



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 309 191**

51 Int. Cl.:
A01H 17/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02755280 .1**

96 Fecha de presentación : **30.08.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1422997**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.06.2004**

54

Título: **Fijación de nitrógeno endosimbiótica no nodular sistémica en plantas.**

30

Prioridad: **31.08.2001 GB 0121126**

73

Titular/es: **The University of Nottingham
University Park
Nottingham NG7 2RD, GB**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2008

72

Inventor/es: **Cocking, Edward, Charles, Daniel**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2008

74

Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 309 191 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 309 191 T3

DESCRIPCIÓN

Fijación de nitrógeno endosimbiótica no nodular sistémica en plantas.

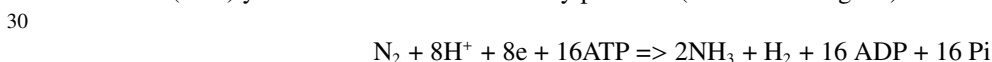
5 Esta invención se refiere a la fijación de nitrógeno y en particular, pero no exclusivamente, a la fijación de nitrógeno en plantas no leguminosas y leguminosas, y a un método de establecimiento de la fijación de nitrógeno en plantas no leguminosas y leguminosas.

10 Aunque el gas nitrógeno (N₂) constituye el 78% de la atmósfera, no está disponible para ser usado por las plantas y la mayoría de los otros organismos porque hay un enlace triple entre los dos átomos de nitrógeno, que hace la molécula casi inerte. Para que el gas nitrógeno sea usado para el crecimiento primero debe ser fijado (es decir, reducido por hidrógeno a amoníaco) y estar disponible en la forma combinada de amonio (NH₄⁺) o nitrato (NO₃⁻); ciertos tipos de bacterias pueden realizar esta fijación biológica del nitrógeno reduciendo el nitrógeno gaseoso a amoníaco (NH₃) utilizando enzimáticamente la enzima nitrogenasa. La disponibilidad de nitrógeno fijado es a menudo el factor
15 limitante para el crecimiento vegetal y la producción de biomasa en ambientes donde existe un clima adecuado y disponibilidad de agua para soportar la vida.

20 Químicamente la mayoría del amoníaco es producido de forma industrial mediante el proceso de Haber-Bosch combinando catalíticamente el nitrógeno atmosférico con hidrógeno para formar amoníaco, usando un catalizador a base de hierro a alta temperatura y presión muy elevada. Una cantidad relativamente muy pequeña de amoníaco es producida como resultado de descargas eléctricas en la atmósfera.

25 La demanda de mayor rendimiento de los cultivos en el Siglo XX y en este siglo ha requerido que la fijación biológica de nitrógeno por bacterias sea sustituida cada vez más por el uso de nitrógeno fijado a partir de fertilizantes químicos.

La fijación biológica de nitrógeno puede ser representada por la siguiente ecuación, en la cual dos moléculas de amoníaco son producidas a partir de una molécula de gas nitrógeno, a expensas de 16 moléculas de trifosfato de adenosina (ATP) y un suministro de electrones y protones (iones de hidrógeno):



35 Esta reacción es realizada en bacterias, usando un complejo de enzima llamada nitrogenasa. Esta enzima consiste en dos proteínas - una proteína de hierro (Fe) y una proteína de Molibdeno-Hierro (Mo-Fe).

40 La reacción ocurre mientras el N₂ es enlazado al complejo de la enzima nitrogenasa. La proteína de Fe es reducida primero por electrones donados por la ferredoxina. Luego la proteína de Fe reducida se enlaza al ATP y reduce la proteína Mo-Fe, que dona electrones al N₂, produciendo HN = NH. En dos ciclos más de este proceso (cada uno requiriendo electrones donados por la ferredoxina) HN = NH es reducido a H₂N-NH₂ y este a su vez es reducido a 2NH₃.

En dependencia del tipo de bacteria, la ferredoxina reducida que suministra los electrones para este proceso es generada mediante fotosíntesis, respiración o fermentación.

45 Los ejemplos más familiares de simbiosis de fijación de nitrógeno entre plantas y bacterias rizobiales son los nódulos de la raíz de las legumbres (guisantes, frijoles, trébol y similares). En estas simbiosis los rizobios "invaden" la planta a través de los pelos de la raíz o de sitios de entrada de grieta (es decir, intercelularmente entre las células epidérmicas) y provocan la formación de un nódulo que induce la proliferación localizada de las células hospederas de la planta. Posteriormente, los rizobios invaden las células del nódulo penetrando la pared celular y siendo engullido por invaginaciones de la membrana plasmática (endocitosis). Como consecuencia dentro de las células del nódulo los rizobios son encerrados en vesículas (pequeñas vacuolas) unidas a la membrana en las cuales fijan el nitrógeno, utilizando productos de la fotosíntesis de la planta como carbono y fuentes de energía, y suministran nitrógeno fijado biológicamente a la planta para el crecimiento y desarrollo (endosimbiosis). El microsimbión bacteriano es intracelular, pero es siempre extra-citoplasmático debido a la integridad de la membrana circundante.

55 Cultivos no legumbres, entre los que se incluyen los principales cereales del mundo por ejemplo trigo, maíz y arroz, no forman nódulos y son dependientes del nitrógeno fijado a partir del suelo para su nutrición, o de fertilizantes químicos/nitrogenados.

60 Sin embargo, los problemas energéticos y ambientales surgidos por el uso excesivo de fertilizantes nitrogenados han resaltado una necesidad de que los cultivos no leguminosos obtengan más de su nitrógeno del aire mediante fijación biológica de nitrógeno.

65 Es conocido que una interacción de fijación de nitrógeno intercelular, sistémica, endofítica con *Acetobacter diazotrophicus* y *Herbaspirillum spp.*, sin la necesidad de nodulación, ocurre de manera natural en variedades brasileñas de la caña de azúcar. La caña de azúcar es un miembro de la familia herbácea, Gramineae, que también incluye los cereales. Esta relación de fijación de nitrógeno no nodular, intercelular, endofítica también puede ser posible en arroz, trigo, maíz y en otros cultivos no leguminosos.

ES 2 309 191 T3

También es conocido de varios trabajos científicos publicados, evaluados por expertos, en el arte que no existe evidencia de que la fijación endofítica de nitrógeno entre las bacterias diazotróficas y la planta hospedera ocurre intracelularmente en células vivas. Por ejemplo, en *Biological Nitrogen fixation for the 21st Century* páginas 685-692 se declara que no existe evidencia de la presencia de bacterias diazotróficas endofíticas dentro de las células vivas. James en “*Field Crops Research 2000* páginas 197-209” describe que “diazotróficas endofíticas han sido observadas solo dentro de espacios intercelulares, tejido vascular, *aerenchyma* y células muertas de sus hospederas y no en células vivas”. Egener y otros., en “*M PMI Vol. 12* (1999) páginas 813-819” también describen que no existe evidencia de bacterias diazotróficas endofíticas dentro de las células vivas de la planta.

La presente invención tiene como objetivo proporcionar plantas no leguminosas y leguminosas, incluyendo legumbres que no nodulan con rizobios, con bacterias que les permiten fijar el nitrógeno endofíticamente, resolviendo así muchos de los problemas asociados al uso de los fertilizantes químicos/nitrogenados.

En correspondencia, la presente invención, en un primer aspecto, proporciona una planta no leguminosa o leguminosa, que contiene bacterias que fijan el nitrógeno, *Acetobacter diazotrophicus* (sin, *Gluconacetobacter diazotrophicus*), dichas bacterias estando localizadas intracelularmente en las células vivas de la planta y proporcionando el nitrógeno fijado a dicha planta.

De acuerdo con el segundo aspecto, la presente invención proporciona además un método para inocular a una planta no leguminosa o leguminosa con bacterias que fijan el nitrógeno, *Acetobacter diazotrophicus* (sin. *Gluconacetobacter diazotrophicus*), situadas intracelularmente en las células vivas de la planta y proporcionando el nitrógeno fijado a dicha planta el cual comprende la inoculación de dicha planta con entre 1 y 100 de dichas bacterias por mililitro del inóculo cuando ocurre la germinación de dicha planta o hasta siete días después de la misma.

La planta no leguminosa es seleccionada preferiblemente de la familia herbácea Gramineae (incluye arroz [*Oryza sativa*], trigo [*Triticum aestivum*] y maíz [*Zea mays*]). La planta no leguminosa también puede ser seleccionada de familias tales como: Solanaceae (incluye tomate, patata y tabaco), Brassicaceae/Cruciferae (incluye coles, nabos, colza y la planta modelo *Arabidopsis thaliana*), Malvaceae (incluye algodón), Compositae/Asteraceae (incluye girasol y lechuga), Euphorbiaceae (incluye yuca), Chenopodiaceae (incluye remolacha de azúcar). La planta leguminosa es seleccionada preferiblemente de Leguminosae (incluye soja, trébol, alfalfa, guisantes y otros frijoles).

La planta no leguminosa, o la planta leguminosa, puede ser inoculada con entre 1 a 1×10^7 bacterias por mililitro de inóculo. La planta no leguminosa o la planta leguminosa es inoculada preferiblemente con entre 1 a 100 bacterias por mililitro de inóculo.

La planta no leguminosa, o la planta leguminosa, es preferiblemente inoculada con 1-10 bacterias por mililitro de inóculo. La planta no leguminosa, o leguminosa, es más preferiblemente inoculada con 1-2 bacterias por mililitro de inóculo. Idealmente la planta no leguminosa, o leguminosa, es lo más preferiblemente inoculada con una bacteria por mililitro de inóculo.

La planta no leguminosa, o leguminosa, es inoculada preferiblemente cuando ocurre la germinación o hasta alrededor de siete días después de la misma.

Hemos descubierto que usando una concentración muy baja de bacterias en el inóculo podemos obtener plantas que son más sanas que aquellas inoculadas con concentraciones más elevadas de bacterias. También hemos descubierto que la *Acetobacter diazotrophicus* secreta grandes cantidades de ácido indolacético (IAA), una hormona de crecimiento vegetal. Es conocido que la respuesta de varias especies de plantas al IAA externo (liberado de forma microbiana) puede variar de efectos beneficiosos a nocivos, dependiendo de la concentración de IAA en la raíz de la planta. En general, cuando el IAA está presente en concentraciones más elevadas que las que serían encontradas normalmente en una planta, la concentración aumentada de IAA inhibe el crecimiento, y altera el fenotipo de la planta. También, en concentraciones bajas el IAA (u otras sustancias de crecimiento vegetal) secretado por bacterias puede estar actuando como una molécula señalizadora bacteriana de la planta (y otras sustancias de crecimiento vegetal) para el establecimiento endofítico intracelular de *Acetobacter diazotrophicus*.

Las bacterias que fijan el nitrógeno pueden fijar nitrógeno en presencia de hasta 10% de oxígeno. Preferiblemente las bacterias fijan nitrógeno en presencia de entre 2% y 7% de oxígeno.

Las bacterias que fijan el nitrógeno son intracelulares. Las bacterias intracelulares que fijan el nitrógeno están más preferiblemente presentes en vesículas unidas a la membrana y vacuolas dentro del citoplasma de la célula de la planta.

Las bacterias que fijan el nitrógeno son encontradas preferiblemente en colonias en vesículas y vacuolas.

Las colonias están localizadas preferiblemente en estructuras que tienen configuración poliédrica. Lo más preferiblemente las estructuras son substancialmente romboidales.

Estas estructuras son cápsulas de levana, un polímero de oligo-fructosida de β -D-fructosa secretado por *A. diazotrophicus*.

ES 2 309 191 T3

Es un resultado sorprendente e inesperado que la presente invención proporcione una simbiosis intracelular sistémica, no nodular, entre las bacterias que fijan el nitrógeno y una planta no leguminosa, dichas bacterias estando localizadas dentro de las células vivas de la planta. Esto no había sido observado antes. Como fue mencionado previamente, es conocido que en otras simbiosis entre las bacterias que fijan el nitrógeno y otras plantas no leguminosas, por ejemplo, caña de azúcar, las bacterias existen en los espacios intercelulares entre las células (el apoplasto) y dentro de las células muertas de la xilema.

También es un resultado sorprendente e inesperado que la presente invención proporcione una simbiosis intracelular sistémica, no nodular similar entre bacterias que fijan el nitrógeno y una planta leguminosa, o no leguminosa, dichas bacterias estando localizadas dentro de las células vivas de la planta. Esto no ha sido observado antes.

Otro resultado sorprendente e inesperado es que las bacterias que fijan el nitrógeno, están situadas intracelularmente en células vivas dentro de vesículas y vacuolas en el citoplasma tanto en una planta no leguminosa como en una planta leguminosa.

Las bacterias pueden propagarse de una célula de la planta a otra célula de la planta mediante división de las células de la planta en el meristemo y divisiones subsiguientes de las mismas.

Las bacterias pueden convertirse en sistémicas al moverse a través de la xilema. Alternativamente pueden convertirse en sistémicas mediante división de las células de la planta y divisiones subsiguientes de las mismas. Las bacterias pueden convertirse en sistémicas mediante combinaciones de lo anterior.

En correspondencia, la presente invención proporciona además, en un tercer aspecto, un método para producir una planta leguminosa o no leguminosa que contiene bacterias que fijan el nitrógeno, en el cual dichas bacterias han sido introducidas por inoculación de entre 1 y 100 bacterias por mililitro de inóculo cuando ocurre la germinación de dicha planta o hasta siete días después de la misma, y se han convertido en sistémicas mediante división de las células de la planta y divisiones subsiguientes de las mismas, dichas bacterias siendo *Acetobacter diazotrophicus* (sin. *Gluconacetobacter diazotrophicus*) y estando localizadas intracelularmente en células vivas de la planta.

La presente invención será descrita ahora, simplemente a modo de ejemplo, haciendo referencia a las Figuras acompañantes, de las cuales:

Las Figuras 1 a la 13 se refieren a la presente invención en una planta no leguminosa de (*Lycopersicon esculentum*; tomate).

La Figura 1A y B muestran *A. diazotrophicus* UAP 5541/pRGS561 GUS invadiendo el meristemo y los pelos de la raíz (A) y las células del meristemo (B) de raíces laterales de una planta inoculada de acuerdo con la presente invención. Bar = 25 μm (A) y 5 μm (B).

La Figura 1C y D muestra *A. diazotrophicus* UAP 5541/pRGS561 GUS en vesículas y vacuolas en secciones finas de células del meristemo de una planta inoculada de acuerdo con la presente invención. Bar = 5 μm (C y D).

La Figura 2A muestra colonias de *A. diazotrophicus* UAP5541/pRGS561 GUS en la xilema de raíces laterales en una planta inoculada de acuerdo con la presente invención. Bar = 5 μm .

La Figura 2B muestra *A. diazotrophicus* UAP5541/pRGS561 GUS en células de la corteza cerca de la xilema invadida en una planta inoculada de acuerdo con la presente invención. Bar = 5 μm .

La Figura 2C muestra *A. diazotrophicus* UAP5541/pRGS561 GUS en la xilema de una raíz primaria en una planta inoculada de acuerdo con la presente invención. Bar = 5 μm .

La Figura 3A muestra la invasión de *A. diazotrophicus* UAP5541/pRGS561 GUS de una raíz lateral secundaria emergente de una planta inoculada de acuerdo con la presente invención. Bar = 5 μm .

La Figura 3B muestra *A. diazotrophicus* UAP5541/pRGS561 GUS invadiendo una raíz lateral secundaria emergente a través de un sitio de entrada de grieta en una planta inoculada de acuerdo con la presente invención. Bar = 25 μm .

La Figura 4A y B muestra la colonización de *A. diazotrophicus* UAP 5541/pRGS561 GUS de la corteza y la xilema en la raíz de una planta de acuerdo con la presente invención. Bar = 25 μm (A y B).

La Figura 4C muestra la colonización de *A. diazotrophicus* UAP5541/pRGS561 GUS desde la xilema hasta las células del floema y la corteza de una raíz de una planta de acuerdo con la presente invención. Bar = 5 μm .

ES 2 309 191 T3

La Figura 4D muestra colonias de *A. diazotrophicus* UAP5541/pRGS561 GUS dentro de una célula de la corteza de una raíz de una planta de acuerdo con la presente invención. Bar = 5 μm .

La Figura 5 muestra la colonización de *A. diazotrophicus* UAP5541/pRGS561 GUS propagándose de la xilema hasta el floema en el tallo de una planta de acuerdo con la presente invención. Bar = 5 μm .

La Figura 6 muestra *A. diazotrophicus* UAP 5541/pRGH562 (*NifH-GUSA*) en la punta de la raíz de una planta de acuerdo con la presente invención (iluminación del campo oscuro) Bar = 50 μm .

La Figura 7 muestra *A. diazotrophicus* UAP 5541/pRGH562 (*NifH-GUSA*) colonizando una raíz lateral secundaria emergente de una planta de acuerdo con la presente invención, (iluminación del campo oscuro) Bar = 50 μm .

La Figura 8A muestra colonias de *A. diazotrophicus* UAP 5541/pRGH562 (*NifH-GUSA*) en el meristemo de una raíz de una planta de acuerdo con la presente invención. Bar = 25 μm .

La Figura 8B muestra colonias de *A. diazotrophicus* UAP5541/pRGH562 (*NifH-GUSA*) en las células del meristemo de la raíz de una planta de acuerdo con la presente invención. Bar = 5 μm .

La Figura 9 muestra colonias uniformemente romboidales tipo cristalino de *A. diazotrophicus* UAP5541/pRGH562 (*NifH-GUSA*) en las células de la corteza de la raíz en una planta de acuerdo con la presente invención. Bar = 5 μm .

La Figura 10 muestra colonias de *A. diazotrophicus* UAP 5541/pRGH562 (*NifH-GUSA*) en el sistema vascular de la raíz de una planta de acuerdo con la presente invención. (Iluminación de la imagen oscura) Bar = 50 μm .

La Figura 11 muestra colonias de *A. diazotrophicus* UAP5541/pRGH562 (*NifH-GUSA*) en la xilema y la corteza de la raíz de una planta de acuerdo con la presente invención. Bar = 5 μm .

La Figura 12 muestra la propagación de *A. diazotrophicus* UAP 5541/pRGH562 (*NifH-GUSA*) desde la xilema hasta la región del floema en el tallo de una planta de acuerdo con la presente invención. Bar = 5 μm .

La Figura 13 muestra *A. diazotrophicus* UAP 5541/pRGH562 (*NifH-GUSA*) en el cloroplasto que contiene células en el tallo de una planta de acuerdo con la presente invención. Bar = 5 μm .

Las Figuras 14 a 19 se refieren a la presente invención en una planta leguminosa (*Trifolium repens*, trébol blanco).

La Figura 14 muestra *A. diazotrophicus* UAP 5541/pRGH562 (*NifH-GUSA*) en el sistema vascular y en células de la corteza de la raíz de una planta de acuerdo con la presente invención. Bar = 25 μm .

La Figura 15 muestra *A. diazotrophicus* UAP5541/pRGH562 (*NifH-GUSA*) en la xilema y la región del floema de la raíz de una planta de acuerdo con la presente invención. Bar = 5 μm .

La Figura 16 muestra *A. diazotrophicus* UAP 5541/pRGH562 (*NifH-GUSA*) en el sistema vascular de la hoja de una planta de acuerdo con la presente invención. Bar = 5 μm .

La Figura 17 muestra *A. diazotrophicus* UAP 5541/pRGH562 (*NifH-GUSA*) en la xilema de una vena de la hoja de una planta de acuerdo con la presente invención. Bar = 5 μm .

La Figura 18 muestra la propagación de *A. diazotrophicus* UAP 5541/pRGH562 (*NifH-GUSA*) desde la xilema hasta el mesofilo (cloroplasto que contiene células) de la hoja de una planta de acuerdo con la presente invención. Bar = 25 μm .

La Figura 19 muestra *A. diazotrophicus* UAP5541/pRGH562 (*NifH-GUSA*) en el cloroplasto que contiene células del mesofilo de una hoja de una planta de acuerdo con la presente invención. Bar = 5 μm .

Las Figuras 20 a la 22 se refieren a la presente invención en el trigo cereal (*triticum aestivum*).

La Figura 20 muestra *A. diazotrophicus* UAP5541/pRGH562 (*NifH-GUSA*) invadiendo células de la corteza joven de la raíz de una raíz lateral de una planta inoculada de acuerdo con la presente invención. Bar = 25 μm

ES 2 309 191 T3

La Figura 21 muestra con gran ampliación colonias de *A. diazotrophicus*, como en la Figura 20, en una célula cortical de la raíz lateral. Bar = 5 μ m

La Figura 22 muestra una agrupación de colonias de *A. diazotrophicus* UAP5541/pRGH562 (*NifH-GUSA*) en la vacuola de una célula epidérmica de la hoja, después del tratamiento con etanol para quitar la clorofila de la hoja. Bar = 5 μ m

Las Figuras 23 a 25 se refieren a la presente invención en la colza (*Brassica napus*).

La Figura 23 muestra *A. diazotrophicus* UAP5541/pRGH562 (*NifH-GUSA*) en la xilema del tallo de una planta inoculada de acuerdo con la presente invención. Bar = 5 μ m

La Figura 24 muestra *A. diazotrophicus* UAP5541/pRGH562 (*NifH-GUSA*) en la xilema del tallo de una planta inoculada de acuerdo con la presente invención. Bar = 25 μ m

La Figura 25 muestra *A. diazotrophicus* UAP5541/pRGH562 (*NifH-GUSA*) en cloroplasto que contiene células del tallo de una planta inoculada de acuerdo con la presente invención. Bar = 5 μ m

Las Figuras 26 y 27 se refieren a la presente invención en el arroz cereal (*Oryza sativa*).

La Figura 26 muestra *A. diazotrophicus* UAP5541/pRGH562 (*NifH-GUSA*) invadiendo una célula de la corteza de la raíz del arroz varias células por debajo de la epidermis de la raíz joven de una planta inoculada de acuerdo con la presente invención. Bar = 5 μ m

La Figura 27 muestra *A. diazotrophicus* UAP5541/pRGH562 (*NifH-GUSA*) invadiendo células de la corteza de una raíz madura de arroz de una planta inoculada de acuerdo con la presente invención. Bar = 5 μ m

Las Figuras 28 y 29 se refieren a la presente invención en Arabidopsis no legumbre (*Arabidopsis thaliana*).

La Figura 28 muestra *A. diazotrophicus* UAP5541/pRGH562 (*NifH-GUSA*) invadiendo las células del meristemo de una raíz lateral de una planta inoculada de acuerdo con la presente invención. Bar = 25 μ m

La Figura 29 muestra *A. diazotrophicus* UAP5541/pRGH562 (*NifH-GUSA*) invadiendo células de una raíz lateral de una planta inoculada de acuerdo con la presente invención. Bar = 5 μ m

La Figura 30 muestra colonias de *A. diazotrophicus* dentro de la vacuola de una célula viva de la corteza de la raíz del trébol inoculada de acuerdo con la presente invención. Bar = 25 μ m

La Figura 31.A muestra colonias de *A. diazotrophicus* con gran ampliación dentro de la vacuola de una célula viva de la corteza de la raíz del trébol. La inoculación fue de acuerdo con la presente invención. Bar = 5 μ m

La Figura 31.B muestra otra región de la corteza de la raíz del trébol que muestra numerosas colonias de *A. diazotrophicus* dentro de la vacuola de una célula viva. Bar = 5 μ m

La Figura 32 muestra un cristal grande (cristalizado a partir del agua) de Levana (Sigma L8674). Bar = 5 μ m

Germinación de la Semilla

Lycopersicon esculentum var. semillas de Ailsa Craig, *Trifolium repens* var. semillas de Kent, *Triticum aestivum* var. semillas de Hereford, *Brassica napus* var. semillas de Express, *Oryza sativa* var. semillas de Lemont y *Arabidopsis thaliana* var. semillas de Col-O tipo ecológico fueron superficialmente esterilizadas en una solución de hipoclorito 15% (v/v) (Domestos) durante quince minutos.

La solución de hipoclorito fue drenada usando un tamiz estéril y las semillas fueron enjuagadas a continuación seis veces con agua desionizada estéril.

Las semillas fueron colocadas en un frasco cónico estéril de 250 ml que contenía 15 ml de agua desionizada estéril. Luego el frasco fue colocado en un agitador a 24-26°C en la obscuridad y las semillas fueron dejadas impregnar durante tres a cuatro días.

Luego las semillas fueron colocadas en la superficie de agar estéril individualmente en jarras (175 ml de capacidad conteniendo 50 ml de medio de Murashige y Skoog (Sigma M5519) 0.8% p/v de agar y 3% p/v de sacarosa) usando fórceps estériles.

ES 2 309 191 T3

Plántulas fueron cultivadas durante seis a siete días en las siguientes condiciones:

5	Temperatura durante el día	25°C
	Temperatura durante la noche	16°C
10	Período de exposición a la luz	0600-2200

15 Luz diurna artificial fue proporcionada mediante tubos fluorescentes “daylight” 250 $\mu\text{Em}^{-2}\text{S}^{-1}$.

Inoculación con Acetobacter diazotrophicus

20 Dos cepas de *Acetobacter diazotrophicus* fueron utilizadas:

A. diazotrophicus UAP 5541/p RGS561 (GUS)

A. diazotrophicus UAP 5541/p RGH562 (*NifH-GUSA*)

25 *Acetobacter diazotrophicus* fue rayada sobre tres placas Petri de 9 cm de diámetro de medio ATGUS conteniendo 45 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomomicina e incubada durante cuatro a seis días a 28°C.

30 Las bacterias fueron raspadas de la placa, usando un bucle estéril y transferidas a frascos cónicos estériles de 250 ml conteniendo 50 ml de agua desionizada estéril. Fue preparada una suspensión bacteriana que tenía una densidad óptica de 0.5-0.6 a una longitud de onda de 600 nm (5×10^8 bacterias/ml). La suspensión fue diluida 10^{-9} (es decir, aproximadamente 1 bacteria/ml).

35 1 ml de la suspensión bacteriana diluida 10^{-9} fue agregado a la base de cada planta, después de la germinación de dicha planta después de seis a siete días de crecimiento en jarras.

A la base de una planta de control, fue agregado 1 ml de agua desionizada estéril.

Todas las plantas fueron cultivadas durante doce a veinte días más.

Cosecha de plantas para coloración histoquímica

45 Las plantas fueron retiradas del agar. El exceso de agar fue eliminado secando con toallas de papel. Luego las plantas fueron coloreadas de manera histoquímica para la actividad bacteriana de GUS; el gen GUS codifica la enzima β -glucoronidasa, que hidroliza X-gluc (sal de amonio de ciclohexil 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucoronida; Gold Biotech, EE.UU.) para formar un compuesto de color azul índigo.

50 Dos controles fueron establecidos para garantizar que la reacción de coloración de GUS estaba funcionando, el primero usando una muestra de bacterias tomadas del borde de una placa de agar al 8% p/v Murashige y Skoog y el segundo fue una muestra de bacterias cultivadas en medio de ATGUS.

Método usado para colorear bacterias para la actividad GUS en tejidos de planta

55 Plantas retiradas previamente del agar fueron colocadas en un recipiente de manera que es necesaria una cantidad mínima de solución colorante. La solución colorante que contiene X-gluc fue agregada a dicho recipiente, sumergiendo dichas plantas y almacenada en la obscuridad durante la noche a 37°C en condiciones de vacío.

60 Las plantas fueron lavadas tres veces con 0.1 ml de solución tampón de fosfato de pH 7.0, y fijado con 2% (v/v) glutaraldehído en 0.1 M de solución tampón de fosfato pH 7.0. Posteriormente fue observada la coloración de las plantas mediante examen microscópico con luz directa. Las plantas fueron deshidratadas en una serie de etanol e incrustadas en LR White Resin. Secciones de planta de 1 μm fueron preparadas para la observación.

65 Plantas inoculadas con *Acetobacter diazotrophicus* UAP5541/pRGS561 (expresando constitutivamente GUS) fueron evaluadas en cuanto a la colonización endofítica 12 a 20 días después de la inoculación. Plantas coloreadas histoquímicamente fueron examinadas para detectar bacterias *Acetobacter diazotrophicus* precipitadas coloreadas en azul índigo mediante observación microscópica directa de plantas fijadas con glutaraldehído. Para los propósitos de esta especificación las bacterias coloreadas histoquímicamente son indicadas por puntos negros.

Fue demostrado por los resultados del análisis microscópico que *la Acetobacter diazotrophicus* inoculada en una concentración inicial de 1 bacteria/ml había invadido la región meristémica de raíces laterales a través de la punta de la raíz (Figura 1A + B) incluyendo las células meristémicas y convirtiéndose en establecidas en vesículas (y luego en vacuolas grandes) en el citoplasma de las células del meristemo, (Figura 1C + D). Las bacterias son indicadas como puntos negros.

También fue observado que *la Acetobacter diazotrophicus* había invadido la xilema (Figura 2A) de las raíces laterales formando colonias (indicadas por puntos negros) y también habían invadido las células de la corteza de la raíz cerca de la xilema invadida (Figura 2B). La xilema de raíces primarias también fue invadida por *la Acetobacter diazotrophicus* (Figura 2C).

También fue observada la invasión de las raíces laterales secundarias emergentes (Figura 3A) por la entrada de la grieta (Fig. 3B) en la región de emergencia. También ocurrió colonización extensa de células de la corteza (Figuras 4A y 4B). Esto es probablemente por la propagación de las bacterias (que son altamente móviles y conocidas por secretar enzimas que degradan la pared celular de la planta, por ejemplo, celulasas y pectinasas) de elementos de la xilema joven en células vecinas, incluyendo el floema (Fig. 4C). La Figura 4D muestra una célula de corteza grande de la raíz de la planta colonizada por *la Acetobacter diazotrophicus* (mostrada como puntos negros).

Fue realizado otro análisis en plantas de tomate inoculadas con *Acetobacter diazotrophicus* UAP5541/pRGH562 (*NifH-GUSA*) en el cual la expresión del gen β -glucuronidasa (*GUS*) está bajo el control de un promotor *NifH*. Por consiguiente, las bacterias solo mancharán azul en el análisis histoquímico si están siendo expresados genes de nitrogenasa. La coloración de *Acetobacter diazotrophicus* UAP5541/pRGH562 (*NifH-GUSA*) mostrada en las Figuras 6 a 13, fue comparable con la coloración de *GUS* expresada constitutivamente en *Acetobacter diazotrophicus* UAP5541/pRGH561 (Figuras 1 a 5). Las bacterias en estas figuras son indicadas por puntos negros.

La Figura 6 muestra una punta de raíz de la planta inoculada en una concentración inicial de 1 bacteria/ml. La bacteria puede ser vista como una mancha negra en la punta de la raíz. Las bacterias también invadieron las raíces laterales emergentes (Figura 7). La Figura 8A muestra bacterias colonizando las células del meristemo de una raíz y la Fig. 8B es una imagen de inmersión en aceite que muestra bacterias coloreadas en negro dentro de las células del meristemo. La Figura 9 muestra, usando un lente objetivo de inmersión en aceite, células de la corteza de una raíz de la planta. Las bacterias (mostradas en negro) son vistas dentro de células de la corteza de la raíz. Es interesante observar que las bacterias forman colonias con forma romboidal uniforme. Estas colonias son paquetes de bacterias probablemente impregnadas en el polímero incoloro de oligofruktosida, levana. Es conocido que *la Acetobacter diazotrophicus* produce levana la cual podría actuar para promover la agregación de bacterias dentro de estos grupos tipo cristalinos y proporcionar así protección de oxígeno de su nitrogenasa. La Figura 10 muestra las bacterias en el sistema vascular de la raíz y la Fig. 11 muestra bacterias en la xilema y células de la corteza de la raíz. Las bacterias también fueron encontradas en el sistema vascular del tallo como es mostrado en la Fig. 12 que también muestra la propagación de bacterias desde la xilema hasta la región del floema en el tallo de la planta.

La Acetobacter diazotrophicus también fue vista en el cloroplasto que contenía las células (Figura 13) en el tallo de la planta.

Las Figuras 14 a 19 muestran análisis en las plantas de trébol de legumbre inoculadas con *Acetobacter diazotrophicus* UAP5541/pRGH562 (*NifH-GUSA*) en el cual la expresión del gen β -glucuronidasa (*GUS*) está bajo el control de un promotor *NifH*. Por lo tanto, las bacterias solo mancharán de azul en el análisis histoquímico si están siendo expresados genes de nitrogenasa. La invasión intracelular de células vivas, la colonización sistémica de la planta y la coloración de *Acetobacter diazotrophicus* UAP5541/pRGH562 (*NifH-GUSA*) como es mostrado en las Figuras 14 a la 19 fueron comparables a lo mostrado en las plantas de tomate, no legumbres, Figura 6 a Figura 13, inoculadas de manera similar con *Acetobacter diazotrophicus* UAP5541/pRGH562 (*NifH-GUSA*) en una concentración inicial de 1 bacteria/ml. La invasión sistémica de las hojas fue muy evidente (Figura 16 a Figura 19). Las bacterias en las figuras anteriores son indicadas por puntos negros.

Las Figuras 20, 21 y 22 muestran el análisis de las plantas de trigo cereal inoculadas con *Acetobacter diazotrophicus* UAP5541/pRGH562 (*NifH-GUSA*) en el cual la expresión del gen β -glucuronidasa (*GUS*) está bajo el control de un promotor *NifH*. Por lo tanto, las bacterias colorearán de azul en el análisis histoquímico solo si están siendo expresados genes de nitrogenasa. La invasión intracelular de células vivas, la colonización sistémica de la planta y la coloración de *Acetobacter diazotrophicus* UAP5541/pRGH562 (*NifH-GUSA*) como es mostrado en las Figuras 20 a la 22 fueron comparables a lo mostrado en el tomate no legumbre (Figuras 6 a 13) y las plantas de trébol legumbre (Figuras 14 a la 19) inoculadas de manera similar con *Acetobacter diazotrophicus* UAP5541/pRGH562 (*NifH-GUSA*) en una concentración inicial de 1 bacteria/ml. La invasión sistémica de las células epidérmicas de las hojas fue muy evidente (Fig. 22). Las bacterias en las figuras anteriores son indicadas por puntos negros.

Las Figuras 23, 24 y 25 muestran el análisis en plantas de colza inoculadas de manera similar con *Acetobacter diazotrophicus* UAP5541/pRGH562 (*NifH-GUSA*). La invasión intracelular de células vivas, la colonización sistémica de la planta y la coloración de *Acetobacter diazotrophicus* UAP5541/pRGH562 (*NifH-GUSA*) fueron comparables con lo observado en el tomate, trébol y trigo inoculados de manera similar.

Las Figuras 26 y 27 muestran el análisis del arroz cereal (*Oryza sativa*) inoculado de manera similar con *Acetobacter diazotrophicus* UAP5541/pRGH562 (*NifH-GUSA*). La invasión intracelular de células vivas, la colonización sistémica de la planta y la coloración de *Acetobacter diazotrophicus* UAP5541/pRGH562 (*NifH-GUSA*) fueron comparables a lo observado en las plantas de tomate, trébol, trigo y colza inoculadas de manera similar.

5

Las Figuras 28 y 29 muestran el análisis de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* inoculada con *Acetobacter diazotrophicus* UAP5541/pRGH562 (*NifH-GUSA*) de acuerdo con la presente invención. La invasión intracelular de la célula viva, la colonización sistémica de la planta y la coloración de *Acetobacter diazotrophicus* UAP5541/pRGH562 (*NifH-GUSA*) fueron comparables con lo observado en las plantas de tomate, trébol, trigo, colza y arroz cereal inoculados de manera similar.

10

Método usado para manchar con Rojo Neutral

15

El Rojo Neutral (Índice Merck No. 6571) es un color biológico que no es tóxico. Las células de la planta aún son viables después de coloreadas con 0.01% P/V de Rojo Neutral en agua. Plantas inoculadas con *Acetobacter diazotrophicus* de acuerdo con la presente invención fueron colocadas en una solución de rojo neutral (0.9% P/V en agua) durante 30 minutos. Luego las plantas fueron lavadas y preparadas para observación microscópica.

20

Las Figuras 30, 31A y 31B muestran el análisis de *Acetobacter diazotrophicus* en células vivas de trébol. Este análisis fue realizado para garantizar que las bacterias de *Acetobacter diazotrophicus* inoculadas al trébol de acuerdo con la presente invención estaban realmente presentes intracelularmente en las células vivas. Para este propósito fue utilizado rojo neutral. A pH bajo (un pH menor de 7.0) los compartimientos celulares que son ácidos se colorearon de rojo. A pH más alto (un pH sobre 7.0) el rojo neutral es presentado como una mancha amarilla. Las Figuras 30 y 31A muestran colonias (puntos negros) de *Acetobacter diazotrophicus* dentro de una vacuola de una célula viva de la corteza de la raíz de trébol inoculada de acuerdo con la presente invención. La Figura 31B muestra otra región de la corteza de la raíz de trébol con *Acetobacter diazotrophicus* (puntos negros) presente en la vacuola de una célula viva.

25

30

La *Acetobacter diazotrophicus* está presente en células vivas como colonias poliédricas. Estas estructuras poliédricas son causadas por la secreción de un polímero de β -D-fructosa llamado Levana. Cristales de Levana aislados a partir de *Erwinia herbicola* (sigma cat. No. L8647) semejan bien la forma de colonias de *Acetobacter diazotrophicus* encontradas en las plantas inoculadas de acuerdo con la presente invención (Figura 32).

35

Trigo (*Triticum aestivum*) y trébol (*Trifolium repens*), inoculado con *Acetobacter diazotrophicus* UAP5541/pRGH562 (*NifH-GUSA*) de acuerdo con la presente invención, fueron transferidos después de dos semanas de inoculación en jarras (75 ml de capacidad conteniendo 50 ml de medio de Murashige y Skoog, 0.8% P/V de agar y 3% P/V de sacarosa), a (semilla y esqueje) abono en potes durante cuatro semanas. Las plantas en potes fueron incubadas en condiciones de cuarto de crecimiento limpio (temperatura durante el día de 25°C, temperatura durante la noche de 16°C, período de exposición a la luz de 250 $\mu\text{m E M}^{-2}\text{S}^{-1}$ a de tubos fluorescentes "Daylight", 0600-2200) y regadas con agua estéril. Fue probada la actividad de nitrogenasa de las plantas usando la prueba de reducción de acetileno. Controles no inoculados también fueron transferidos de manera similar de las jarras al abono y probados en cuanto a la actividad de nitrogenasa usando la prueba de reducción de acetileno.

40

45

Prueba de reducción de acetileno

Nitrogenasa, la enzima responsable de la reducción del nitrógeno gaseoso ($\text{N} \equiv \text{N}$) a amoníaco (NH_3) (fijación de nitrógeno), fue probada por cromatografía de gas. En esta prueba, las plantas son incubadas con exceso de gas acetileno ($\text{H}-\text{C} \equiv \text{CH}$) que es reducido por la nitrogenasa que actúa en el enlace triple del acetileno para producir etileno ($\text{H}_2-\text{C} = \text{C}-\text{H}_2$). Las plantas fueron enjuagadas en agua estéril y transferidas a tubos Pyrex de 75 ml los cuales fueron tapados después con gas comprimido SubasealsTM. 10% del volumen de aire fue retirado usando una jeringuilla hipodérmica, y substituido por acetileno. Las muestras fueron regresadas al cuarto de crecimiento e incubadas durante 24 horas en las mismas condiciones usadas para el crecimiento de las plantas inoculadas con *A. diazotrophicus* (25°C, temperatura durante el día, 16°C, temperatura durante la noche, período de exposición a la luz de 250 $\mu\text{m Em}^{-2}\text{S}^{-1}$ de tubos fluorescentes "Daylight", 0600-2200). Muestras de los gases (0.5 ml) fueron retiradas en jeringuillas y analizadas en cuanto a la producción de etileno con una cromatografía de gas Pye Unicam PU 4500 con columna de cristal de 183 cm (diámetro interno de 2.0 mm) conteniendo "Propack N" con un tamaño de malla de 80-100. El portador de la fase móvil fue N_2 con una tasa de flujo de 27 ml minuto^{-1} . El horno que contenía la columna fue ajustado a 60°C y el detector de llama ajustado a 121°C. El instrumento fue calibrado (altura máxima: etileno (número de nanomoles) por 0.5 ml de muestra) usando una curva estándar.

55

60

65

ES 2 309 191 T3

TRIGO (nanomoles de etileno por 24 horas)

<u>Inoculado</u>	No inoculado (control)
31*	7
12*	6
6	7
6	7
15*	6

* Actividad de Nitrogenasa de la planta de trigo individual (-control) 24, 6 y 9 nanomoles de etileno respectivamente

TRÉBOL (nanomoles de etileno por 24 horas)

Inoculado	No inoculado (control)
4	6
6	7
5	5
3	3
5	6
15 *	3

* Actividad de Nitrogenasa de la planta de trébol individual (-control): 12, nanomoles de etileno.

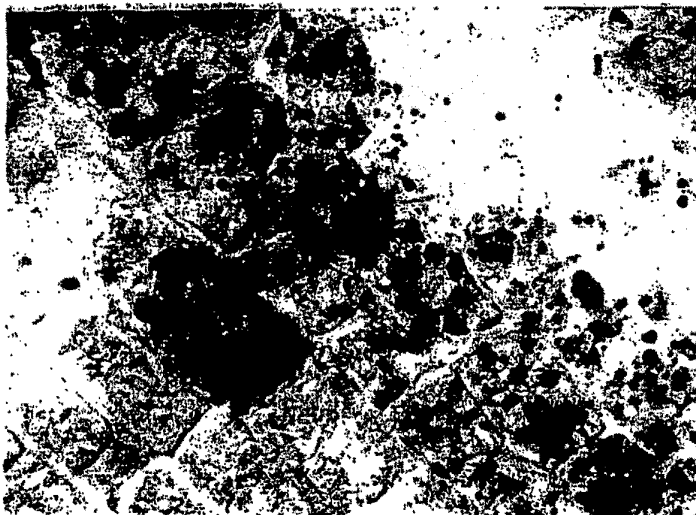
Cuando el trébol fue inoculado con *Rhizobium leguminosarum* biovariante *Trifolii* (RCR5), en estas condiciones de cultivo, fueron producidas plantas noduladas y éstas tenían una actividad media de nitrogenasa por planta de trébol de 60 nanomoles de etileno por 24 horas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una planta no leguminosa o leguminosa que contiene bacterias que fijan el nitrógeno, *Acetobacter diazotrophicus* (sin. *Gluconacetobacter diazotrophicus*), dichas bacterias estando localizadas intracelularmente en las células vivas de la planta y proporcionando nitrógeno fijado a dicha planta.
- 10 2. Una planta de acuerdo con la reivindicación 1 obtenible mediante un método de inoculación de dicha planta con entre 1 y 100 de dichas bacterias por mililitro de inóculo.
- 15 3. Una planta de acuerdo con la reivindicación 1 obtenible mediante un método para la inoculación de dicha planta con entre 1 y 10 de dichas bacterias por mililitro de inóculo.
- 20 4. Una planta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en la cual las bacterias que fijan el nitrógeno están presentes en vesículas y vacuolas unidas a la membrana dentro del citoplasma de una célula de la planta.
- 25 5. Una planta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en la cual las bacterias se propagan de una célula de la planta a otra célula de la planta mediante división de las células de la planta en el meristemo y divisiones subsiguientes de las mismas.
- 30 6. Una planta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en la cual las bacterias se convierten en sistémicas moviéndose a través de la xilema.
- 35 7. Una planta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en la cual las bacterias se convierten en sistémicas mediante divisiones de las células de la planta y divisiones subsiguientes de las mismas.
- 40 8. Un método de inoculación de una planta no leguminosa o leguminosa con bacterias que fijan el nitrógeno, *Acetobacter diazotrophicus* (sin. *Gluconacetobacter diazotrophicus*) localizadas intracelularmente en las células vivas de la planta y proporcionando el nitrógeno fijado a dicha planta, que comprende la inoculación de dicha planta con entre 1 y 100 de dichas bacterias por mililitro de inóculo cuando ocurre la germinación de dicha planta o hasta siete días después de la misma.
- 45 9. Un método acuerdo con la reivindicación 8 en el cual la planta no leguminosa o leguminosa es inoculada con 1-10 bacterias por mililitro de inóculo.
- 50 10. Un método para la producción de una planta leguminosa o no leguminosa de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual dichas bacterias son introducidas por inoculación de entre 1 y 100 bacterias por mililitro de inóculo cuando ocurre la germinación de dicha planta o hasta siete días después de la misma, y en el cual dichas bacterias se convierten en sistémicas mediante división de las células de la planta y divisiones subsiguientes de las mismas.
- 55
- 60
- 65



1A



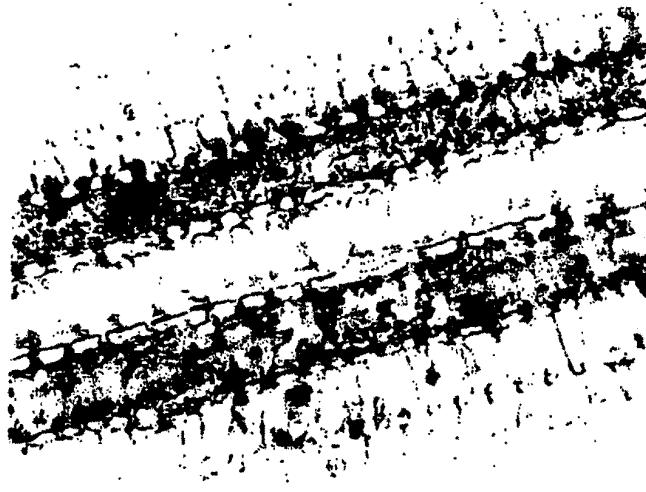
1B



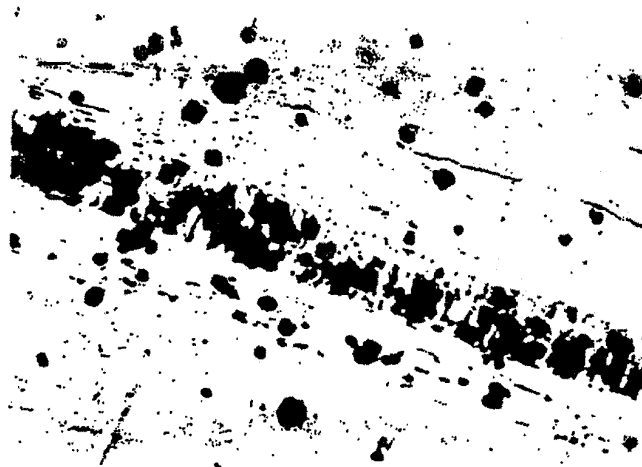
1C



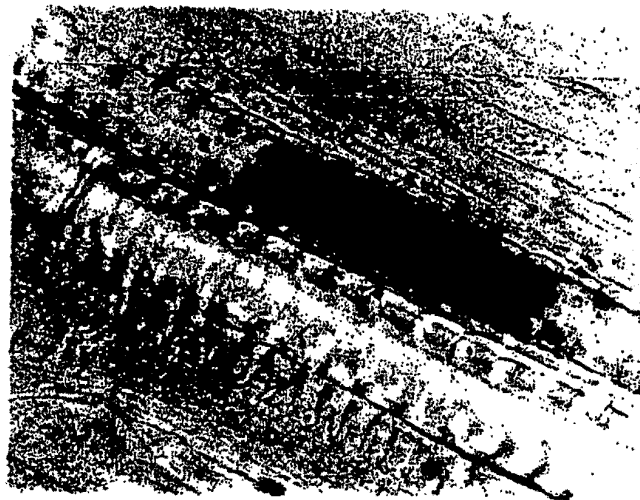
1D



2A



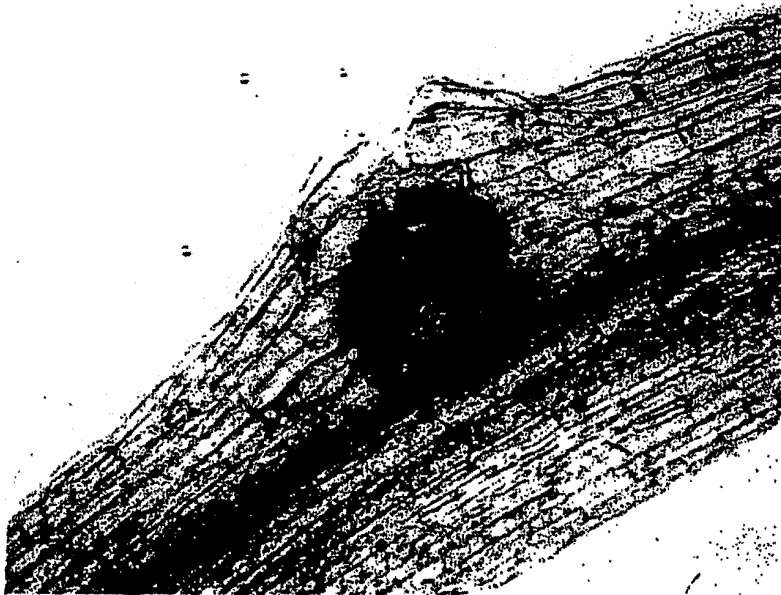
2B



2C

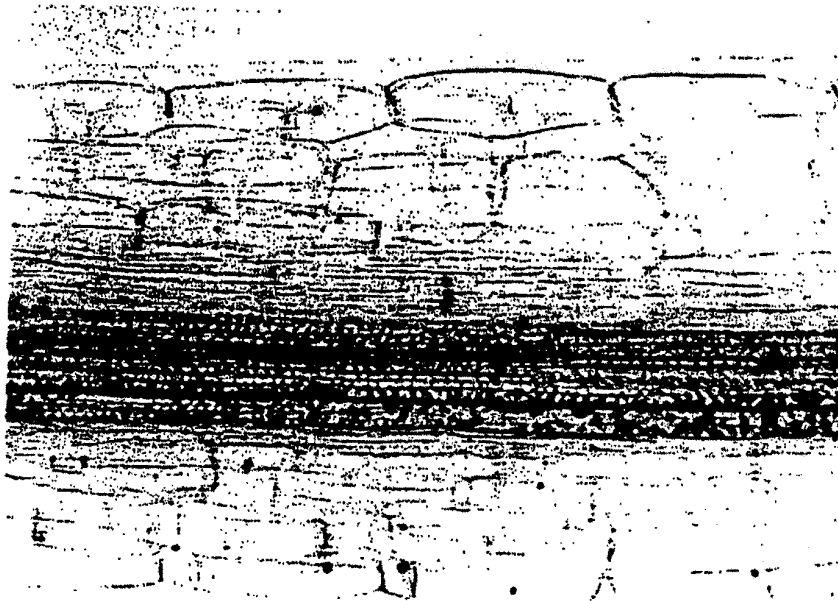


3A

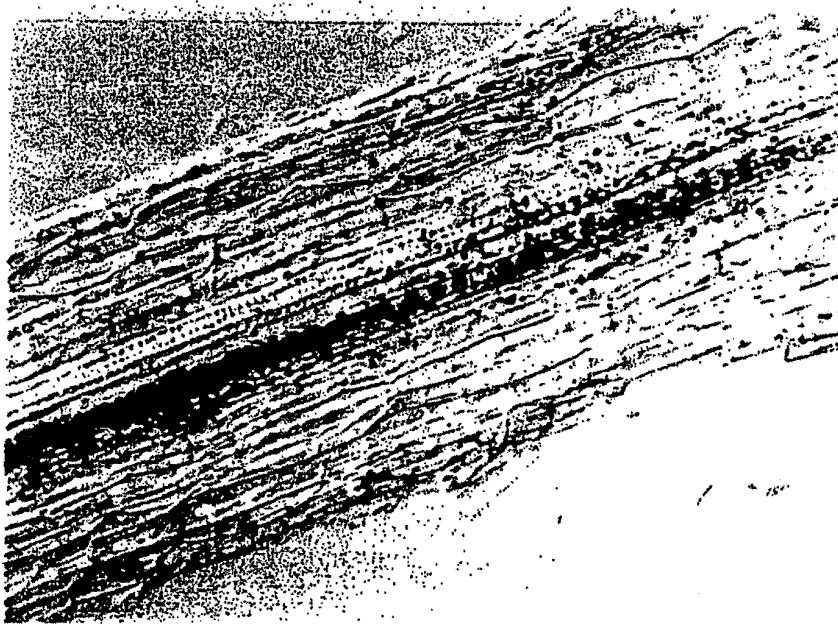


3B





4A

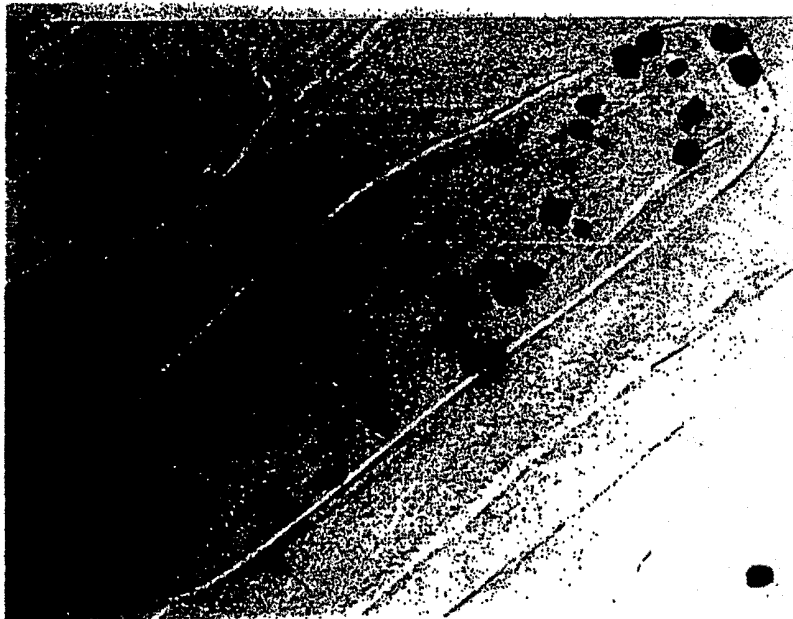


4B



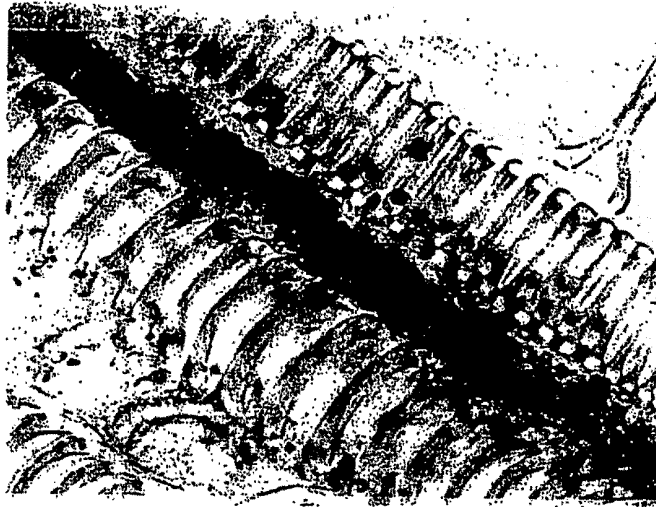
4C

—

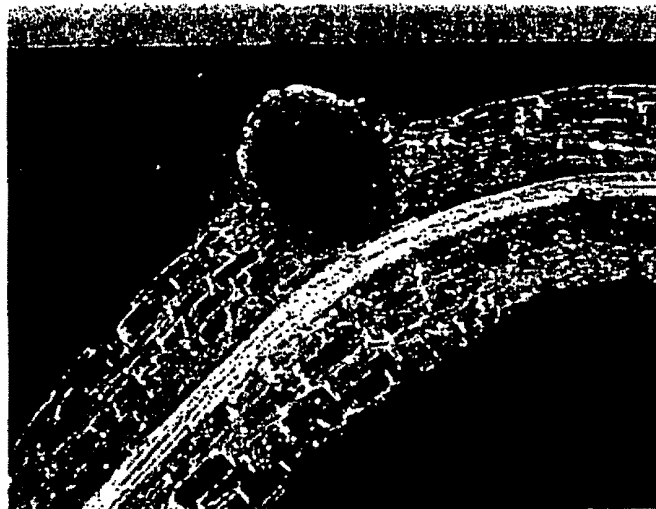


4D

—



6



7



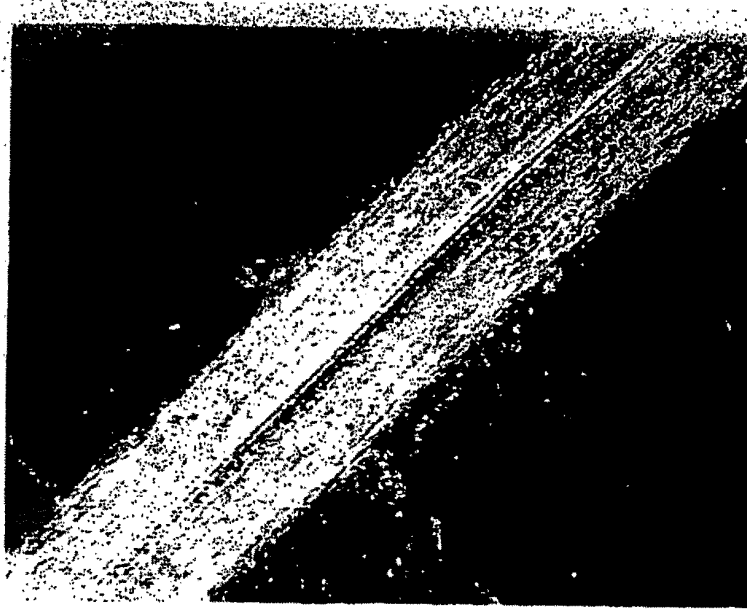
8A



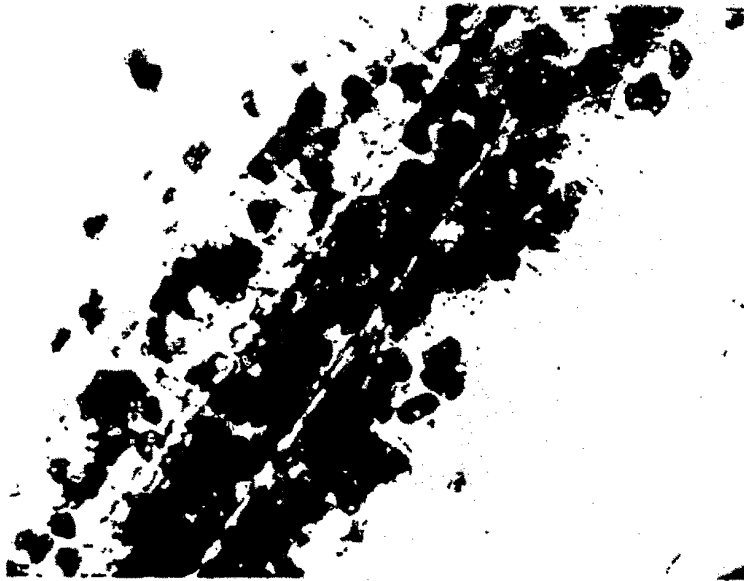
8B



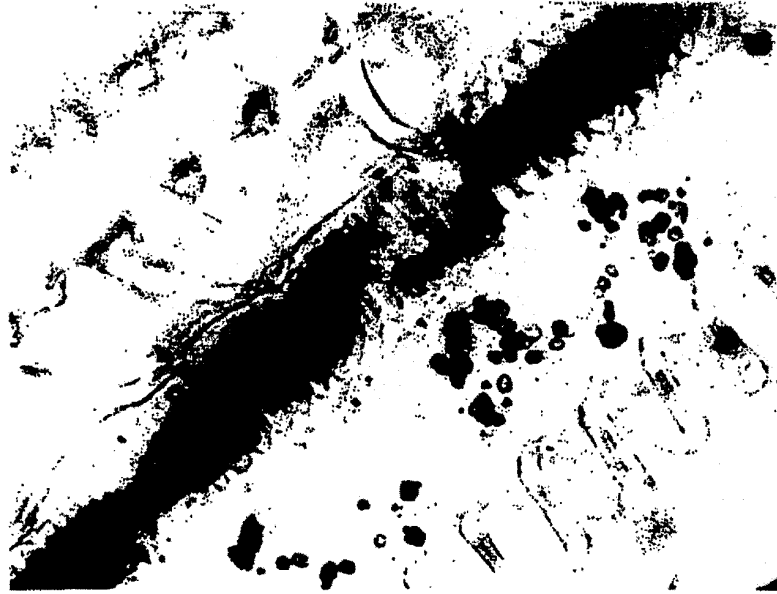
9



10



11



12

—



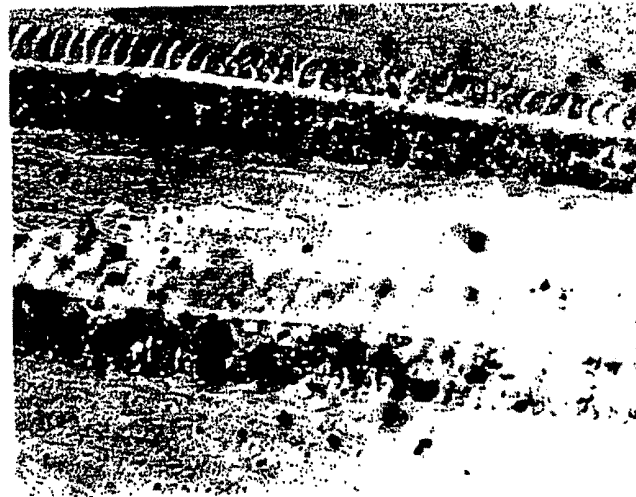
13

—



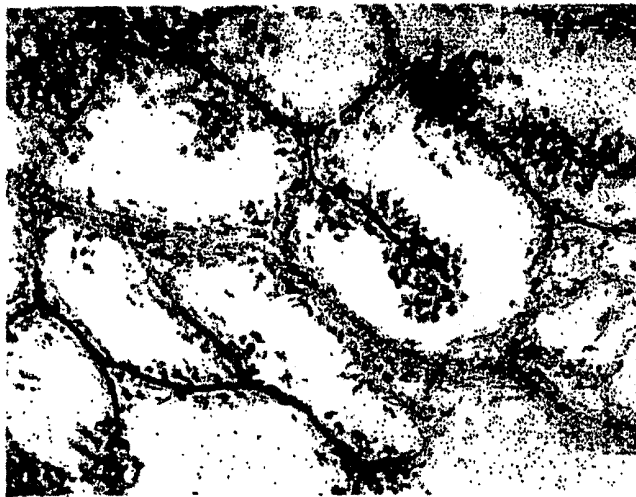
14

—



15

—



16

—



17

—



18

—



19

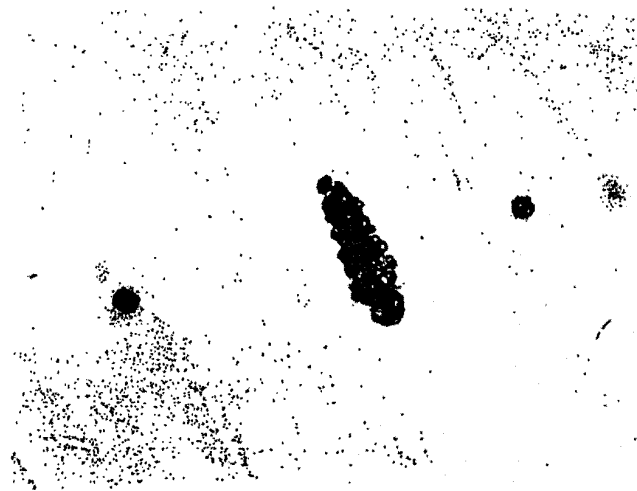
—



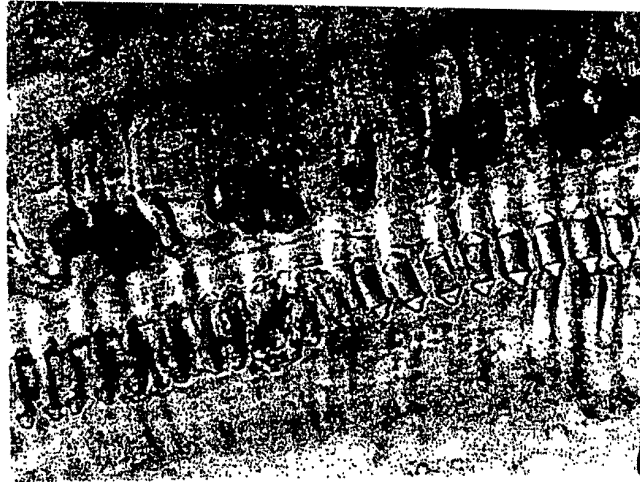
20 -



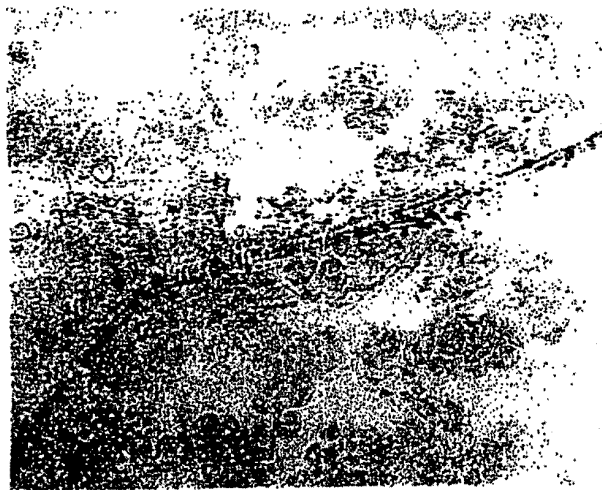
21 -



22 -



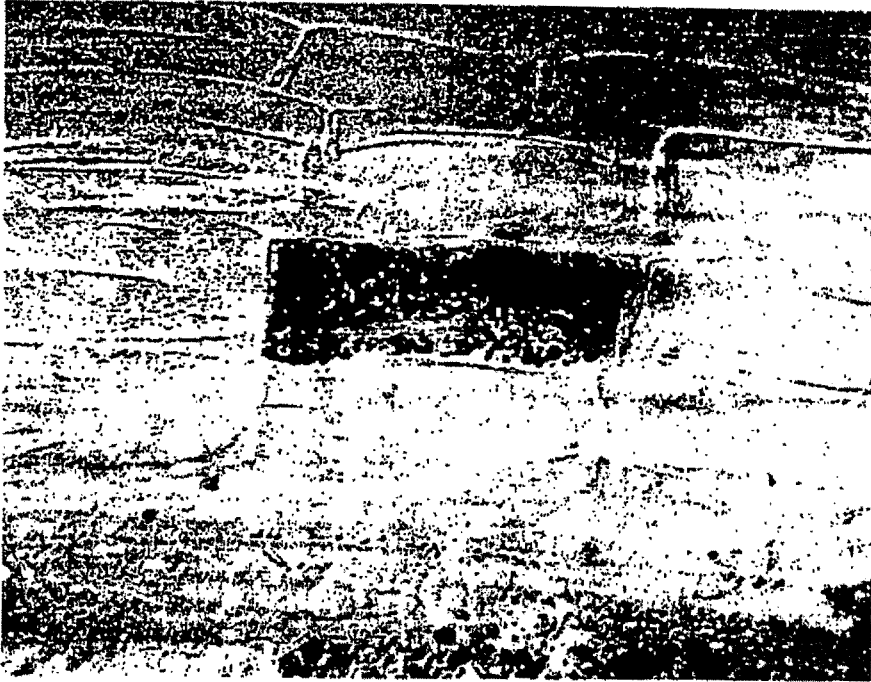
23 —



24 —



25 —



26



27



28

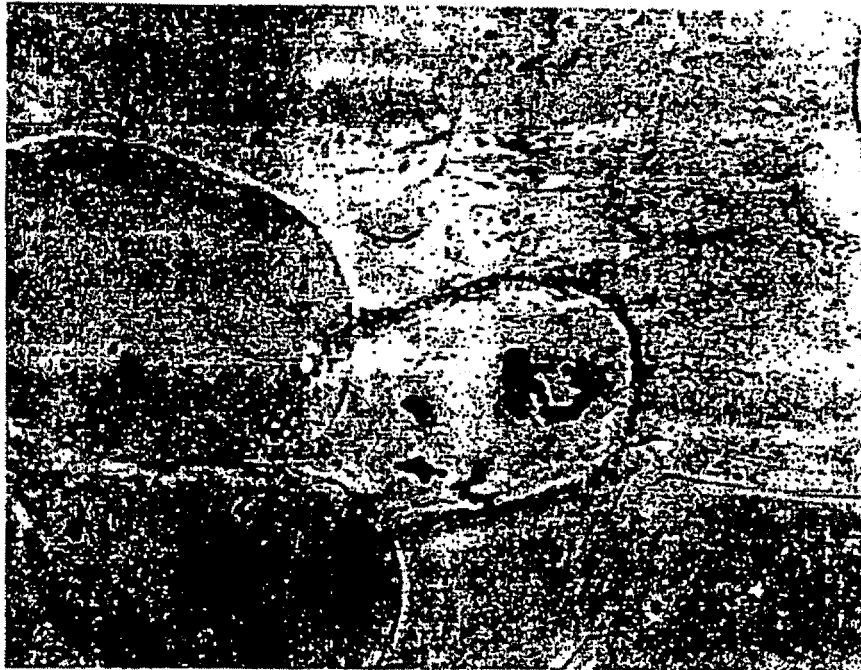


29

ES 2 309 191 T3



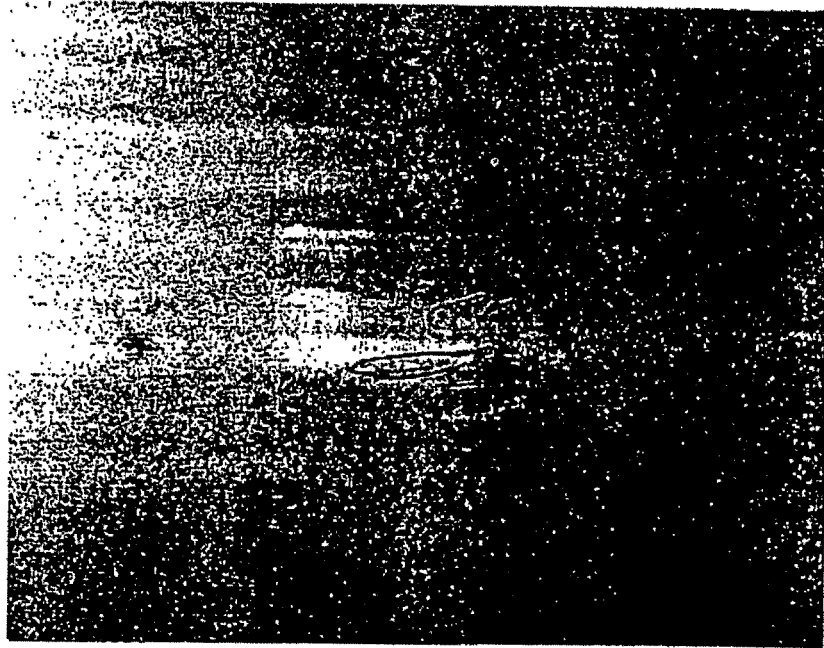
30



31A



31 B



32