitió revertir el fenotipo dado por ausencia de nitrógeno en la solución de riego sin encontrarse diferencias significativas en los niveles de productividad respecto de las plantas tratadas con nitrato de calcio.

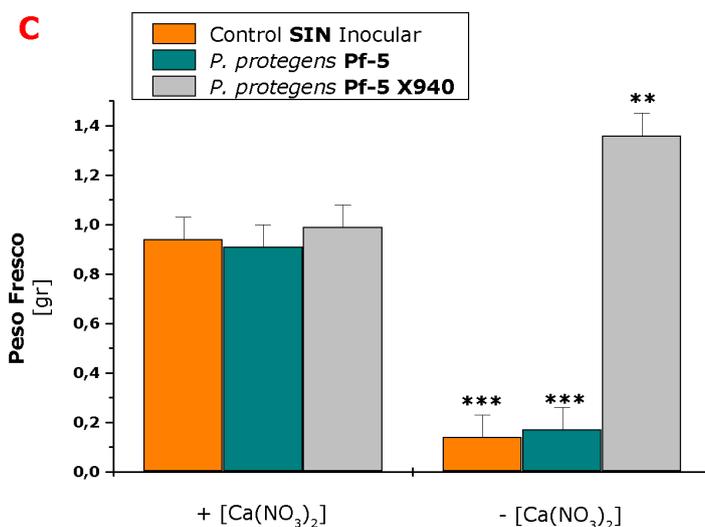
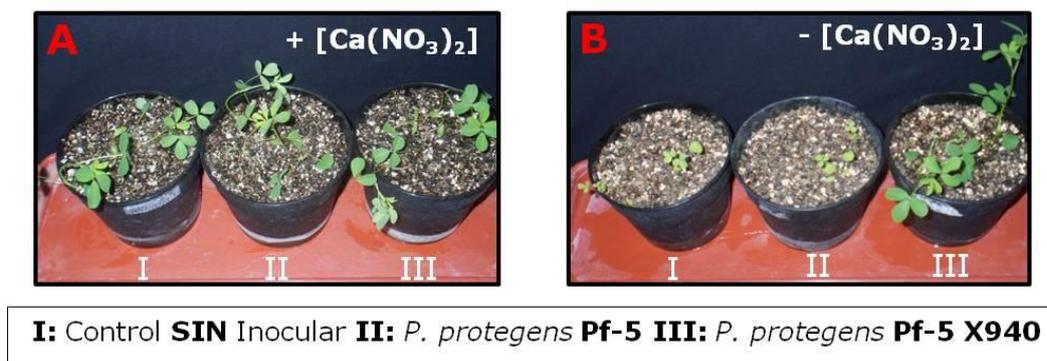


Figura 3.2: Efecto de la inoculación con *P. protegens* Pf-5 X940 sobre la productividad de *Medicago sativa* (alfalfa): Se midieron los niveles de productividad por peso fresco de planta entera en plantas no tratadas, sin inocular (I), inoculadas con *P. protegens* Pf-5 (II) y con *P. protegens* Pf-5 X940 (III) crecidas en hidropónia con la solución nutritiva INTA 13; A- En presencia de nitrógeno + [Ca(NO₃)₂], B- En ausencia del mismo - [Ca(NO₃)₂]. C- El análisis estadístico de la productividad se realizó por un ANOVA de 1 factor seguido de la prueba de Tukey (** p < 0,01, ***p < 0,001).

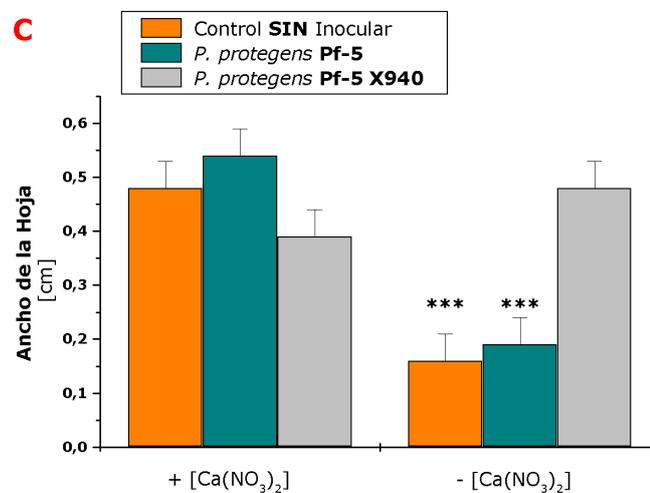
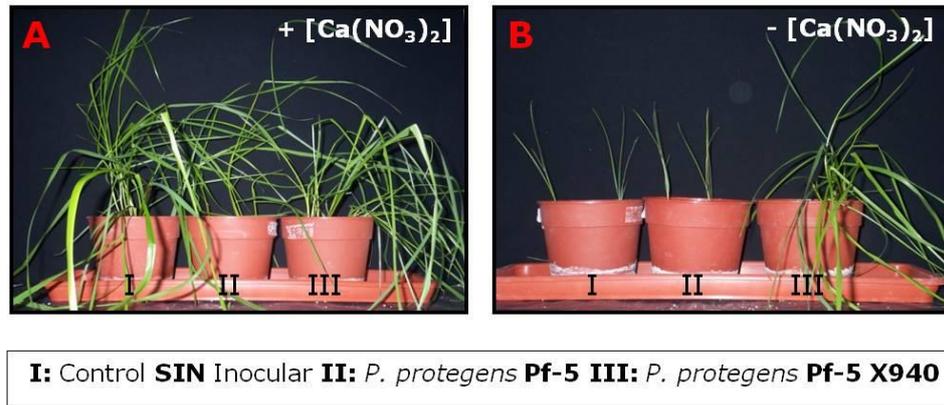


Figura 3.3: Efecto de la inoculación con *P. protegens* Pf-5 X940 sobre la productividad de *Festuca arundinacea* (festuca alta): Se midieron los niveles de productividad por medición del ancho de la segunda hoja en plantas no tratadas, sin inocular (**I**), inoculadas con *P. protegens* Pf-5 (**II**) y con *P. protegens* Pf-5 X940 (**III**), crecidas en hidropónia con la solución nutritiva INTA 13. **A-** En presencia de nitrógeno +[Ca(NO₃)₂] o **B-** En ausencia del mismo - [Ca(NO₃)₂]. **C-** El análisis estadístico de la productividad se realizó por un ANOVA de 1-factor seguido de un contraste por la prueba de *Tukey* (***) $p < 0,001$).

También se evaluaron los efectos de *P. protegens* Pf-5 X940 sobre la productividad una especie de gran interés agronómico: el maíz. En este caso, el ensayo se realizó en tierra y se reemplazó el uso de Ca(NO₃)₂ por (NH₄)₂SO₄. En la inoculación del maíz con *P. protegens* Pf-5 X940 se observó un aumento de la productividad de las plantas respecto a aquellas plantas fertilizadas con (NH₄)₂SO₄, diferenciándose del control sin inocular y de aquellas inoculadas con la cepa salvaje (Fig. 3.4).

Este fenotipo observado fue asociado con el incremento de los componentes del nitrógeno en el suelo, específicamente NH_4^+ y NO_3^- (Cuadro 3.1).

Cuadro 3.1: Cuantificación de la concentración de amonio (NH_4^+) y nitrato (NO_3^-) en tierra de cultivo de maíz: Se analizó la tierra de los tratamientos sin inocular, con bacterias, ni fertilizar, con nitrógeno; fertilizada con nitrógeno, inoculada con la cepa salvaje (Pf-5) o con la cepa recombinante (Pf-5 X940).

Tratamientos	Componentes nitrogenados de tierra cultivada con maíz [ppm]	
	NH_4^+	NO_3^-
Fertilización con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$0,04986 \pm 3,6 \times 10^{-4}$	$0,296 \pm 0,05$
Control SIN tratamiento	$0,0441 \pm 5,4 \times 10^{-4}$	$0,089 \pm 6,8 \times 10^{-3}$
Inoculación c/ Pf-5	$0,04662 \pm 1,44 \times 10^{-3}$	$0,035 \pm 0,05$
Inoculación c/ Pf-5 X940	$5,31 \pm 0,882$	$6,82 \pm 0,62$

Nota: Los valores indicados corresponden a la media \pm el desvío estándar de dos mediciones independientes.

A partir de los efectos observados en la inoculaciones en tierra se evaluó el desempeño de la cepa *P. protegens* Pf-5 X940 en relación con la cepa *P. protegens* Pf-5. Para ello se llevó a cabo un ensayo de “microcosmos del suelo”, utilizando el mismo sustrato que en el experimento de inoculación. Este fue muestreado semanalmente para contabilizar el número de bacterias totales. En ambas cepas se observó un patrón de crecimiento similar pero levemente superior en la cepa recombinante con respecto a la cepa salvaje a las 6 semanas post-inoculación.

Esto indicaría que la incorporación del cósmido X940 en la bacteria *P. protegens* Pf-5 no tendría un impacto negativo en el desempeño de la misma (Fig. 3.5) como podría esperarse; a causa del gran gasto de energía y del poder reductor que demanda el proceso de fijación de nitrógeno constitutivo.

Los resultados obtenidos en este capítulo sugieren que la bacteria *P. protegens* Pf-5 X940 podría incrementar los niveles de productividad tanto de especies de monocotiledóneas como dicotiledóneas crecidas en condiciones deficientes de nitrógeno. Esto estaría dado por la capacidad, de esta bacteria, de fijar nitrógeno atmosférico, convertirlo en amonio y liberarlo al medio. Esta característica y el similar *fitness* en el crecimiento en tierra sugieren la posibilidad de utilizar esta cepa recombinante en la formulación de inoculantes.

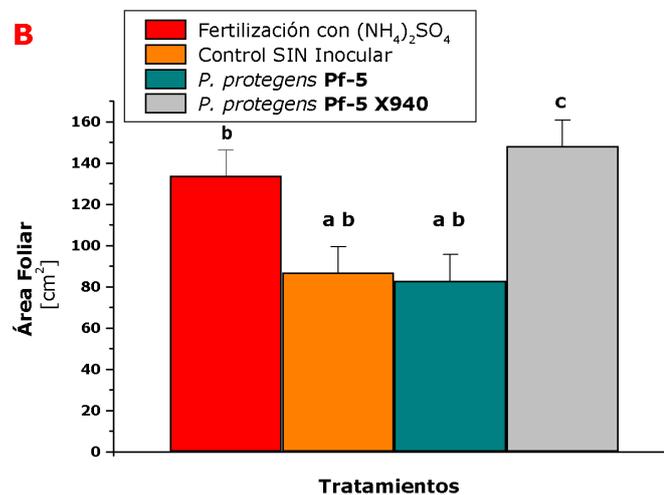
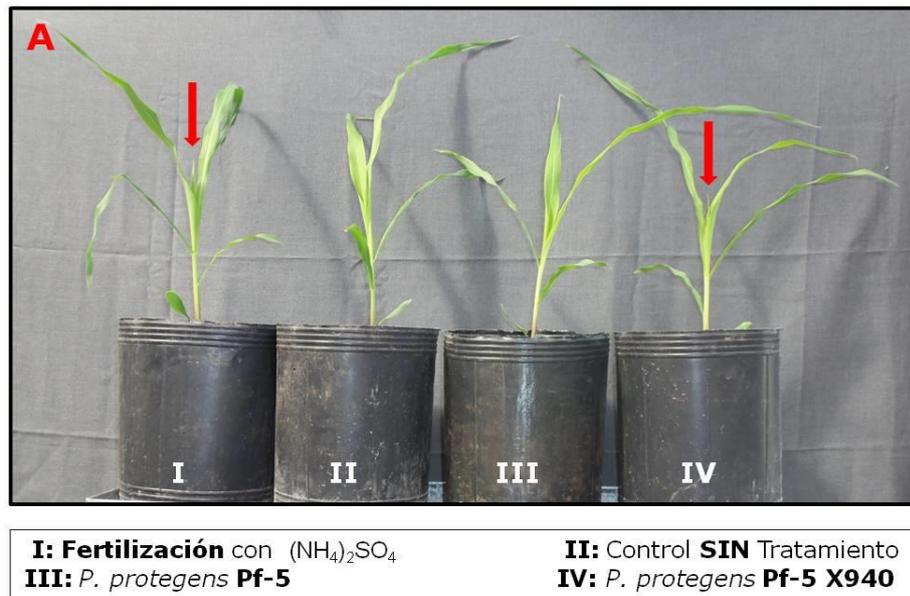


Figura 3.4: Efecto de la inoculación con *P. protegens* Pf-5 X940 sobre la productividad en *Zea mays* (maíz): Se midió el área foliar total en plántulas con su tercer hoja expandida en plantas fertilizadas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (I), plantas no tratadas, sin inocular ni fertilizar (II), inoculadas con *P. protegens* Pf-5 (III) y con *P. protegens* Pf-5 X940 (IV) utilizando tierra como sustrato. **A-** Comparación del crecimiento entre los tratamientos. **B-** Análisis estadístico realizado con ANOVA de un factor seguido de un contraste mediante la prueba de *Tukey*. Las letras corresponden a los tratamientos comparados. La misma letra corresponde a tratamientos sin diferencia significativa; $p < 0,001$.

3.4- Discusión

En este trabajo se demostró que es factible aumentar el amonio disponible en el medio y por consiguiente la productividad de las plantas a través de la inoculación con una bacteria recombinante que expresa un complejo nitrogenasa heterólogo, *Pseudomonas protegens* Pf-5 X940 (Fig. 2.6 – 2.7; Fig. 3.1-3.4; Cuadro 3.1). La cepa seleccionada como receptora de los genes *nif*, *P. protegens* Pf-5, es una bacteria,

ampliamente estudiada como agente de control biológico, promotora del crecimiento vegetal (PGPR), y posee la capacidad de suprimir enfermedades vegetales transmitidas por el suelo causadas por hongos y oomicetes (Howell & Stipanovic, 1979) ya que produce una gran variedad de metabolitos secundarios.

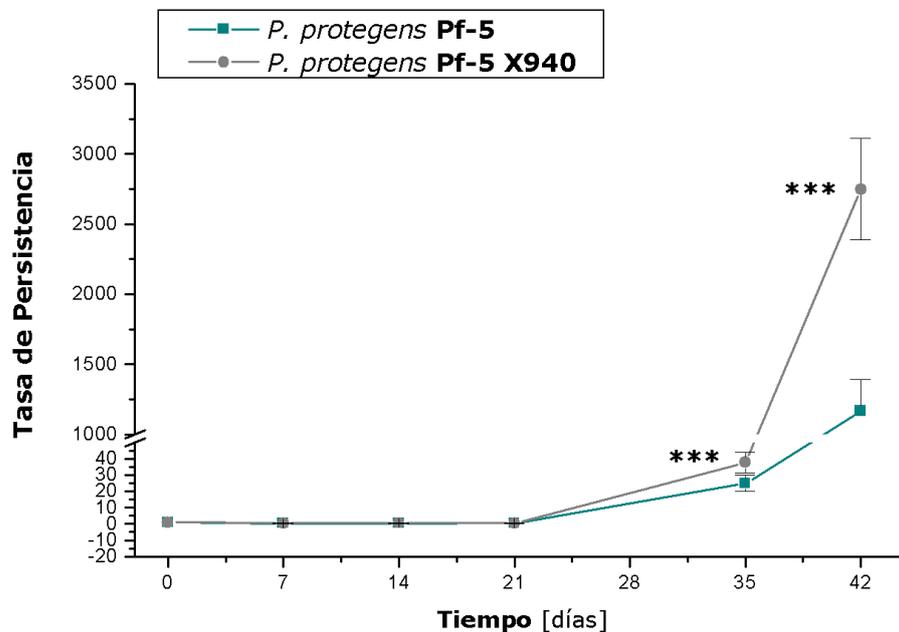


Figura 3.5: Análisis de persistencia de *P. protegens* Pf-5 X940 a través de un microcosmos del suelo: Se analizó la persistencia de la cepas *P. protegens* Pf-5 y *P. protegens* Pf-5 X940 en placas de tierra estéril; los resultados se presentan como la tasa de persistencia relativizada a 1 en tiempo 0 (cero días). El experimento se realizó tres veces en forma independiente. El análisis estadístico se realizó a través de un *t-test* (***) $p < 0,001$.

Por lo tanto, la cepa recombinante, *P. protegens* Pf-5 X940, podría aumentar la productividad de los cultivos a través de diferentes mecanismos, es decir, fijación de nitrógeno y control biológico. Se observó que la inoculación con *P. protegens* Pf-5 X940 fue capaz de revertir el fenotipo de deficiencia de nitrógeno en condiciones controladas tanto en especies de dicotiledóneas (alfalfa y arábido) como en monocotiledóneas (festuca alta y maíz) (Fig. 3.1-3.4). En el caso de la alfalfa, las plantas inoculadas con *P. protegens* Pf-5 X940 y crecidas en hidropónia en ausencia de nitrógeno presentaron niveles de producción superiores a los encontrados en las plantas crecidas en presencia de nitrógeno; este efecto podría deberse a una aplicación insuficiente de nitratos en los tratamientos de control, pero de cualquier forma, esta prueba de concepto, muestra el alto potencial de este inoculante recombinante. En el caso particular del maíz, los resultados obtenidos también son contundentes. Consiguieron alcanzar y superar los mismos niveles de producción que aquellas plantas fertilizadas con nitrógeno; esto contrasta con lo reportado por trabajos previos tales como Riggs y colaboradores (2001), quienes no logran revertir el fenotipo de deficiencia de nitrógeno en maíz inoculado con los diazotrofos naturales. Sin embargo, a pesar de estos prometedores resultados se debe tener en cuenta que si bien a lo largo de este estudio no se evaluó el rendimiento en grano de maíz, estudios posteriores, realizados en iguales condiciones, indican que las inoculaciones con

P. protegens Pf-5 X940 podría incrementar los niveles de producción de grano. Este un importante desafío que queda por delante. Si bien todos los experimentos se realizaron en condiciones controladas, no agrícolas, en sustratos estériles y con un número alto de UFC/ml, muchas veces superior al utilizado en inoculaciones comerciales, se puede especular su uso como inoculante de esta cepa recombinante, *P. protegens* Pf-5 X940, para ser aplicado en un gran número de cultivos comerciales. A pesar de ello, es esencial no subestimar la complejidad del uso de dicho inoculante ya que el mejoramiento de la producción de una especie vegetal depende de múltiples factores, tales como: la combinación entre el genotipo de la planta y la cepa bacteriana elegida, el tipo de suelo, las condiciones ambientales (Salantur *et al.*, 2006) y la capacidad de la bacteria de colonizar, sobrevivir y perpetuarse en la rizósfera (Burris, R., 1977; Shaukat & Siddiqui, 2003); en el caso particular de *P. protegens* Pf-5 X940 se observó a través de un ensayo de “microcosmos del suelo” que esta cepa mantenía un patrón de crecimiento similar al de la cepa salvaje, *P. protegens* Pf-5, indicando que la incorporación del cósmido recombinante X940 no afectó el *fitness* de la misma bajo estas condiciones. A pesar de esta evaluación, no se puede descartar que la cepa recombinante podría ser desplazada por microorganismos autóctonos o no fijar el nitrógeno en algunos suelos con diferentes características físico-químicas. En este sentido la estrategia de transferencia de genes *nif* desarrollada en este trabajo permite que se pueda aplicar a otras cepas huésped (Fig. 2.11), abriendo así la posibilidad de desarrollar una nueva familia de inoculantes recombinantes que se adapte a las condiciones ambientales de cada sitio de cultivo. No obstante, la liberación de *P. protegens* Pf-5 X940 y de cualquier otro diazótrofo recombinante necesita una evaluación del impacto ecológico de su aplicación en la estructura genética de la comunidad de bacterias y hongos de la rizósfera de plantas (Girlanda *et al.*, 2001; Shaukat & Siddiqui, 2003; Baudoin *et al.*, 2010).

Esta nueva tecnología de fijación de nitrógeno, podría ofrecer una alternativa ecológica y económicamente viable; por un lado: disminuye el uso de fuentes de energía no renovables, como es el petróleo utilizado para la producción del fertilizante nitrogenado, permite su aplicación *in situ* asociado a la semillas y elimina de los gastos de producción el acarreo y aplicación del fertilizante; y aumenta la eficiencia de uso del nitrógeno por parte de la planta. Puesto que, el amonio producido es posiblemente menos susceptible a la lixiviación y volatilización esta tecnología podría disminuir los niveles de emisión de óxido nitroso que contribuyen al calentamiento global y la eutroficación de las aguas. Para lograr atraer la atención de los productores y su posterior adopción, esta nueva tecnología de inoculantes recombinantes, debe disminuir los costos de producción y superar los niveles de rendimiento obtenidos por la fertilización tradicional.

Debido a la resistencia por parte de los productores a cambiar las condiciones de manejo y las prácticas habituales (Riggs *et al.*, 2001; Kennedy *et al.*, 2004) algunos autores propusieron incorporar el uso de PGPR, ya sean cepas salvajes o modificadas genéticamente, que contribuyan a optimizar la producción por ejemplo; a través de un mayor desarrollo radicular incrementando la tolerancia al estrés hídrico por mayor exploración del suelo, facilitando la captación de nutrientes, pero no la sustitución de la fertilización, ofreciendo al productor un complemento en las decisiones para el manejo (comunicación personal Dr. Martín Díaz Zorita). Otros autores proponen, como alternativa, la incorporación de nuevos genotipos vegetales: plantas transgénicas

autofijadoras de nitrógeno o plantas que posean mejores mecanismos de absorción. Por ejemplo, que le permitan aumentar la velocidad de absorción de urea en las raíces. La aceptación de estas tecnologías por parte de los productores es usual debido a que no posee ningún costo adicional, mantiene el sistema de cultivo y las prácticas de manejo del suelo y el agua no son afectadas (Ladha *et al.*, 1995). Sin embargo, la primera alternativa reduce, pero aún no resuelve los graves problemas ambientales que conlleva la fertilización nitrogenada, y además, agrega un insumo a tener en cuenta en el costo de la producción. En el caso particular de las plantas transgénicas autofijadoras aún quedan dificultades tecnológicas por resolver. La transformación genética debe asegurar la expresión del complejo nitrogenasa, la protección del complejo del daño por el oxígeno y el suplemento de energía para la fijación del nitrógeno por parte de la planta sin comprometer los niveles de producción del cultivo (Ladha *et al.*, 1995; Dixon *et al.*, 1997). Si bien los avances en la biología molecular y la tecnología ofrecen perspectivas positivas para la expresión de la transcripción de fijación de nitrógeno en plantas, aun la síntesis de un complejo nitrogenasa activo es dificultosa. Si bien los obstáculos es probable que puedan ser superados con el tiempo, se requieren soluciones intermedias a corto plazo para sostener un aumento de la producción agrícola en los próximos años.

3.5- Conclusión

En el desarrollo de este trabajo se observó que el uso como inoculante de *Pseudomonas protegens* Pf-5 X940 permitió incrementar el crecimiento vegetal de distintas especies vegetales crecidas en condiciones restrictivas de nitrógeno, revirtiendo el fenotipo de deficiencia de este nutriente y ofreciendo una nueva alternativa para eliminar o disminuir el uso de fertilizantes químicos en el cultivo de diferentes especies vegetales.

Capítulo IV

Consideraciones Finales

CAPÍTULO 4

4.1 Consideraciones Finales

En base a su relevancia ecológica y económica, numerosos investigadores han dedicado su vida a la caracterización de la fijación biológica de nitrógeno atmosférico. A pesar de este esfuerzo, aún existen numerosos interrogantes tanto acerca de aspectos básicos como en relación al potencial tecnológico del proceso de fijación de nitrógeno. Como se describe a continuación, los resultados presentes en esta tesis doctoral no solo constituyen un avance significativo en el estado del arte de esta temática específica sino que a su vez ofrecen herramientas novedosas para profundizar este conocimiento en un futuro cercano.

La fijación biológica de nitrógeno implica varias reacciones con la participación de diferentes sustratos y proteínas dependiendo de un conjunto amplio, aunque aún no definido, de genes. Dada esta complejidad bioquímica y genética, la fijación de nitrógeno fue utilizada por muchos años como un carácter de valor taxonómico por la microbiología clásica. Por ejemplo, parte de la descripción taxonómica formal del género *Pseudomonas* incluye su incapacidad de fijar nitrógeno, y en base a esta clasificación fenotípica, las cepas de *Azotobacter* continúan hoy en día siendo excluidas del género *Pseudomonas* a pesar de que las evidencias genómicas indican que dichas bacterias deberían ser incluidas dentro del género *Pseudomonas sensu stricto*. Sin embargo, en algunos trabajos previos a la era de la secuenciación de genomas bacterianos se mostraron evidencias de posibles transferencias de complejos nitrogenasas entre microorganismos, sugiriendo que la capacidad de fijar nitrógeno no debería ser considerada una herramienta de valor taxonómico sino que sería una característica que puede ser incorporada en distintos taxones en forma independiente a través de eventos de transferencia horizontal. En esta tesis doctoral, se utilizó como cepa receptora de genes de fijación de nitrógeno a la bacteria *Pseudomonas protegens* Pf-5 cuyo genoma ha sido secuenciado. Por lo tanto, la transferencia funcional del complejo nitrogenasa entre *Pseudomonas stutzeri* A1501 y *P. protegens* Pf-5 constituye una evidencia empírica muy sólida con respecto a la factibilidad de la transferencia de la capacidad de fijar nitrógeno entre dos seres vivos.

La verificación de la factibilidad de la transferencia funcional del complejo nitrogenasa entre microorganismos y el fenotipo inusual de fijación de nitrógeno en *P. protegens* Pf-5 X940 implica la apertura de nuevos horizontes a explorar. En primer lugar, considerando el gasto energético de la fijación de nitrógeno y lo adverso en cuanto a la competencia con otros microorganismos de la liberación de amonio al medio extracelular, era esperable que la incorporación del complejo nitrogenasas en *P. protegens* tenga un impacto negativo en su desempeño en condiciones naturales. Sin embargo lo que hemos observado el sistema *P. protegens* Pf-5 X940 constituiría una herramienta para explorar mecanismos de selección de la regulación de la actividad del complejo nitrogenasa. Por ejemplo, a través del reislamiento de *P. protegens* Pf-5 X940 a partir de suelo inoculado con esta cepa muestre nuevas cepas derivadas de esta bacteria recombinante con un fenotipo de fijación de nitrógeno inducible por ausencia de nitrógeno en el medio. La secuenciación del genoma de las cepas que muestran represión nitrogenada respecto de la que no podría dar indicios de cuáles son los cambios genéticos involucrados en la adaptación de un complejo nitrogenasa a la nueva célula huésped.

En particular, la disponibilidad de la cepa *P. protegens* Pf-5 X940, también nos ofrece una nueva perspectiva para estudiar la regulación del complejo nitrogenasa desde un enfoque molecular. Para esto se puede explorar los factores genéticos que estarían involucrados en el fenotipo inusual de fijación de nitrógeno “constitutivo” en *P. protegens* Pf-5, por ejemplo, a través de la transformación de la cepa *P. protegens* Pf-5 X940 con bibliotecas de cósmidos recombinantes conteniendo fragmentos de ADN genómico de *P. stutzeri* A1501 o viceversa, o través de enfoques más específicos en donde se analice los posibles factores sigma alternativos diferenciales entre las cepas *P. stutzeri* A1501 y *P. protegens* Pf-5 y su posible rol en la expresión constitutiva de genes de biosíntesis y ensamblado del complejo nitrogenasa.

Continuando en el plano de la promoción general del conocimiento de base, la disponibilidad de un sistema de transferencia eficiente del complejo nitrogenasa, como implica la presencia del cósmido recombinante X940, ofrece no solo una nueva oportunidad para profundizar el conocimiento de la regulación y la evolución del complejo nitrogenasa sino que también para estudiar la función de cada uno de estos genes, por ejemplo, a través de la delección de genes o grupos de genes presentes en el cósmido X940. La disponibilidad del cósmido X940 resulta en una ventaja significativa con respecto a trabajar con la bacteria *P. stutzeri* A1501 a la hora de realizar estudios de genética sobre el complejo nitrogenasa. De esta forma, se podrá explorar en un futuro cercano aspectos importantes y aún no definidos en el campo de la fijación de nitrógeno tales como el grupo de genes mínimos esenciales para la formación de un complejo nitrogenasa.

En el plano tecnológico, la utilización de fertilizantes nitrogenados es uno de los pilares de la agronomía moderna. Sin embargo, estos compuestos nitrogenados derivan de hidrocarburos y su utilización es responsable en buena parte de la emisión de gases del efecto invernadero (Olivares *et al.*, 2013). Este marco sumado al incremento de la demanda de alimentos y de biocombustibles ha impulsado el estudio de la fijación biológica de nitrógeno como una alternativa para desarrollar una agronomía competitiva y sustentable. La estrategia para lograr este cambio subyace en la búsqueda de cepas naturales fijadoras de nitrógeno y en mejorar las mismas para su utilización en la inoculación de plantas de alto valor económico. Sin embargo, no se lograron resolver algunos de los problemas que tienen estas cepas naturales fijadoras de nitrógeno para ser útiles como inoculantes como por ejemplo su deficiencia para liberar amonio al medio extracelular. En la presente tesis doctoral se planteo una estrategia alternativa, es decir, la transformación de una cepa no fijadora de nitrógeno, la cual no posee, al menos en forma completa, los mecanismos moleculares de represión de la nitrogenasa y que no fue seleccionada para evitar escapes de amonio al medio. En esta tesis doctoral presenta por primera vez un organismo diazótrofo que es capaz de incrementar la productividad de plantas mono y dicotiledóneas en condiciones deficientes de nitrógeno, generando así una nueva perspectiva para las estrategias de manipulación genética para la fijación de nitrógeno. Por tratarse de organismos genéticamente modificados (OGMs), estas nuevas bacterias recombinantes deben usarse con precaución, y por lo tanto, las pruebas a campo deberían ser realizadas bajo condiciones controladas en sistemas contenidos. Estos ensayos y la futura liberación posiblemente tengan un costo elevado, lo cual dificulta su futura comercialización. Sin embargo, esta dificultad puede ser superada por la protección intelectual de estas estrategias de ingeniería genética que ofrezcan a un futuro licenciario de esta tecnología la capacidad de capturar valor una vez que este inoculante sea comercializado. En este sentido y en el marco de la presente tesis

doctoral, se presentaron un conjunto de solicitudes de patentes de CONICET e INTA, tanto nacionales (N° de presentación: 20110104381, Argentina 2011) como internacionales (PCT/IB2012/056643, Suiza 2012) para proteger no solo a la bacteria *P. protegens* Pf-5 X940 sino también la estrategia general para la transferencia del complejo nitrogenasa descrito en esta tesis, incrementando las posibilidades de éxito futuro en la obtención OGMs con protección intelectual, un elemento esencial a la hora de capitalizar el valor por parte de los licenciarios que decidan asumir el riesgo que implica la desregulación del OGMs y la adopción de dicha tecnología. La comercialización efectiva de productos derivados, probablemente, dependan de un compromiso conjunto público-privado que explore la eficiencia de esta tecnología en condiciones de campo como una apuesta a una agricultura sustentable y altamente competitiva.

Bibliografía

Bibliografía

- Andrade, G., Esteban, E., Velasco, L., Lorite, M. J. & Bedmar, E. J. 1997. Isolation and identification of N₂-fixing microorganisms from the rhizosphere of *Capparis spinosa* (L.). *Plant Soil*, 197: 19-23.
- Angle, J. S., Levin, M., Gagliardi, J. V. & McIntosh, M. S. 1995. Validation of Microcosms for Examining the survival of *Pseudomonas aureofaciens* (*lacZY*) in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(8): 2835-2839.
- Anzai, Y., Kim, H., Park, J. Y., Wakabayashi, H. & Oyaizu, H. 2000. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50: 1563-1589.
- Anzai, Y., Kudo, Y. & Oyaizu, H. 1997. The Phylogeny of the genera *Chryseomonas*, *Flavimonas* and *Pseudomonas* supports synonymy of these three genera. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47(2): 249-251.
- Ayub, N. D. 2008. Influencia del polihidroxitirato sobre la adaptación a condiciones extremas en una bacteria antártica. *Tesis Doctoral*. Facultad de Cs. Exactas y Naturales - UBA. Buenos Aires, Argentina. 104 pp.
- Baker, G., Smith, J. J. & Cowan, D. A. 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J. Microbiol. Methods*, 55(3): 541-555.
- Baldani, V. L., Baldani, J. I. & Döbereiner, J. 1983. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. *Can. J. Microbiol.*, 29(8): 924-929.
- Baudoin, E., Lerner, A., Mirza, M. S., Zemrany, H. E., Prigent-Combaret, C., Jurkevich, E., Spaepen, S., Vanderleyden, J., Nazaret, S., Okon, Y. & Moëne-Looco, Y. 2010. Effects of *Azospirillum brasilense* with genetically modified auxin biosynthesis gene *ipdC* upon the diversity of the indigenous microbiota of the wheat rhizosphere. *Res. Microbiol.*, 161: 219-226.
- Bennasar, A., Rosselló-Mora, R., Lalucat, J. & Moore, E. R. 1996. 16S rRNA gene sequence analysis relative to genomovars of *Pseudomonas stutzeri* and proposal of *Pseudomonas balearica* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46(1): 200-205.
- Boddey, R. M., de Oliveira, O. C., Urquiaga, S., Reis, V. M., de Olivares, F. L., Baldani, V. L. D. & Döbereiner, J. 1995^a. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospects for improvement. *Plant Soil*, 174: 195-209.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- Burris, R. 1977. Overview of Nitrogen Fixation. Pp 9-18. In: Hollaender, A., Burris, R. H., Day, P. R., Hardy, R. W. F., Helinski, D. R., Lamborg, M. R., Owens, L. & Valentine, R. C. 1977. Genetic Engineering for Nitrogen Fixation. *Plenum Press. New York & London*. 529 pp.
- Cannon, F. & Postgate, J. 1976. Expression of *Klebsiella* nitrogen fixation genes (*nif*) in *Azotobacter*. *Nature*, 260: 271-272.

- Chan, Y-K, Barraquio, W. L. & Knowles, R. 1994. N₂-fixing pseudomonads and related soil bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 13: 95-118.
- Chaney, A. L. & Marbach, E. P. 1962. Modified Reagents for Determination of Urea and Ammonia. *Clin. Chem.*, 8(2): 130-132.
- Chelius, M. K. & Triplett, E. W. 2001. The Diversity of Archaea and Bacteria in Association with the Roots of *Zea mays* L. *Microb. Ecol.*, 41: 252-263.
- Commission of the European Communities. 2008. Communication from the Commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions. *Brussels*. 321 pp.
- Dalton, D. A. & Kramer, S. 2006. Nitrogen-Fixing Bacteria in Non-Legumes. Chap. 3. pp. 105-130. In: Gnanamanickam, S. (Ed.). 2006. Plant-Associated Bacteria. *Springer Netherlands*. 712 pp.
- Dalton, H. & Mortenson, L. E. 1972. Dinitrogen (N₂) fixation (with a biochemical emphasis). *Bacteriol. Rev.*, 36(2): 231-260.
- Desnoves, N., Lin, M., Guo, X., Ma, L., Carreño-Lopez, R. & Elmerich, C. 2003. Nitrogen fixation genetics and regulation in a *Pseudomonas stutzeri* strain associated with rice. *Microbiology*, 149: 2251-2262.
- Dixon, R. & Kahn, D. 2004. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2:621-631.
- Dixon, R. A. & Postgate, J. R. 1971. Transfer of Nitrogen-fixation Genes by Conjugation in *Klebsiella pneumoniae*. *Nature*, 234: 47-48.
- Dixon, R. A. & Postgate, J. R. 1972. Genetic transfer of Nitrogen Fixation from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli*. *Nature*, 237: 102-103.
- Dixon, R., Cannon, F. & Kondorosi, A. 1976. Construction of a P plasmid carrying nitrogen fixation genes from *Klebsiella pneumoniae*. *Nature*, 260: 268-271.
- Dixon, R., Cheng, Q., Shen, G.-F., Day, A. & Dowson-Day, M. 1997. Nif gene transfer and expression in chloroplasts: Prospects and problems. *Plant Soil*, 194: 193–203.
- Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U. & Hacker, J. 2004. Genomic Islands in pathogenic and Environmental Microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2(5): 414-424.
- Dos Santos, P., Fang, Z., Mason, S., Setubal, J. & Dixon, R. 2012. Distribution of nitrogen fixation and nitrogenase – like sequences amongst microbial genomes. *BMC Genomics*, 13: 162-173.
- Dyson, T. 1999. World food trends and prospects to 2025. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96(11): 5929-5936.
- Einsle, O., Tezcan, F. A., Andrade, S. L. A., Schmid, B., Yoshida, M., Howard, J. B. & Rees, D. C. 2002. Nitrogenase MoFe-Protein at 1.16 Å Resolution: A Central Ligand in the FeMo-Cofactor. *Science*, 297(5587): 1696-1700.
- Elmerich, C. 2007. Historical perspective: from bacterization to endophytes. Pp. 1-20. In: Elmerich, C. & Newton, W. Associative and Endophytic Nitrogen – fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations. *Springer Dordrecht*. 5: 336 pp.

- Elomari, M., Coroler, L., Hoste, B., Gillis, M., Izard, D. & Leclerc, H. 1996. DNA Relatedness among *Pseudomonas* strains isolated from natural mineral waters and proposal of *Pseudomonas veronii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46(4): 1138–1144.
- Ferguson, B. J., Indrasumunar, A., Hayachi, S., Lin, M-H., Lin, Y-H., Reid, D. & Gresshoff, P. 2010. Molecular Analysis of Legume Nodule Development and Autoregulation. *J. Integr. Plant Biol.*, 52(1): 61-76.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2011. Current World Fertilizer Trends and Outlook to 2015. *FAO, Roma. 41 pp.*
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2013. FAO Statistical yearbook. *FAO, Roma. 289 pp.*
- Franché, C. & Elmerich, C. 1981. Physiological properties and plasmid content of several strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum*. *Ann. Microbiol.*, 132A(1): 3-18.
- Franché, C., Lindström, K., Elmerich, C. 2009. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil*, 321: 35-59.
- Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O. & Toussaint, A. 2005. Mobile Genetic Elements The Agents of Open Source Evolution. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3: 722-732.
- Georgiadis, M. M., Komiya, H., Chakrabarti, P., Woo, D., Kornuc, J. J. & Rees, D. C. 1992. Crystallographic Structure of the Nitrogenase Iron Protein from *Azotobacter vinelandii*. *Science*, 257(5077): 1653-1659.
- Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A. & Krieg, N. (Eds.). 1994. Methods for General and Molecular Bacteriology. *American Society for Microbiology, Washington, D. C. 791 pp.*
- Giddings, G. 1998. Tansley Review No. 99. The release of genetically engineered micro-organisms and viruses into the environment. *New Phytol.*, 140: 173-184.
- Girlanda, M., Perotto, S., Moenne-Loccoz, Y., Bergero, R., Lazzari, A., Defago, G., Bonfante, P. & Luppi, A. M. 2001. Impact of Biocontrol *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and a Genetically Modified Derivative on the Diversity of Culturable Fungi in the Cucumber Rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(4): 41851-1864.
- Gomes Da Silva, J., Serra, G. E., Moreira, J. R., Conçalves, J. C. & Goldemberg, J. 1978. Energy Balance for Ethyl Alcohol Production from Crops. *Science*, 201(4359): 903-906.
- Gutiérrez-Zamora, M.L. & Martínez-Romero, E. 2001. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). *J. Biotechnol.*, 91(2-3): 117-126.
- Hacker, J. & Carniel, E. 2001. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. *EMBO Rep.*, 2(5): 376-381.
- Halbleib, C. M. & Ludden, P. W. 2000. Regulation of Biological Nitrogen Fixation. *J. Nutr.*, 130(5): 1081-1084.
- Hatayama, K., Kawai, S., Shoun, H., Ueda, Y. & Nakamura, A. 2005. *Pseudomonas azotifigens* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium isolated from a compost pile. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55: 1539-1544.

- Herridge, D. F. & Peoples, M. B. & Boddey, R. M. 2008. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant Soil*, 311:1-18.
- Hopkins, W. G. & Hüner, N. P. A. 2009. Introduction to Plant Physiology 4th Edition. *John Wiley & Sons, Inc., New York*. 503 pp.
- Howell, C. R. & Stipanovic, R. D. 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology*, 69(5): 480-482.
- Huisman, G. W., Wonink, E., de Koning, G., Preusting, H. & Witholt, B. 1992. Synthesis of poly (3-hydroxyalkanoates) by mutant and recombinant *Pseudomonas* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38: 1-5.
- James, E. K. 2000. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crop. Res.*, 65(2-3): 197-209.
- Jensen, E. S., Peoples, M. B., Boddey, R., Gresshoff, P. M., Hauggaard-Nielsen, H., Alves, B., Morrison, M. J. 2012. Legumes for mitigation of climate change and the provision of feedstock for biofuels and biorefineries. A review. *Agron. Sustain. Dev.*, 32(2): 329-364.
- Kechris, K. J., Lin, J. C., Bickel, P. J. & Glazer, A. N. 2006. Quantitative exploration of the occurrence of lateral gene transfer by using nitrogen fixation genes as a case study. *PNAS*, 103(25): 9584-9589.
- Kennedy, I. R., Choudhury, A. T. M. A. & Kecskés, M. L. 2004. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biol. Biochem.*, 36(8): 1229-1244.
- Kim, B. H. & Gadd, G. M. 2008. Bacterial Physiology and Metabolism. *Cambridge University Press, Cambridge*. 553 pp.
- Krom, M. D. 1980. Spectrophotometric determination of ammonia: a study of a modified Berthelot reaction using salicylate and dichloroisocyanurate. *Analyst*, 105: 305-316.
- Krotzky, A. & Werner, D. 1987. Nitrogen fixation in *Pseudomonas stutzeri*. *Arch. Microbiol.*, 147: 48-57.
- Ladha, J. K & Reddy, P. M. 1995. Extension of nitrogen fixation to rice necessity and possibilities. *GeoJournal*, 35(3): 363-372.
- Lageveen, R. G., Huisman, G. W., Preusting, H., Ketelaar, P., Eggink, G. & Witholt, B. 1988. Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: Effect of substrates on formation and composition of poly – (R) – 3 – hydroxyalkanoates and poly – (R) – 3 hydroxyalkenoates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54(12): 2924-2932.
- Latysheva, N., Junker, V. L., Palmer, W. J., Codd, G. A. & Barker, D. 2012. The evolution of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Bioinformatics*, 28(5): 603-606.
- Lee, S. H., Lee, S. Y. & Park, B. C. 2005. Cell surface display of lipase in *Pseudomonas putida* KT2442 using OprF as an anchoring motif and its biocatalytic applications. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(12): 8581-8586.
- Lodewyckx, C., Vangronsveld, J., Porteous, F, Moore, E. R. B., Taghavi, S., Mezgeay, M. & van der Lelie, D. 2002. Endophytic Bacteria and Their Potential Applications. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 21(6): 583-606.

- Loper, J. E., Kobayashi, D. Y. & Paulsen, I. T. 2007. The genomic sequence of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5: Insights into biological control. *Phytopathology*, 97:233-238.
- Maddoni, G. A., Vilariño, P. & García de Salomome, I. 2003. Dinámica de los nutrientes en el sistema suelo – planta. Pp. 441-477. En: Satorre, E. H., Benech Arnold, R. L., Slafer, G. A., de la Fuente, E. B., Miralles, D. J., Otegui, M. E. & Savin, R. Producción de Granos, bases funcionales para su manejo. *Editorial Facultad de Agronomía UBA, Buenos Aires*. 783 pp.
- Markel, E., Maciak, C., Butcher, B. G., Myers, C. R., Stodghill, P., Bao, Z., Cartinhour, S. & Swingle, B. 2011. An extracytoplasmic, function sigma factor-mediated cell surface signaling system in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 regulates gene expression in response to heterologous siderophores. *J. Bacteriol.*, 193(20): 5775-5783.
- Martínez, E., Palacios, R. & Sánchez, F. 1987. Nitrogen-Fixing Nodules Induced by *Agrobacterium tumefaciens* Harboring *Rhizobium phaseoli* Plasmids. *J. Bacteriol.*, 169(6): 2828-2834.
- Martínez-Argudo, I., Little, R., Shearer, N., Johnson, P. & Dixon, R. 2005. Nitrogen fixation: key genetic regulatory mechanisms. *Biochem. Soc. Trans.*, 33(1):152-156.
- Masepohl, B. & Forchhammer, K. 2007. Regulatory Cascades to Express Nitrogenases. Pp. 132-145. In: Bothe, H., Ferguson, S. & Newton, W. (Eds.) *Elsevier, Amsterdam*. 427 pp.
- Mavrodi, D. V., Loper, J. E., Paulsen, I. T. & Thomashow, L. S. 2009. Mobile genetic elements in the genome of the beneficial rhizobacterium *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *BMC Microbiology*, 9:8.
- Mergeay, M. & Gerits, J. 1978. F'-Plasmid Transfer from *Escherichia coli* to *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.*, 135(1): 18-28.
- Mirza, M. S., Mehnaz, S., Normand, P., Prigent-Combaret, C., Moëgne-Loccoz, Y., Bally, R. & Malik, K. A. 2006. Molecular characterization and PCR detection of a nitrogen-fixing *Pseudomonas* strain promoting rice growth. *Biol. Fertil. Soils*, 43: 163-170.
- Newton, W. E. & Dilworth, M. J. 2011. Assays of Nitrogenase Reaction Products. Chapter 8. In: Ribbe, M. W. (Ed.). 2011. Nitrogen Fixation, Methods in Molecular Biology. *Human Press, Amsterdam*. 766 pp.
- Newton, W. E. 2007. Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology of Nitrogen Fixation. Pp. 109-129. In: Bothe, H., Ferguson, S. J. & Newton, W. E. (eds.). *Biology of the Nitrogen Cycle. Elsevier, Amsterdam*. 427 pp.
- Olivares, J.; Bedmar, E. J. & Sanjuán, J. 2013. Biological Nitrogen Fixation in the Context of Global Change. *MPMI*, 26(5): 486-494.
- Ogunseitan, O. 2005. Microbial diversity: Form and Function in Prokaryotes. *Blackwell Publishing, Oxford*. 292 pp.
- Özen, A. & Ussery, D. W. 2012. Defining the *Pseudomonas* Genus: Where do we draw the line with *Azotobacter*? *Microb. Ecol.*, 63(2): 239-248.
- Palma, R. M. & Segat, A. L. 2000. Nitrógeno del suelo. Pp. 273-290. En: Conti, M. E. (ed.) *Principios de Edafología. Editorial Facultad de Agronomía, Buenos Aires*. 446 pp.

- Paulsen, I. T., Press, C. M., Ravel, J., Kobayashi, D. Y., Myers, G., Mavrodi, D. V., DeBoy, R., Seshadri, R., Ren, Q., Madupu, R., Dodson, R. J., Durkin, A. S., Brinkac, L. M., Daugherty, S. C., Sullivan, S. A., Rosovitz, M. J., Gwinn, M. L., Zhou, L., Schneider, D. J., Cartinhour, S. W., Nelson, W. C., Weidman, J., Watkins, K., Tran, K., Khouri, H., Pierson, E. A., Pierson III; L. S.; Thomashow, L. S. & Loper, J. E. 2005. Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nature Biotechnology*, 23(7): 873-878.
- Peters, J. W. & Szilagyi, R. K. 2006. Exploring new frontiers of nitrogenase structure and mechanism. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 10(2): 101-108.
- Postgate, J. R. & Kent, H. M. 1987. Qualitative Evidence for Expression of *Klebsiella pneumoniae nif* in *Pseudomonas putida*. *J. Gen. Microbiol.*, 133: 2563-2566.
- Postgate, J. R. & Krishnapillai, V. 1977. Expression of *Klebsiella nif* and *his* Genes in *Salmonella typhimurium*. *J. Gen. Microbiol.*, 98(2): 379-385
- Ramette, A., Frapolli, M., Fischer-Le Saux, M., Gruffaz, C., Meyer, J. M., Défago, G., Sutra, L. & Moëgne-Loccoz, Y. 2011. *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Syst. Appl. Microbiol.*, 34(3): 180-188.
- Raymond, J., Siefert, J. L., Staples, C. R. & Blankenship, R. E. 2004. The Natural History Nitrogen Fixation. *Mol. Biol. Evol.*, 21(3): 541-554.
- Rediers, H., Vanderleyden, J. & De Mot, R. 2004. *Azotobacter vinelandii*: a *Pseudomonas* in disguise? *Microbiology*, 150(5):1117-1119.
- Rees, D. C. & Howard, J. B. 2000. Nitrogenase: standing at the crossroads. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4(5): 559-566.
- Rees, D. C., Akif Tezcan, F., Haynes, C. A., Walton, M. Y., Andrade, S., Einsle, O., Howard, J. B. 2005. Structural basis of biological nitrogen fixation. *Philos. Trans. A Math Phys Eng Sci.*, 363(1829):971-984.
- Reinhold-Hurek, B., Hurek, T., Gillis, M., Hoste, B., Vancanneyt, M., Kersters, K. & De Ley, J. 1993. *Azoarcus* gen. nov., Nitrogen-Fixing Proteobacteria Associated with Roots of Kallar Grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and Description of Two Species, *Azoarcus indigenus* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43(3): 574-584.
- Riggs, P. J., Chelius, M. K., Iniguez, A. L., Kaeppler, S. M. & Triplett, E. W. 2001. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. *Aust. J. Plant Physiol.*, 28(9):829-836.
- Rodríguez-Barrueco, C., Sevillano García, F. & Subramaniam, P. 1985. La fijación de nitrógeno atmosférico. Una biotecnología en la producción agraria. *Centro de Edafología y Biología Aplicada de Salamanca (C.S.I.C.) EXCMA. Diputación Provincial. Salamanca.*, 65 pp.
- Salantur, A., Ozturk, A. & Akten, S. 2006. Growth and yield response of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) to inoculation with rhizobacteria. *Plant Soil Environ.*, 52(3): 111-118

- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.* 2222 pp.
- Setten, L., Soto, G., Mozzicafreddo, M., Fox, A. R., Lisi, C., Cuccioloni, M., Angeletti, M., Pagano, E., Díaz-Paleo, A. & Ayub, N. 2013. Engineering *Pseudomonas protegens* Pf-5 for nitrogen fixation and its application to improve plant growth under nitrogen-deficient conditions. *PLoS ONE*, 8(5): 1-14. e63666.
- Setubal, J. C., dos Santos, P., Goldman, B. S., Ertesvåg, H., Espin, G., Rubio, L. M., Valla, S., Almeida, N. F., Balasubramanian, D., Cromes, L., Curatti, L., Du, Z., Godsy, E., Goodner, B., Hellner-Burris, K., Hernandez, J. A., Houmiel, K., Imperial, J., Kennedy, C., Larson, T. J., Latreille, P., Ligon, L. S., Lu, J., Mærk, M., Miller, N. M., Norton, S., O'Carroll, I. P., Ian Paulsen, I., Raulfs, E. C., Roemer, R., Rosser, J., Segura, D., Slater, S., Stricklin, S. L., Studholme, D. J., Sun, J., Viana, C. J., Wallin, E., Wang, B., Wheeler, C., Zhu, H., Dean, D. R., Dixon, R. & Wood, D. 2009. Genome Sequence of *Azotobacter vinelandii*, an Obligate Aerobe Specialized To Support Diverse Anaerobic Metabolic Processes. *J. Bacteriol.*, 191(14): 4534-4545.
- Shah, Z., Shah, S. H., Peoples, M. B., Schwenke, G. D. & Herridge, D. F. 2003. Crop residue and fertiliser N effects on nitrogen fixation and yields of legume-cereal rotations and soil organic fertility. *Field Crop Res.*, 83(1): 1-11.
- Shaukat, S.S. & Siddiqui, I. A. 2003. Impact of biocontrol agents *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and its genetically modified derivatives on the diversity of culturable fungi in the rhizosphere of mungbean. *J. Appl. Microbiol.*, 95: 1039-1048.
- Sheppard, L. J. & Wallander, H. 2004. Atmospheric Nitrogen – Pollutant or Fertiliser?. Pp. 65-98. In: Amâncio, S. & Stulen, I. Nitrogen Acquisition and Assimilation in Higher Plants. *Kluwer Academic Publishers. Netherlands.* 304 pp.
- Simon, R., Priefer, U., Pühler, A. 1983b. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Biotechnology*, 1:784-791.
- Soto, G., Alleva, K., Mazzella, M. A., Amodeo, G. & Muschietti, J. P. 2008. *AtTIP1;3* and *AtTIP5;1*, the only highly expressed *Arabidopsis* pollen-specific aquaporins, transport water and urea. *FEBS Lett.*, 582(29): 4077-4082.
- Soto, G., Stritzler, M., Lisi, C., Alleva, K., Pagano, M. E., Ardila, F., Mozzicafreddo, M., Cuccioloni, M., Angeletti, M. & Ayub, N. D. 2011. Acetoacetyl-CoA thiolase regulates the mevalonate pathway during abiotic stress adaptation. *J. Exp. Bot.*, 62(15): 5699-5711.
- Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98: 503-517.
- Streicher, S., Gurney, E. & Valentine, R. C. 1971. Transduction of the Nitrogen-Fixation Genes in *Klebsiella pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68(6): 1174-1177.
- Sullivan, J. T. & Ronson, C. W. 1998. Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into phe-tRNA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(9): 5145-5149.

- Sullivan, J. T., Eardly, B. D., van Berkum, P. & Ronson, C. W. 1996. Four Unnamed Species of Nonsymbiotic Rhizobia Isolated from the Rhizosphere of *Lotus corniculatus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(8): 2818-2825.
- Sullivan, J. T., Patrick, H. N., Lowther, W. L., Scott, D. B. & Ronson, C. W. 1995. Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 8985-8989.
- Taiz, L. & Zeiger, E. 2006. Plant Physiology 4th Edition. *Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts*. 700 pp.
- Triplett, E. W. 1996. Diazotrophic endophytes: progress and prospects for nitrogen fixation in monocots. *Plant Soil*, 186: 29 – 38.
- Triplett, E. W. 2007. Prospects for significant nitrogen fixation in grasses from bacterial endophytes. Pp. 303-314. In: Elmerich, C. & Newton, W. E. Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations. *Springer, Dordrecht*. 5: 336 pp.
- Van Dommelen, A. & Vanderleyden, J. 2007. Associative Nitrogen Fixation. Pp. 179-192. In: Bothe, H., Ferguson, S. & Newton, W. (Eds.). *Biology of the nitrogen cycle*. Elsevier, Amsterdam. 427 pp.
- Vermeiren, H., Willems, A., Schoofs, G., de Mot, R., Keijers, V., Hai, W. & Vanderleyden, J. 1999. The Rice inoculant strain *Alcaligenes faecalis* A15 is a Nitrogen-fixing *Pseudomonas stutzeri*. *System. Appl. Microbiol.*, 22: 215-224.
- Vessey, J. K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil*, 255(2): 571-586.
- Vogel, H. J. & Bonner, D. M. 1956. Acetylornithinase of *Escherichia coli*: Partial purification and some properties. *J. Biol. Chem.*, 218: 97-106.
- Wang, L., Zhang, L., Zhangzhi, L., Zhao, D., Liu, X., Zhang, B., Xie, J., Hong, Y., Li, P., Chen, S., Dixon, R. & Li, J. 2013. A minimal nitrogen fixation gene cluster from *Paenibacillus* sp. WLY78 enables expression of active nitrogenase in *Escherichia coli*. *PLOS Genetics*, 9(10): 1-11.
- Wheatley, R. E., MacDonald, R. & Smith, A. 1989. Extraction of nitrogen from soils. *Biol. Fert. Soils*, 8: 189-190.
- Xie, Z., Dou, Y., Ping, S., Chen, M., Wang, G., Elmerich, C. & Lin, M. 2006. Interaction between NifL and NifA in the nitrogen-fixing *Pseudomonas stutzeri* A1501. *Microbiology*, 152: 3535-3542.
- Yan, Y., Yang, J., Dou, Y., Chen, M., Ping, S., Peng, J., Lu, W., Zhang, W., Yao, Z., Li, H., Liu, W., He, S., Geng, L., Zhang, X., Yang, F., Yu, H., Zhan, Y., Li, D., Lin, Z., Wang, Y., Elmerich, C., Lin, M. & Jin, Q. 2008. Nitrogen fixation island and rhizosphere competence traits in the genome of root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501. *PNAS*, 105(21): 7564-7569.
- Young, J. M. & Park, D. C. 2007. Probable synonymy of the nitrogen-fixing genus *Azotobacter* and the genus *Pseudomonas*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57: 2894-2901.

- Yu, H., Yuan, M., Lu, W., Yang, J., Dai, S., Li, Q., Yang, Z., Dong, J., Sun, L., Deng, Z., Zhang, W., Chen, M., Ping, S., Han, Y., Zhan, Y., Yan, Y., Jin, Q. & Lin, M. 2011. Complete Genome Sequence of the Nitrogen-Fixing and Rhizosphere-Associated Bacterium *Pseudomonas stutzeri* Strain DSM4166. *J. Bacteriol.*, 193(13): 3422-3423.
- Zhang, T., Yan, Y., He, S., Ping, S., Alam, K. M., Han, Y., Liu, X., Lu, W., Zhang, W., Chen, M., Xiang, W., Wang, X. & Lin, M. 2012. Involvement of the ammonium transporter AmtB in nitrogenase regulation and ammonium excretion in *Pseudomonas stutzeri* A1501. *Res. Microbiol.*, 163(5): 332-339.
- Zhang, Y., Pohlmann, E. L., Ludden, P. W. & Roberts, G. P. 2000. Mutagenesis and Functional Characterization of the *glnB*, *glnA*, and *nifA* Genes from the Photosynthetic Bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol.*, 182(4): 983-992.