

# Fijación biológica de nitrógeno

Biological Nitrogen Fixation

**Juliana Mayz-Figueroa**

Universidad de Oriente, Núcleo de Monagas, Laboratorio de Rizobiología, *Campus* Juanico, Maturín, Estado Monagas. Email: julianamayz@cantv.net.

## RESUMEN

Esta revisión es acerca de los organismos fijadores de nitrógeno, viviendo libres o en asociación con plantas terrestres. Se discute su hábitat, morfología y los aspectos fisiológicos; se incluyen, la ubicación de las estructuras involucradas en la Fijación Biológica de Nitrógeno, los mecanismos de protección de la nitrogenasa, las vías metabólicas de incorporación del nitrógeno fijado y los compuestos nitrogenados transportados vía xilema o floema. Además, se citan géneros y especies de organismos o sistemas fijadores que se localizan en el territorio de Venezuela, indicando el colector y el herbario de referencia.

**Palabras Clave:** Fijación Biológica de Nitrógeno, Microorganismos de vida libre, Asociaciones, Nitrogenasa.

## ABSTRACT

This review is about nitrogen-fixing organisms, free-living or living in association with terrestrial plants. Their habitat, morphology and physiological aspects are discussed; location of the involved structures in the Biological Nitrogen Fixation, mechanisms of nitrogenase protection, metabolic routes of fixed nitrogen incorporation and nitrogen compounds transported via xylem or phloem are included. In addition, genus and species of organisms or fixing-systems located in the states of Venezuela countryside are mentioned, jointly with the collector and the reference herbarium.

**Key Words:** Biological Nitrogen Fixation, Free-living microorganisms, Associations, Nitrogenase.

## INTRODUCCIÓN

El Nitrógeno (N) es un elemento necesario en la composición de proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares, siendo así una molécula esencial para el crecimiento de todos los organismos. En la atmósfera el N ocupa aproximadamente el 80%, existiendo en la forma  $N\equiv N$ ; sin embargo, el  $N_2$ , debido al triple enlace entre los dos átomos de nitrógeno, que hace a la molécula casi inerte, no puede ser aprovechado por la mayoría de las formas vivientes, sino sólo por un pequeño grupo de microorganismos altamente especializados, que incluyen algas, bacterias y actinomicetes. Para ser utilizado en el crecimiento, este debe ser primero reducido y luego “fijado” (combinado) en la forma de iones amonio ( $NH_4^+$ ) o nitrato ( $NO_3^-$ ). El proceso a través del cual esos microorganismos reducen el nitrógeno hasta una forma utilizable es conocido como Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN por sus siglas en español). El proceso puede ser llevado a cabo por los microorganismos en vida libre o en simbiosis con plantas, y el mismo no sólo permite usar el nitrógeno atmosférico sino también revertir o

reducir la degradación del suelo (Allan y Graham, 2002; Parsons, 2004).

La FBN es mediada por el complejo nitrogenasa, presente en los organismos fijadores, el cual cataliza la conversión del  $N_2$  a  $NH_4^+$  bajo la reacción general:  $N_2 + 10H^+ + 8e^- + nMgATP \rightarrow 2NH_4^+ + H_2 + nMgADP + nPi$  ( $n \geq 16$ ). Esta requiere de grandes cantidades de poder reductor y energía (ATP), y la reducción obligada de protones con un mínimo de 1 mol of  $H_2$  producido por mol de  $N_2$  reducido (Halbleib y Luden, 2000). La actividad del complejo enzimático puede ser mermada por el oxígeno, de tal manera que los organismos fijadores poseen mecanismos (e.j. alta tasa respiratoria, compartimentalizaciones o protección conformacional) que les permiten mantener bajas concentraciones de éste a fin de mantener la enzima funcionando (Ureta y Nordlund, 2002; Lee *et al.*, 2004).

## Organismos involucrados en la FBN

Entre los microorganismos involucrados en la FBN se encuentran: bacterias, algas verde-azules

(cianobacterias) y actinomicetes, los cuales pueden fijar el nitrógeno viviendo libremente o formando asociaciones.

## Microorganismos de Vida Libre

### Bacterias

Las bacterias fijadoras de nitrógeno son componentes importantes del suelo y requieren una fuente de energía química si no son fotosintéticas, las cuales a su vez utilizan la energía de la luz solar.

Entre las bacterias de vida libre pueden encontrarse: anaeróbicas obligadas o facultativas (e.j. *Clostridium pasteurianum*, *Klebsiella* spp., *Desulfovibrio* sp.), aeróbicas obligadas (e.j. *Azotobacter* spp., *Beijerinckia* sp.) y fotosintéticas (bacterias púrpuras sulfurosas y no sulfurosas, y bacterias verdes sulfurosas) (Allan y Graham, 2002).

Las bacterias aeróbicas dependen fuertemente de las condiciones de humedad, oxígeno y materia orgánica, y las anaeróbicas son predominantes en suelos anegados donde existen las condiciones de humedad y materia orgánica, pero el suministro de oxígeno está restringido. La FBN en los suelos tropicales con las condiciones requeridas de humedad, temperatura y materia orgánica es generalmente alta. Se reporta que el número de bacterias fijadoras de nitrógeno es particularmente elevado en la zona adyacente a la raíz (rizósfera), debido a la liberación de compuestos orgánicos que le sirven como nutrimento (Dugan 2004).

Las bacterias aeróbicas emplean dos mecanismos de protección de la nitrogenasa: la protección respiratoria, donde se produce una elevada tasa respiratoria a expensas de un alto consumo de carbono y energía, manteniendo así una concentración intracelular de oxígeno baja; y la protección conformacional, en la cual la nitrogenasa cambia su disposición a una forma reversible inactiva (Robson y Postgate, 1980; Segura y Espín, 1998).

### Cianobacterias

Las Cianobacterias tienen una amplia distribución y ocupan un gran rango de hábitas al igual que las bacterias, que incluyen suelo y agua, tanto de regiones tropicales y templadas como de climas extremos (Herrero *et al.* 2001). Presentan una gran diversidad morfológica, desde unicelulares hasta

multicelulares filamentosas y con o sin la presencia de heterocistos. Stanier y Cohen-Bazire (1977), las describen como fotoautotróficas, fijadoras de CO<sub>2</sub> a través del Ciclo de Calvin y carentes de 2-oxoglutarato deshidrogenasa. En las cianobacterias, el amonio es incorporado en esqueletos carbonados (2-oxoglutarato) a través del ciclo de la glutamina sintetasa-glutamato sintasa para la biosíntesis de glutamato y compuestos nitrogenados derivados (Herrero *et al.*, 2001).

Los heterocistos (Figura 1) son células especializadas, distribuidas a lo largo o al final del filamento (cianobacterias multicelulares filamentosas), los cuales tienen conexiones intercelulares con las células vegetativas adyacentes, de tal manera que existe un continuo movimiento de los productos de la fijación de nitrógeno desde los heterocistos hacia las células vegetativas y de los productos fotosintéticos desde las células vegetativas hacia los heterocistos (Todar, 2004).

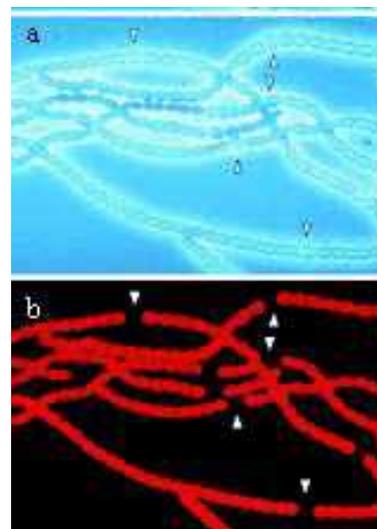


Figura 1.a. Imagen de contraste de fase de filamentos de *Nostoc punctiforme*, mostrando heterocistos (flechas).

b. Imagen epifluorescente de los filamentos mostrados en la Figura a. (Meeks y Elhai, 2002).

Debido a la sensibilidad de la enzima nitrogenasa al oxígeno, las cianobacterias tienen como mecanismos de protección, la separación en espacio o en tiempo de los mecanismos fotosintéticos y de fijación de nitrógeno. Algunas algas filamentosas como *Nostoc* y *Anabaena*, tienen la nitrogenasa confinada a los heterocistos, los cuales carecen del

fotosistema II liberador de oxígeno y rodeados de una pared glicolipídica gruesa que reduce la difusión de éste hacia las células, cualquier oxígeno que difunde hacia los heterocistos es rápidamente reducido por hidrógeno; así, la fijación de nitrógeno está espacialmente y metabólicamente separada del proceso fotosintético; las algas unicelulares (e.j. *Gloeocapsa*) y las filamentosas sin heterocistos (e.j. *Trichodesmium*), presentan los dos procesos separados en tiempo; de tal manera que la nitrogenasa sólo ocurre en el período de oscuridad. Sin embargo, algunas cianobacterias como mantienen la fijación de nitrógeno durante el período de luz, a expensas de una elevada tasa respiratoria, mecanismo similar al presentado por las bacterias aeróbicas (Capone *et al.*, 1997; Herrero *et al.*, 2001; Omoregie *et al.*, 2004; Todar, 2004).

### Actinomicetes

Los actinomicetes son bacterias filamentosas Gram positivas, comunes en el suelo, especialmente en suelos de elevado pH y poca humedad. Se les considera como organismos intermedios entre los hongos y las bacterias, formadores de micelios (Lechevalier y Lechevalier, 1979; Huss, 1990).

*Frankia* es un género del grupo de los actinomicetes, cuya especie *F. alni*, se ha reportado como fijadora de nitrógeno tanto en vida libre como en asociación con algunas angiospermas (no leguminosas). Las especies de *Frankia* son de crecimiento lento en cultivo y requieren de medios especializados para su crecimiento, presentan hifas ramificadas y septadas con vesículas y esporangios. Los esporangios multiloculares e irregulares en forma se localizan terminal, lateralmente o intercaladamente en las hifas, cuyas esporas no resistentes al calor sirven probablemente como agentes de propagación. La actividad de la nitrogenasa ha sido asociada con las vesículas, las cuales pueden formarse lateral o terminalmente en las hifas y bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno. Cada vesícula está rodeada por una multicapa lipídica que probablemente funciona como una barrera para la difusión de oxígeno. Estudios estructurales en cultivo han mostrado que el grosor de la capa lipídica aumenta en respuesta a un incremento de la concentración de oxígeno, a fin de evitar la inactivación de la nitrogenasa (Silvester *et al.*, 1990; Nalin *et al.*, 2000; Todar, 2004).

## Asociaciones

### Asociaciones no simbióticas

#### Bacterias-Filósfera

Varias bacterias fijadoras de nitrógeno pueden colonizar la filósfera, término usado por algunos investigadores para referirse a la superficie adaxial y abaxial de la hoja, y por otros a la hoja completa, incluyendo el ambiente interno. Se ha observado que las bacterias más abundantes en las hojas son las pigmentadas (e. j. *Methylobacterium mesophilicum*, *Pseudomonas syringae*), a las cuales se les ha atribuido una mejor adaptación a los rayos solares (Sundin y Jacobs, 1999; Hirano y Upper, 2000). Las especies de *Beijerinckia* y *Azotobacter* son comúnmente encontradas en cultivos; y se ha reportado su efecto benéfico en el crecimiento de las plantas (Ching-Hong, 2001; Lindow y Brandl, 2003). Sin embargo, no está clara la forma en que las plantas se benefician y posiblemente se ha atribuido el beneficio a la absorción radical de compuestos nitrogenados, los cuales una vez excretados por las bacterias en las hojas, llegan a la raíz por lavado.

#### Bacterias-Rizósfera

Hiltner en 1904 observó por primera vez la acumulación de microorganismos en la zona radical y propuso el término “rizósfera”. Los exudados radicales, conformados por sustancias diversas crean alrededor de las raíces (rizósfera) un ambiente nutricional enriquecido que favorece el crecimiento bacteriano. Smith (1976) y Martin y Kemp (1980) reportan la presencia de carbohidratos y aminoácidos, y señalan que la composición y cantidad de exudados varía con la especie presente y las condiciones abióticas, tales como agua y temperatura.

La relación que se establece entre las bacterias y las plantas puede ser favorable, perjudicial o neutra. Dentro de las relaciones favorables se encuentra la asociación con bacterias fijadoras de nitrógeno; entre estas, especies de *Azospirillum*<sup>1</sup>, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y *Burkholderia* (Estrada *et al.*, 2001). Las bacterias

<sup>1</sup> Identificado en suelos de la Gran Sabana por Andrade y Cuenca (1998).

fijadoras de nitrógeno pueden ser categorizadas dentro del grupo de las rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPR, por sus siglas en inglés), al ejercen un efecto benéfico sobre el crecimiento de las plantas. La primera especie aislada fue *Azospirillum lipoferum* (para entonces nombrada como *Spirillum lipoferum*) en Holanda en 1925 (Beijerinck, 1925) y de la cual en la actualidad se reconocen 7 especies: *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. halopraeferans*, *A. irakense*, *A. largimobile* y *A. doebereineriae* (Tarrand *et al.*, 1978; Magelhaes *et al.*, 1983; Reinhold *et al.*, 1987; Khammas *et al.*, 1989; Sly y Stackebrandt, 1999; Eckert *et al.*, 2001); desde entonces ha sido aislada de varias especies cultivadas y silvestres y de varios tipos de suelo.

Por muchos años se consideró que el efecto benéfico de las bacterias fijadoras de nitrógeno sólo provenía de la utilización por las plantas del amonio excretado; así existen numerosas publicaciones que prueban tal efecto (Mirza *et al.*, 2001; Becker *et al.*, 2002); sin embargo, se ha encontrado que esta bacterias también producen fitohormonas (auxinas, giberelinas y citocininas) que afectan favorablemente el desarrollo de las plantas, particularmente de la raíz (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003). Más recientemente se ha reportado que las bacterias fijadoras de nitrógeno incrementan la capacidad radical de absorción de nitrato, indirectamente como una consecuencia de la estimulación del desarrollo radical y directamente por estimulación del sistema transportador del compuesto (Mantelin y Touraine, 2004).

## Asociaciones simbióticas

### Rhizobia-Leguminosas

*Rhizobium* Frank 1889, el género tipo de la Familia *Rhizobiaceae* Conn 1998, está representado por bacterias de forma bacilar, Gram negativas, habitantes del suelo, que tienen la capacidad de formar nódulos en varias leguminosas y en *Parasponia* spp. (e. j. *P. andersonii*, *P. rigida*). Esta relación simbiótica es controlada genéticamente tanto por la planta como por la bacteria y ocurre a través de una secuencia de estados de desarrollo que culminan en el establecimiento de una simbiosis efectiva: el nódulo fijador de nitrógeno. El primer nombre dado a las bacterias de los nódulos de las raíces de las leguminosas fue *Phytomyxa*, el cual lo propuso Schroeter en 1886, considerando la relación de estas bacterias con los hongos mucosos. Sin embargo, en 1970, la Comisión Judicial del Comité Internacional

de Nomenclatura Bacteriana (Opinión 34) aprobó como nombre genérico *Rhizobium* Frank 1889 (nombre conservado) en vez de *Phytomyxa* Schroeter 1886 (nombre prioritario). Esto se hizo en base a que el nombre *Rhizobium*, tiene la ventaja de enfatizar la importancia agronómica de las bacterias de los nódulos de las raíces (*rhiza*: raíz, *bios*: vida, *Rhizobium*: vida en las raíces) y a su vez guarda tributo a la extensa literatura publicada con ese nombre (Mayz, 1997). Actualmente, además de *Rhizobium*, existen otros géneros de bacterias fijadoras de nitrógeno: *Ensifer* (Casida, 1982), *Bradyrhizobium* (Jordan 1982), *Azorhizobium* (Dreyfus *et al.*, 1988) y *Mesorhizobium* (Jarvis *et al.*, 1997). Weir (2004) hace una revisión exhaustiva de la taxonomía actual de los rizobia.

El enigma de las leguminosas fue aclarado cuando Hellriegel y Wilfarth en 1888 probaron la fijación de nitrógeno en plantas noduladas, esto fue seguido por el aislamiento de la primera bacteria de los nódulos por Beijerinck ese mismo año. En 1932, Fred y colaboradores publicaron una monografía que ha recorrido el mundo, donde revisaron y analizaron la información existente sobre la simbiosis; sus consideraciones tuvieron una profunda influencia en la práctica y teoría subsiguientes. Para las décadas posteriores y hasta la actualidad los avances tecnológicos han permitido estudios más detallados y por lo tanto un mejor conocimiento y entendimiento de la simbiosis leguminosas-rizobia.

Para que se establezca la relación simbiótica deben ocurrir las siguientes etapas: 1. multiplicación de las bacterias en la rizósfera, 2. colonización de la rizósfera, 3. adsorción de las bacterias a la raíz, 4. ensortijamiento de los pelos radicales, ocurre en las raíces cuando la infección es vía pelos radicales y en algunas donde acontece vía unión raíces laterales-raíz principal, 5. formación de los hilos o zonas intercelulares de infección, 6. crecimiento del hilo de infección hacia las células corticales o invasión directa de las mismas, y 7. diferenciación tisular y desarrollo del nódulo (Figura 2). Los cambios morfológicos y fisiológicos que ocurren a nivel de los puntos de desarrollo nodular van acompañados de señales moleculares inducidas por genes propios del proceso (genes Nod) (Mayz, 1997; Perret *et al.*, 2000; González y Marketon, 2003; Gage, 2004).

El tipo y estructura nodular es dependiente de la planta hospedera, así se tienen:

a. nódulos determinados, en los cuales la actividad meristemática cesa temprano en su formación y su aspecto final resulta del alargamiento de las células, este tipo de desarrollo origina nódulos esféricos o globosos (Figura 3A), que pueden organizarse alrededor de la raíz para formar los denominados nódulos en collar (Figura 3B) (Hirsch, 1992; Mayz, 1997).

b. nódulos indeterminados, los cuales presentan un meristema persistente, que puede producir nódulos ramificados o coraloides, puesto que constantemente se añaden nuevas células a la parte distal del nódulo; de tal manera que todos los estados de desarrollo están así representados, debido a que ocurre un gradiente de formación desde la parte distal, a la proximal en el punto de unión a la raíz. Este tipo de desarrollo da lugar a nódulos elongados o cilíndricos (Figura 3C) y ramificados o coraloides (Figura 3D) (Hirsch, 1992; Mayz, 1997). La utilización del nitrógeno atmosférico en la simbiosis, requiere de la

integración de las vías metabólicas de la fijación (bacteroides) y de la asimilación (planta hospedera) del nitrógeno. La bacteria emplea compuestos carbonados oxidables suplidos por la planta para su metabolismo y desarrollo y para la síntesis de ATP y del poder reductor usados en la reacción de fijación catalizada por la nitrogenasa, la cual genera el nitrógeno asimilable ( $\text{NH}_4^+$ ), que es metabolizado en las células nodulares a amidas o ureidos, que luego son exportados vía xilema al resto de la planta, donde son usados (Mayz, 1997).

El primer producto de la reacción de fijación es  $\text{NH}_3$  (amoníaco), pero este es rápidamente protonado, formándose  $\text{NH}_4^+$ , lo cual es favorecido por el pK (9,25) de la reacción, de tal manera que amonio es la especie predominante a los pHs fisiológicos y la que toma parte en las reacciones de asimilación (Sprent y Sprent, 1990).

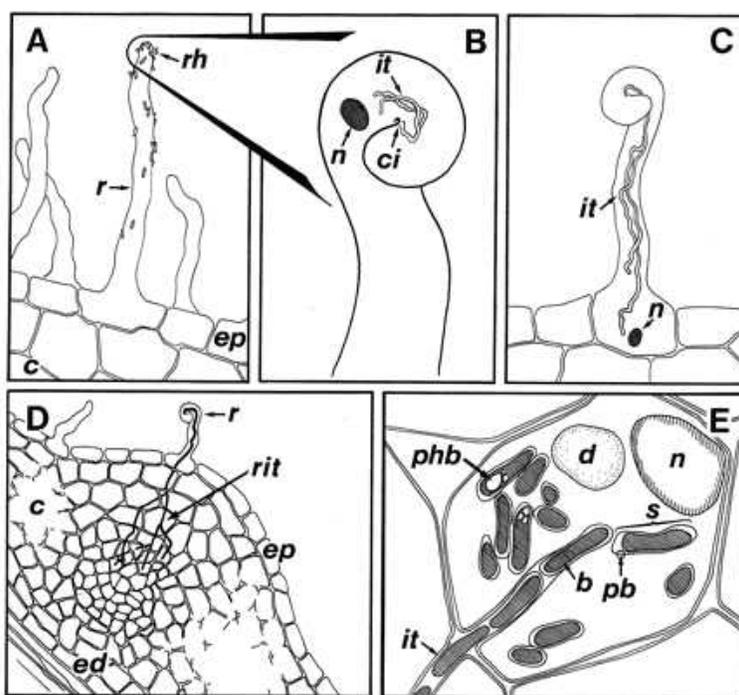


Figura 2. Invasión de pelos radicales por *Rhizobium* sp. (A) rizobia (*rh*) coloniza la rizósfera y se adhiere al pelo radical (*r*). (B) “Factores Nod” inducen el ensortijamiento del pelo radical y permiten la penetración bacteriana al centro de infección (*ci*). El núcleo del pelo radical (*n*) precede el crecimiento del hilo de infección (*it*). (C) El hilo de infección alcanza la base del pelo radical (*it*), aún acompañado del núcleo (*n*) (D) El pelo radical (*r*) se ramifica (*rit*) cerca del primordio nodular formado por las células corticales en división. (E) Los bacteroides (*b*) son liberados desde el hilo de infección (*it*) y forman simbiosomas (*s*) donde se acumulan gránulos de poly-β-hidroxibutarato (*phb*) rodeados por la membrana peribacteroidal (*pb*). Otras abreviaturas: *c*, corteza; *d*, vacuola digestiva; *ep*, epidermis; *ed*, endodermis (Perret *et al.*, 2000).

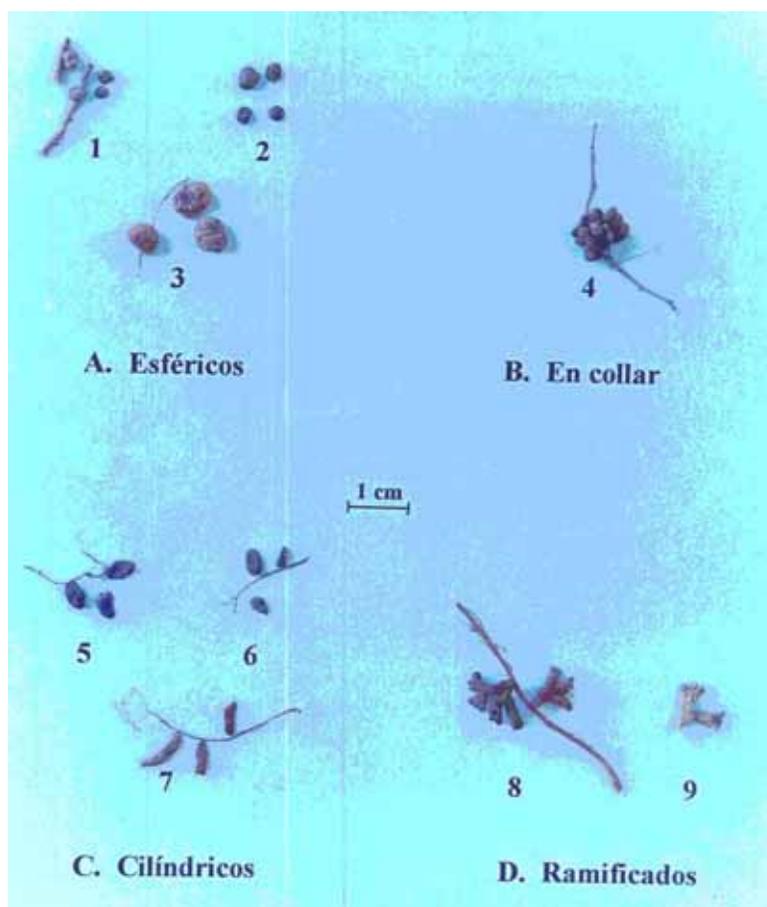


Figura 3. Formas nodulares presentes en algunas especies de leguminosas. 1. *Vigna unguiculata*, 2. *Desmodium canum*, 3. *Centrosema brasilianum*, 4. *Cannavalia ensiformis*, 5. *Indigofera hirsuta*, 6. *Cajanus cajan*, 7-8. *Crotalaria retusa*, 9. *Gliricidia sepium* (Mayz, 1997).

El amonio es un inhibidor de la síntesis de nitrogenasa, por lo que es imperativa su rápida asimilación; en el citosol de las células infectadas, éste es asimilado en ácido glutámico, en cuya reacción interviene la enzima octamérica ATP dependiente glutamina sintetasa o GS, y donde se forma glutamina, la cual puede ser exportada o usada para restaurar el ácido glutámico, a través de una reacción con el ácido 2-oxoglutarico (proveniente del ciclo de los ácidos tricarboxílicos) catalizada por la enzima monomérica NADH dependiente glutamato sintasa, también denominada glutamina-2-oxoglutarato aminotransferasa o GOGAT (Sprent y Sprent, 1990; Ortega *et al.*, 2004).

Las leguminosas simbióticas pueden ser separadas en dos grupos de acuerdo a los productos exportados desde los nódulos: las exportadoras de amidas (asparagina, glutamina) (Figura 4) y las exportadoras de ureidos (alantoína y ácido alantoico)

(Figura 5). El primer grupo incluye varias especies de regiones templadas, entre estas *Lupinus subcarneus*, *Pisum sativum* y *Medicago sativa* y el segundo varias especies tropicales, tales como *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris* y *Vigna unguiculata* (Scott *et al.*, 1976; Miflin y Habash, 2002; Harrison *et al.*, 2003).

#### **Cianobacterias-Hongos (Líquenes), Briofitas, Helechos, Angiospermas, Gimnospermas**

Las cianobacterias se asocian simbióticamente con representantes de las cuatro principales divisiones filogenéticas de las plantas terrestres: briofitas (musgos, hepáticas y antocerotas), helechos, gimnospermas y angiospermas; además, se asocian con hongos para formar los líquenes y con organismos marinos (Meeks y Elhai, 2002). Esta revisión se centra en las asociaciones de cianobacterias con plantas terrestres.

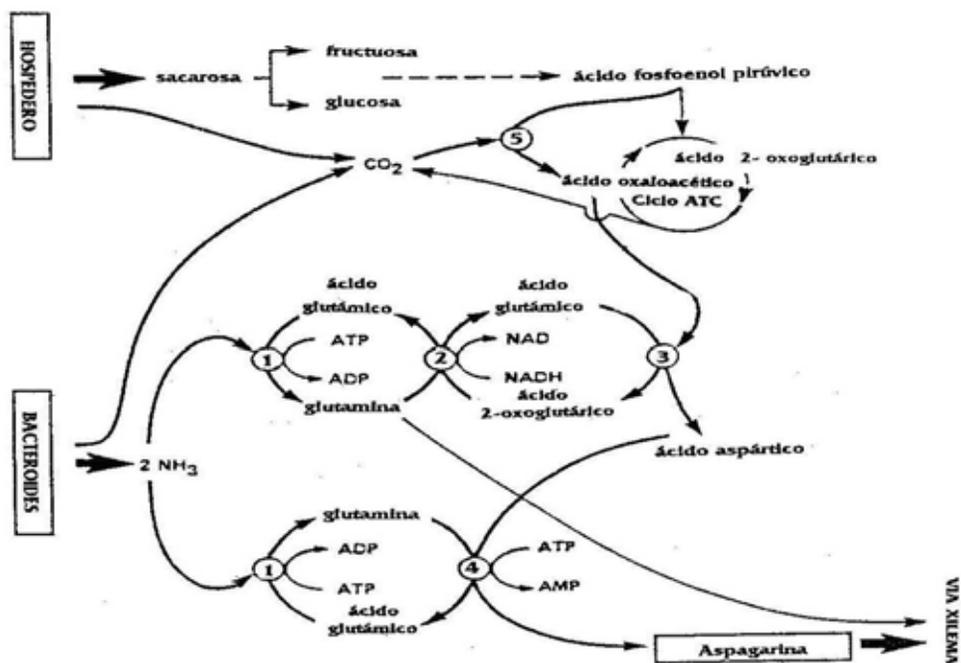


Figura 4. Síntesis de asparagina en nódulos de *Lupinus* sp. 1. glutamina sintetasa, 2. glutamato sintasa, 3. aspartato aminotransferasa, 4. asparagina sintetasa, 5. fosfoenol piruvato carboxilasa (Scott *et al.*, 1976).

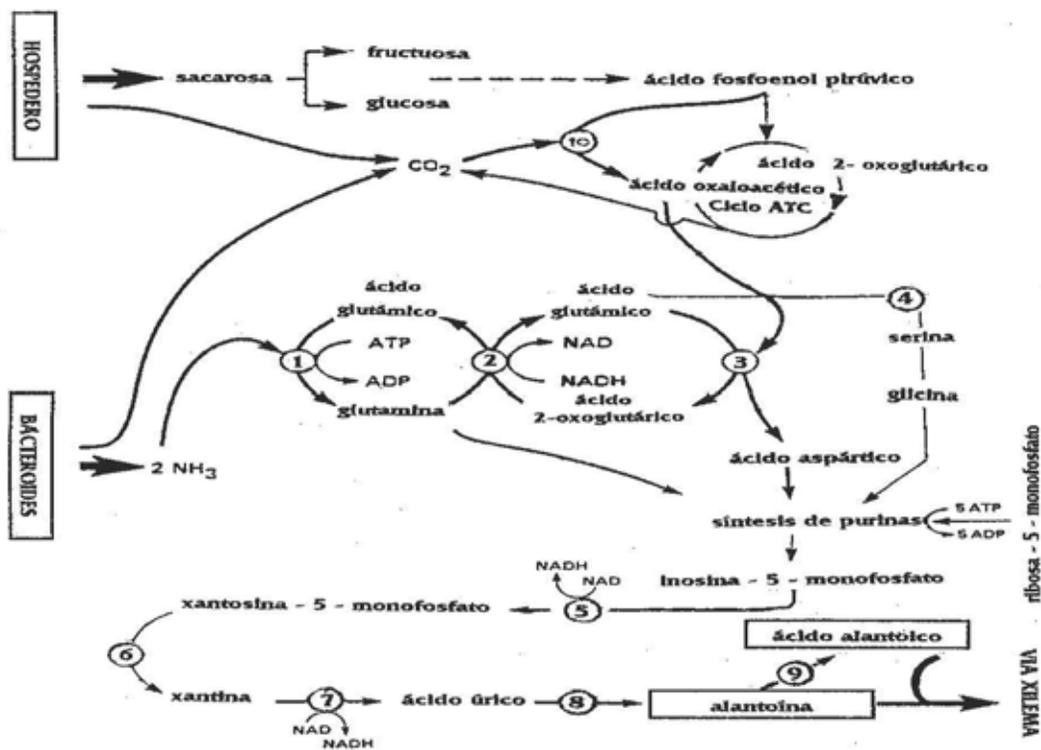


Figura 5. Síntesis de los ureidos alantoína y ácido alantoico. 1. glutamina sintetasa, 2. glutamato sintasa, 3. aspartato aminotransferasa, 4. aminotransferasa, 5. inosina monofosfato deshidrogenasa, 6. nucleosidasas, nucleotidasas, 7. xantina deshidrogenada, 8. urato oxidasa (uricasa), 9. alantoinasa, 10. fosfoenol piruvato carboxilasa (Mayz, 1997).

## Líquenes

Los líquenes son asociaciones simbióticas entre un hongo (micobionte) y una cianobacteria (fotobionte o cianobionte). La cianobacteria más frecuente en los líquenes es *Nostoc* (Meeks y Elhai, 2002; Oksanen *et al.*, 2004). Los líquenes viven en varias superficies: suelos, árboles, rocas y paredes, a menudo son los primeros en establecerse en el ambiente, constituyendo la única vegetación en ambientes extremos. Su aspecto es variable: de hojas (folioso, Figura 6), de costra (crustoso, Figura 7) o de arbusto (fruticoso, Figura 8) (Purvis, 2000).



Figura 6. *Parmotrema stuppeum* (Amstrong, 2004)<sup>2</sup>



Figura 7. *Caloplaca saxicola* (Silverside, 2002)<sup>3</sup>

La anatomía de los líquenes varía desde muy simple hasta compleja (Per, 2001; Brodo *et al.*, 2001):

<sup>2</sup> *Parmotrema stuppeum* (Taylor) Hale, colectada en el estado Mérida por López 353 (VEN).

<sup>3</sup> *Caloplaca saxicola* (Hoffm.) Nordin, colectada en el estado Mérida por López 464 (VEN) y Marcano *et al.* 197 (VEN).

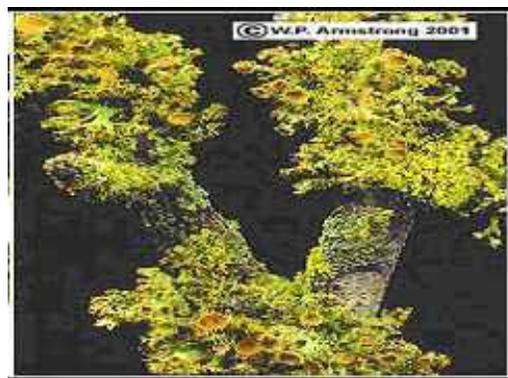


Figura 8. *Teloschistes chrysophthalmus* (Armstrong, 2001)<sup>4</sup>

a. El talo homómero presenta una estructura uniforme donde están distribuidas las células del alga, penetradas por las hifas del hongo (Figura 9).

b. El talo heterómero con una sola especie de alga (líquen bipartito), exhibe capas delimitadas e identificables: la corteza superior, la capa fotobióntica que contiene las células del alga, la médula, donde se alojan las hifas del hongo y la corteza inferior (Figura 10).

c. En el talo heterómero donde se presentan dos especies de algas (líquen tripartito), la cianobacteria está confinada a estructuras especiales o cefalopodios que pueden sobresalir en la superficie superior o inferior del líquen, o permanecer internamente, y el alga verde está localizada en la corteza superior (Figura 11).

En la asociación, la cianobacteria debe ser capaz de llenar los requerimientos bioquímicos y de desarrollo del hongo. La función del fotobionte en el talo es de proporcionar compuestos nitrogenados y carbohidratos (polioles y glucosa), donde alrededor del 80% o más de los productos fotosintéticos son liberados e inmediatamente absorbidos por el micobionte, mientras que el hongo le suministra protección, agua y minerales (Hill, 2001; Schofield *et al.*, 2003).

<sup>4</sup> *Teloschistes chrysophthalmus* (L.) Norm. Colectado en el estado Mérida por Vareschi 233 (VEN) y López 441 (VEN).

### Cianobacterias-Briofitas (musgos, hepáticas y antocerotas)

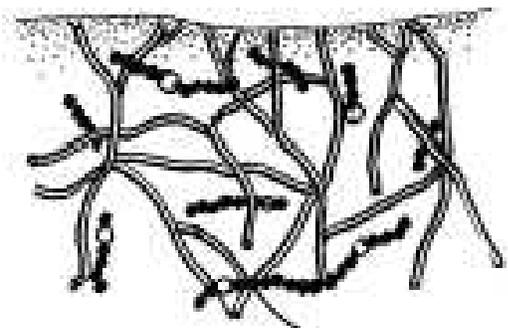


Figura 9. Talo Homómero (Per, 2001)

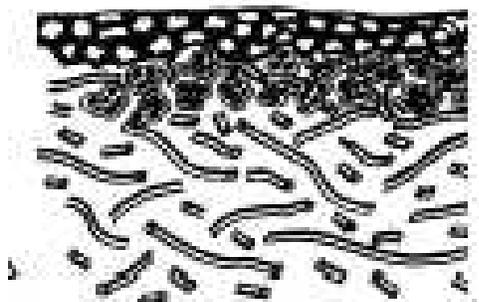


Figura 10. Talo heterómero (Per, 2001)

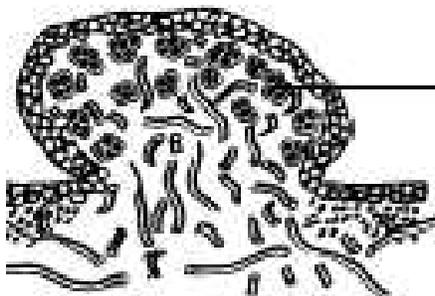


Figura 11. Talo heterómero con cefalopodios (Per, 2001)

Los musgos (e.j., *Sphagnum* spp.)<sup>5</sup>, hepáticas (e.j: *Marchantia* spp.)<sup>6</sup> y antocerotas (e.j *Anthoceros* spp., *Notothylas* spp. y *Phaeoceros* spp.) forman asociaciones simbióticas con especies de cianobacterias, siendo las especies de *Nostoc* las más frecuentemente encontradas (e.j. *N. elliposporum* y *N. punctiforme*) (Adams, 2000; Wong y Meeks, 2002).

Las colonias de la cianobacteria se alojan en cavidades especiales (domatias) localizadas en la parte ventral del gametofito (Figura 12), donde ocurre el intercambio de compuestos nitrogenados y carbohidratos (Vance *et al.*, 1998; Costa *et al.*, 2001). Los heterocistos proporcionan los productos nitrogenados a las células vegetativas de la planta, y en turno reciben los productos fotosintéticos. Se asume que existen mecanismos reguladores (probablemente genes) que controlan la diferenciación y el patrón de distribución de los heterocistos en las cianobacterias simbióticas, a fin de optimizar la fijación de nitrógeno y por ende la simbiosis (Yoon y Golden, 2001).

### Cianobacterias-helechos (*Azolla*)

*Azolla* (Figura 13) es un helecho acuático que forma una simbiosis permanente y hereditaria con la cianobacteria *Anabaena azollae*, cuya relación mutualística es la única conocida en la naturaleza entre una pteridofita y una procariota diazotrófica. Esta asociación fue descrita por primera vez por el científico alemán Eduard Strasburger en 1873. En

<sup>5</sup> *Sphagnum meridense* (Hampe) Müll. Hal. Bolívar: Steyermark y Wurdack 383 (MO); Trujillo: Griffin *et al.* 1129 (MO); *Sphagnum sparsum* Hampe Bolívar: Steyermark *et al.* 109321 (MO), Mérida: Griffin y López PV-922 (MO); *Sphagnum tenerum* Sull. & Lesq. ex Sull. Bolívar: Liesner 19159 (MO); *Sphagnum recurvum* P. Beauv. Bolívar: Steyermark *et al.* 128356 (MO); *Sphagnum sancto-josephense* H.A. Crum & Crosby Trujillo: Dorr *et al.* 5055 (MO, NY); *Sphagnum magellanicum* Brid. Amazonas: Steyermark 129570 (MO); *Sphagnum ornatum* H.A. Crum Amazonas: Buck 10628 (MO, NY), Bolívar: Boom 9333 (MO, NY); *Sphagnum perichaetiale* Hampe Amazonas: Steyermark 107519 (MO), Bolívar: Liesner 19951 (MO).

<sup>6</sup> *Marchantia polymorpha* L. Colectada en el estado Mérida: Pittier 12894(MO), *Marchantia chenopoda* L. colectada en el Distrito Federal: Agostini *et al.* 81 (MO).

Venezuela se han identificado algunas especies: e.j. *A. filiculoides*<sup>7</sup> y *A. caroliniana*<sup>8</sup>.

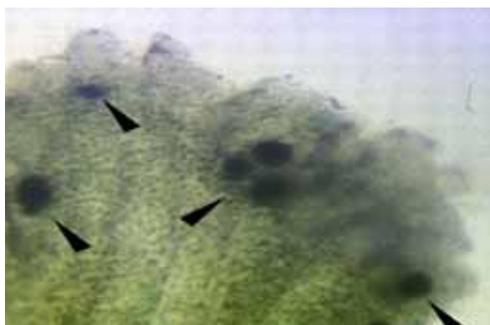


Figura 12. Sección del talo de *Anthoceros punctatus*, mostrando los domatia (flechas) con colonias de *Nostoc punctiforme* (Wong y Meeks, 2002).

*Azolla* es usado como fertilizante verde y como alimento para animales en China y Vietnam, y algunas regiones de África desde hace mucho tiempo y más recientemente como un biofiltro de aguas servidas (Carrapiço, 2002; van Hove y Lejeune, 2002).

El endosimbionte se aloja en la cavidad del lóbulo dorsal clorofílico de la hoja bilobada (Fig. 14),



Figura 13. Talo de *Azolla* sp. (van Hove y Lejeune, 2002).

<sup>7</sup> Mérida: Barclay 9628 (MO).

<sup>8</sup> Amazonas: Liesner y Carnevali 22784 (MO), Portuguesa: Liesner y González 12698; Zulia: Liesner y González 13188 (VEN).

donde además se localizan tricomas que intervienen en el transporte de sustancias. En esta asociación ocurre un intercambio de compuestos desde la cianobacteria hacia el hospedero (compuestos nitrogenados) y en vía contraria (productos fotosintéticos).

### Cianobacterias-Angiospermas

Todas las especies de *Gunnera* (Figura 15) forman asociaciones simbióticas con *Nostoc* (particularmente con *N. punctiforme*) (Figura 16), siendo la única angiosperma conocida por formar este tipo de asociación. Las cianobacterias se localizan intracelularmente (Figura 17) en las glándulas ubicadas en la base del peciolo (Figura 18) donde ocurre el intercambio de compuestos: nitrogenados desde el alga y fotosintéticos desde la planta (Benson y Margulis, 2002). Las glándulas se abren al exterior a través de varios canales y las células que las conforman se separan ligeramente en la base de los canales, formando una cavidad (Bergman *et al.*, 1992). Las especies de *Gunnera* (alrededor de 40) se distribuyen principalmente en el Hemisferio Sur, y se consideran originarias de Suramérica (Wanntorp y Wannorp, 2003). *G. pittierana* es autóctona en el Parque Nacional Henry Pittier (Venezuela).

### Cianobaterias- Gymnospermas (Cícadas)

El grupo de las cícadas (e.j. *Cycas*, *Zamia*, *Bowenia*) forma asociaciones simbióticas con cianobacterias (siendo las más comunes *Nostoc* spp, *Spirulina* sp. *Oscillatoria* sp., *Anabaena* spp., *Rivularia* sp. y *Calothrix* sp.) proporcionando un ambiente estable al alga a cambio del nitrógeno fijado; en esta alianza las cianobacterias son endosimbiontes de algunas raíces (raíces coraloides o parecidas a corales), las cuales se caracterizan por tener un crecimiento apogeotrópico o hacia la superficie del suelo (Figura 19) (Medeiros y Stevenson, 2004; Thoumire, 2004). *Cycas revoluta* es común en parques y jardines del país (Figura 20).

El proceso de colonización de las raíces precoraloides envuelve mecanismos de acción y reacción de ambos organismos. El alga penetra a través de la epidermis hacia la zona cianobacterial (Figura 21), produciéndose cambios permanentes que conducen a la transformación de las raíces precoraloides en raíces coraloides simbióticas (Figura 19) (Lindblad y Costa, 2002).

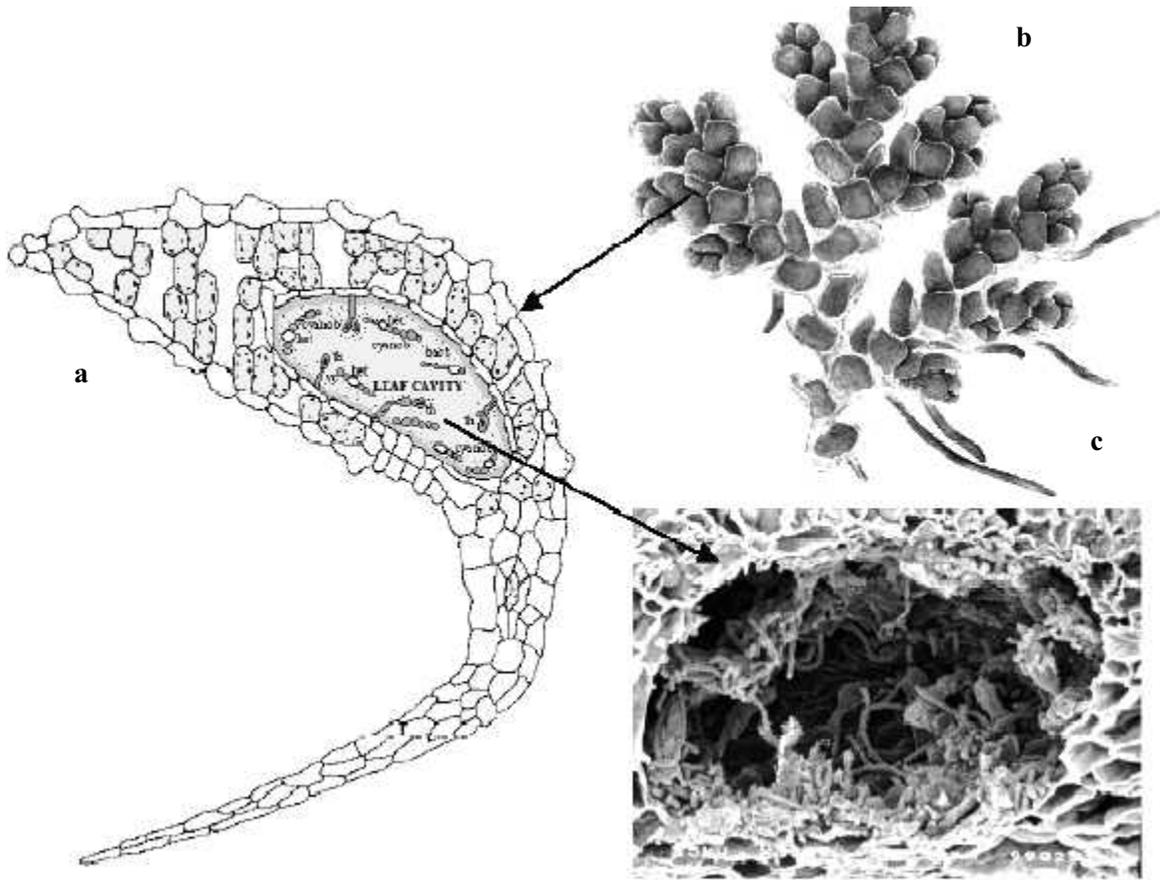


Figura 14. Lóbulo dorsal (a) de la hoja de *Azolla filiculoides* (b), mostrando la cavidad (c), donde se localiza el endosimbionte *Anabaena azollae* (Carrapico, 2002).



Figura 15. Planta de *Gunnera magellanica* (Rai *et al.*, 2000).



Fig. 16. Fotomicrografía en microscopio de luz del corte transversal del tallo de *G. chilense*, mostrando las colonias de *Nostoc* (S.U., 2004).

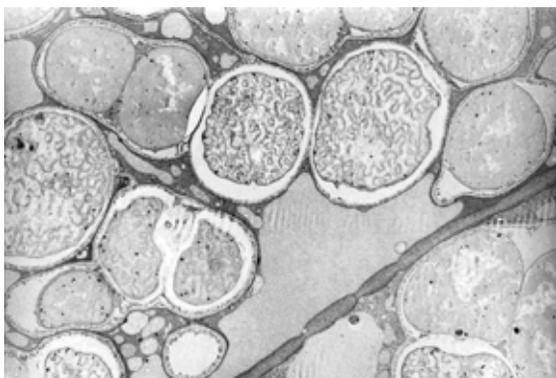


Figura 17. Fotomicrografía en microscopio de transmisión del corte transversal del tallo de *G. chilense*, mostrando la infección intracelular por *Nostoc* (S. U., 2004).



Figura 18. Tallo de *G. chilensis* mostrando las glándulas en la base de los pecíolos (S.U., 2004).

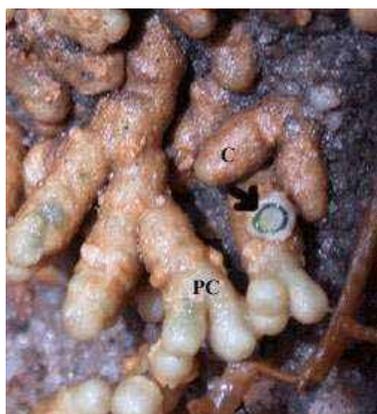


Figura 19. Raíces precoraloides (PC) y coralloides (C) de *Cycas circinalis*, donde se muestra la cianobacteria como endófito (→) (Medeiros y Stevenson, 2004).



Figura 20. *Cycas revoluta*. copyright © Geoff Stein, 1997 (VCE, 2004)

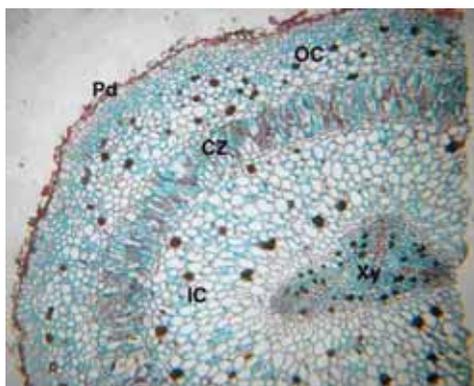


Figura 21. Sección transversal de una raíz coraloide mostrando la zona cianobacterial (CZ), traqueidas (Xy), corteza externa (OC) e interna (IC) y peridermis (Pd) (Medeiros y Stevenson, 2004).

Después de la reducción del nitrógeno hasta amonio, éste es incorporado en glutamina por glutamina sintetasa, luego el grupo amida es transferido a la posición alfa del  $\alpha$ -cetoglutarato, produciéndose glutamato, reacción catalizada por la glutamato sintasa; sin embargo, el análisis de la savia xilemática ha revelado que los compuestos nitrogenados transportados varían en algunas especies; así en *Macrozamia*, *Lepidozamia* y *Encephalartos* se ha encontrado glutamina y citrulina, mientras que en *Bowenia* y *Cycas*, glutamina y ácido glutámico (Lindblad y Costa, 2002).

### Fisiología del Intercambio de compuestos en las asociaciones con cianobacterias

Durante la simbiosis de las cianobacterias con otros organismos, ocurren cambios estructurales y fisiológicos que conducen al intercambio apropiado

de compuestos entre el cianobionte y el hospedero (Figura 22).

En el caso de localizaciones extracelulares del alga como en los líquenes, el contacto íntimo de las hifas con los heterocistos permite el tráfico de sustancias, desconociéndose el mecanismo exacto de intercambio. Se ha encontrado que en los cianolíquenes bipartitos (hongo-alga) ocurre el movimiento de productos fotosintéticos desde el cianobionte al micobionte, siendo principalmente glucosa, la cual es convertida a manitol (no producido, ni consumido por el alga) en el hongo, posiblemente una estrategia para el secuestro de carbohidratos. Como causa de esta liberación de glucosa se ha considerado la reducción de la síntesis de polisacáridos para la formación de las paredes celulares. El alga permanece independiente en cuanto a sus requerimientos y producción de carbohidratos. En los líquenes con cefalopodios o tripartitos no se ha encontrado o existe poco movimiento de carbohidratos desde el cianobionte al micobionte, considerándose que la fuente de carbohidratos es el ficobionte (alga verde) asociado ya que la cianobacteria no fotosintetiza. La glucosa liberada origina un pool de glucano, el cual sirve como

reservorio, siendo la fuente a utilizar por el cianobionte. En el caso de localizaciones intracelulares como en briofitas (musgos, hepáticas y antocerotas), helechos (*Azolla*), angiospermas (*Gunnera*) y gimnospermas (cícadas), se señala la posibilidad de que el cianobionte pierda su capacidad fotosintética y que el C provenga de las partes fotosintéticas del hospedero hacia el tejido simbiótico como sacarosa o proveniente de la degradación de los polisacáridos que están normalmente presentes en el mucílago de las cavidades o nódulos donde habita la cianobacteria. La fijación y transferencia de nitrógeno desde el cianobionte al hospedero ocurre en todas las simbiosis, siendo los heterocistos, los sitios de fijación y de las primeras reacciones de asimilación. El N puede existir en las células en las formas  $\text{NH}_4^+$  o  $\text{NH}_3$  que puede difundir a través de las membranas o ser reciclado por las células a través de un sistema transportador de amonio, devolviéndolo desde el espacio periplásmico conjuntamente con un protón. En los líquenes el amonio liberado, es asimilado vía glutamato deshidrogenasa, pero en las otras asociaciones se presenta la vía glutamato sintasa-glutamato sintetasa. El transporte de nitrógeno desde los tejidos simbióticos hacia las otras partes del hospedero se hace en forma de aminoácidos. En los

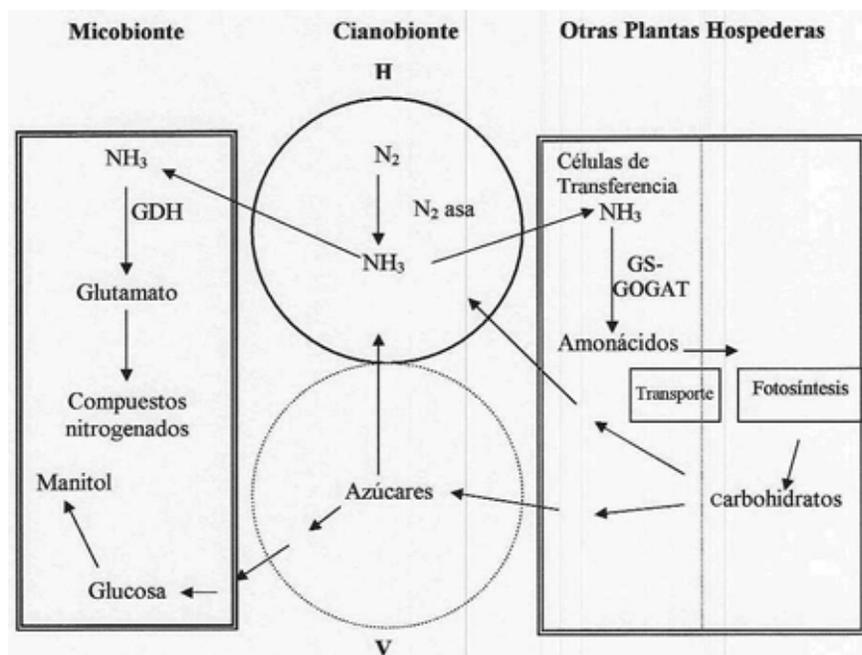


Figura 22. Intercambio de compuestos en las asociaciones con cianobacterias.  $\text{N}_2$  asa: nitrogenasa, GDH: glutamato deshidrogenada, GS-GOGAT: vía glutamato sintasa-glutamato deshidrogenada, H: heterocistos, V: células vegetativas (Rai *et al.*, 2000).

líquenes tripartitos, se ha demostrado el transporte de alanina desde el cefalopodio hacia el resto del talo; en *Azolla*, se transportan desde las cavidades en las hojas hacia el ápice del tallo los compuestos glutamato, glutamina, amonio y un derivado de glutamato; en *Gunnera*, asparagina es el compuesto principal exportado a través del floema desde las glándulas al resto de la planta y en las cícadas una mezcla de aminoácidos es liberada en el xilema desde las raíces coraloides, principalmente citrulina en *Zamiaceae* y glutamina en las otras familias (Rai *et al.*, 2000).

### Frankia-Angiospermas

La ocurrencia de *Frankia* en el interior de los nódulos de algunas plantas fue reportada por Woronin en 1866, quien describió las hifas y vesículas como pertenecientes a un hongo parásito, más tarde correctamente identificadas como pertenecientes al actinomicete *Frankia*. (Becking, 1974, Lechevalier y Lechevalier 1979), pero no fue sino hasta 1978 cuando pudo ser aislado. Este actinomicete forma nódulos (actinorizas) o raíces laterales modificadas con lóbulos hasta de 5 cm de longitud (Figura 23) y fija nitrógeno en ocho familias de dicotiledóneas: *Betulaceae*<sup>9</sup>, *Casuarinaceae*, *Coriariaceae*, *Datisceae*, *Elaeagnaceae*, *Myricaceae*<sup>10</sup>, *Rhamnaceae*<sup>11</sup> y *Rosaceae*<sup>12</sup>. Como consecuencia, estas plantas son capaces de crecer en suelos pobres e intervenidos (Verghese y Misra, 2002), siendo así útiles en la recuperación de suelos y reforestación.

En el proceso simbiótico y de formación de los nódulos se presentan variaciones determinadas por el hospedero, que incluyen la vía de infección (en

algunas especies la infección es vía pelos radicales, e.j. *Casuarina*, *Morella* (*Myrica*), y en otras procede intercelularmente, e.j. *Discaria*, *Dryas*, *Ceanothus*, la morfología y anatomía de los nódulos y en la diferenciación de *Frankia* en el desarrollo nodular (Benson y Silvester, 1993; Huss, 1990, 1999). La formación del primordio nodular (Figura 24) se inicia en el periciclo, donde se originan raíces laterales modificadas de forma lobular con células infectadas en la corteza. *Frankia* penetra los pelos radicales curvados o intercelularmente hacia la corteza, donde ocurren divisiones celulares limitadas que dan lugar a la formación del prenódulo; al mismo tiempo, en las células del periciclo opuestas al protoxilema se suceden divisiones mitóticas que conducen a la formación de las raíces laterales modificadas o nódulos; al prenódulo se le considera como un órgano simbiótico paralelo, desde donde progresan las hifas hacia el primordio del nódulo (Laplaze *et al.*, 2000; Obertello, 2003). Los lóbulos presentan un meristema apical y *Frankia* existe como un micelio vegetativo con presencia de vesículas donde es protegida y funciona la nitrogenasa; tal resguardo es dado por la elevada concentración de ácidos grasos; sin embargo, en *Casuarina* y *Allocasuarina*, no se forman vesículas, dado el cambio de composición de las paredes celulares, las cuales se hacen más hidrofóbicas y menos permeables al oxígeno después de la infección (Verghese y Misra, 2002).

Durante la simbiosis, el microsimbionte obtiene la energía de la planta hospedera a través de compuestos carbonados; se considera que *Frankia* por carecer de enzimas glicolíticas, obtiene el carbono de lípidos (Verghese y Misra, 2002); sin embargo,

<sup>9</sup> *Alnus acuminata* subs. *acuminata* Kunth ha sido colectada en el estado Mérida: Hahn y Grifo 3509(MO); *Alnus acuminata* var. *ferruginea* (Kunth) Regel colectada en la Cordillera de los Andes por Pittier 13239 (VEN).

<sup>10</sup> *Morella pubescens* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) Wilbur, 2001 ha sido colectada en los estados Barinas: Croat 74592 (MO), Lara: Liesner *et al.* 7939, Mérida: Liesner 13849 (MO), Yaracuy: Trujillo y Ponce 18275 (MO), Trujillo: Trujillo *et al.* 18370 (MO). y Distrito Federal: Gentry *et al.* 41263 (MO).

<sup>11</sup> *Rhamnus acuminata* Maguire & Steyer 1989. Colectada en el estado Amazonas: Maguire *et al.* 42496 (MO); *Rhamnus sipapoenis* Steyer. Maguire y Politi 28656(MO).

<sup>12</sup> *Prunus moritziana* Koehne colectada en los estados Mérida: Hahn y Grifo 3341 (MO) y Yaracuy: Smith V10001.



Figura 23. Nódulos de *Alnus* sp. mostrando la estructura multilobulada. Copyright © Lundquist, P.O. (Allan y Graham, 2002).

algunos investigadores han reportado el transporte de sacarosa vía floema hacia los nódulos (Parsons y Sunley, 2001). Como en los otros sistemas simbióticos el compuesto de nitrógeno metabolizado es  $\text{NH}_4^+$  a través de la vía GS/GOGAT, ATP/NADPH dependientes, que produce glutamina y luego glutamato en los nódulos; los aminoácidos aspartato y asparagina son subsecuentemente metabolizados por enzimas amido y amino transferasas (AAT) y sintetasas (AS) (Figura 25). El compuesto nitrogenado transportado vía xilema desde los nódulos varía entre los hospederos; así, se ha encontrado citrulina en *Alnus* sp. (Wheeler y Bond, 1970) y *Casuarina equisetifolia* (Walsh *et al.*, 1984), arginina en *Casuarina cunninghamiana* (Sellstedt y Atkins, 1991), y glutamina y asparagina en *Myrica* (Fig. 25), *Hippophae*, *Ceanothus* y *Elaeagnus* (Huss, 1990; Parsons, 2004).

## CONCLUSIONES

Los microorganismos fijadores de nitrógeno de vida libre, abarcan una gama morfológica que va desde los organismos unicelulares como las bacterias y algunas cianobacterias, hasta multicelulares como las cianobacterias filamentosas y los actinomicetes, que habitan diferentes ambientes, incluyendo los extremos, todos procarióticos; comprendiendo así

microorganismos pertenecientes a los Dominios Archaea y Bacteria, los cuales pueden formar asociaciones con organismos pertenecientes al Dominio Eucaria. Estas asociaciones pueden ser de tipo no simbiótico, ocurriendo principalmente en la filósfera o la rizósfera de algunas plantas, o de tipo simbiótico, dándose en briofitas (musgos, hepáticas y antocerotas), helechos (*Azolla*), gimnospermas (cícadas) y angiospermas (*Gunnera*, leguminosas y *Parasponia*) y en zonas de la planta que incluyen la raíz, el tallo y las hojas.

Una característica común de los microorganismos involucrados en la FBN, es la presencia del sistema enzimático nitrogenasa, que les permite la reducción del nitrógeno molecular ( $\text{N}\equiv\text{N}$ ) atmosférico hasta la forma asimilable  $\text{NH}_4^+$ . Esta enzima puede funcionar a cabalidad en los microorganismos viviendo en forma libre o asociados, excepto en las asociaciones de rizobia con leguminosas o *Parasponia*, donde la síntesis de la enzima es compartida; es decir su acción depende de los dos organismos involucrados. La actividad es susceptible a las concentraciones de oxígeno de la atmósfera circundante, de tal manera que los organismos, bien aislados o asociados han adoptado mecanismos que le permiten la protección de la actividad de la misma, mecanismos que incluyen: protección respiratoria, conformacional y la compartimentalización.

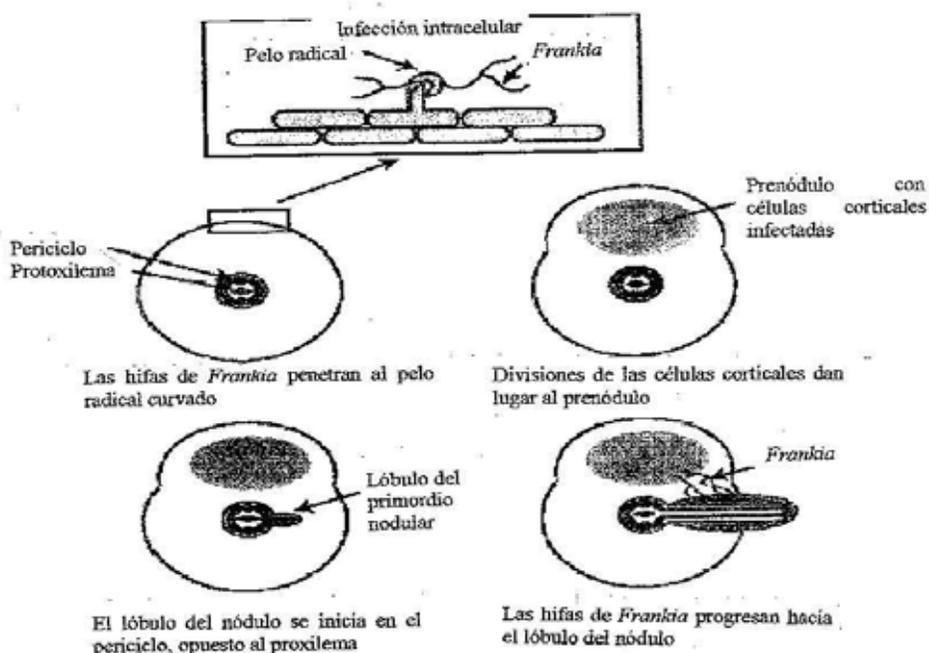


Fig. 24. Infección y desarrollo nodular (Obertello, 2003).

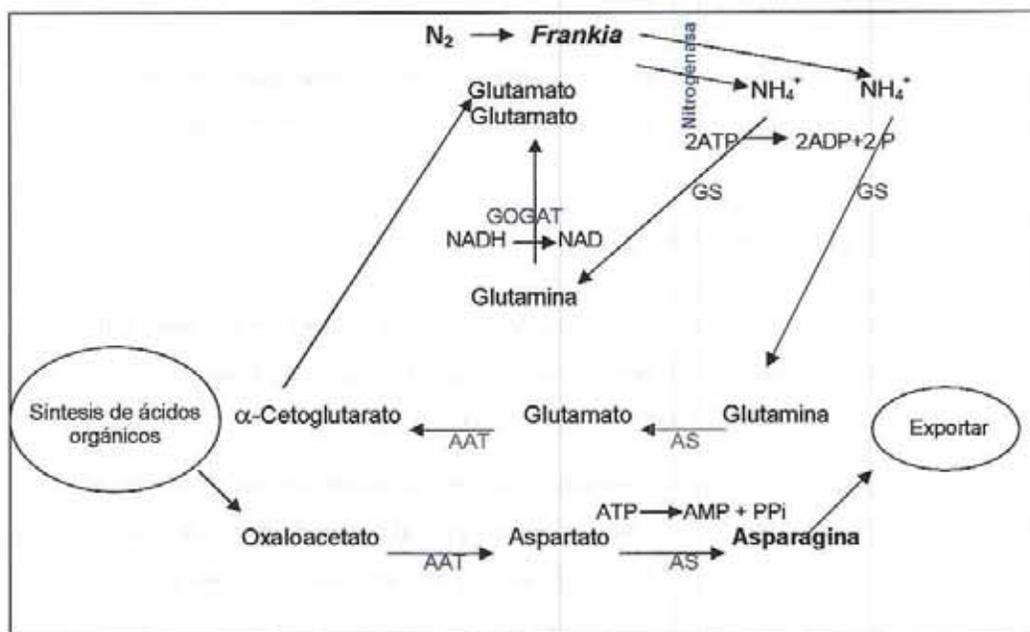


Figura 25. Síntesis de asparagina en *Myrica* sp. (Parsons, 2004).

Bien sea de vida libre o asociados los organismos se benefician de la FBN, al poder utilizar el nitrógeno del aire como fuente del elemento, e incorporarlo en compuestos esenciales para su crecimiento y desarrollo. En general la vía de metabolización es la glutamato sintasa/glutamato sintetasa (GS/GOGAT), excepto en los líquenes, donde el amonio es asimilado vía glutamato deshidrogenada. Los compuestos transportados vía xilema o floema son aminoácidos, principalmente glutamina o sus derivados aminorados, amidas o ureidos formados por reacciones de aminación y desaminación.

En Venezuela, están representados todos los organismos y asociaciones fijadoras de nitrógeno, siendo un potencial casi inexplorado; está en nuestras manos jugar un papel en este contexto.

#### LITERATURA CITADA

- Adams, D. G. 2000. Symbiotic Interactions. In The Ecology of Cyanobacteria. Whitton, B. A. and Potts, M. (ed.), Dordrecht, Netherlands: The Kluwer Academic Publ. pp. 523-561
- Allan, D. and Graham. P. 2002. Soil 5611: Soil Biology and Fertility: Symbiotic Nitrogen Fixation, other N<sub>2</sub>-fixing symbiosis. Dep. of Soil,

Water, and Climate. University of Minnesota. Disponible en: <http://www.soils.agri.umn.edu/academics/classes/soil3612/SymbioticNitrogenFixation/Other.htm>. (Última visita 15 de noviembre de 2004)

Andrade de, Z. and Cuenca, G. 1998. First report of Giomalean fungi in the highlands tepuis of La Gran Sabana, Guayana Shield, Venezuela. 2<sup>nd</sup> International Conference on Mycorrhiza. Uppsala, Sweden, 5-10 July.

Armstrong, W. J. 2004. *Parmotremma stuppeum*. Disponible en: <http://waynesword.palomar.edu/pljan98f.htm#p-armotremma>. (Última visita 22 de noviembre de 2004)

Armstrong, W. J. 2001. *Teloschistes chrysophthalmus*. Disponible en: <http://waynesword.palomar.edu/pljan98f.htm#lobaria>. (Última visita 18 de noviembre de 2004)

Becker, D., Stanke, R., Fendrik, I., Frommer, W.B., Vanderleyden, J., Kaiser, W.M., Hedrich, R. 2002. Expression of the NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-transporter gene *LEAMT1;2* is induced in tomato roots upon association with N<sub>2</sub>-fixing bacteria. *Planta* 215:424-429.

- Becking, J.H. 1974. Family III. Frankiaceae Becking 1970. In Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Buchanan, R.E. and Gibbon, N.E. (eds.), 8th ed. The Williams and Wilkins Co.: Baltimore. pp. 701-706.
- Beijerinck, M.W. 1888. Die bakterien der papilionaceen knolichen. Bot. Zeit. 46:725-735.
- Beijerinck, M.W. 1925. Über ein *Spirillum*, welches freien Stickstoff binden kannh. Zentralbl Bakteriell Parasitenkd Infektionskr Abt 63: 353.
- Benson, D.R. and Silvester, W.B. 1993. Biology of *Frankia* strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. Microbiol. Rev. 57(2):297-319.
- Benson, J. and Margulis. L. 2002. The *Gunnera manicata*-*Nostoc* symbiosis: is the red stipulate tissue symbiogenetic?. Biol. Environ. Proc. of the Royal Irish Acad. 102 (1):45-48.
- Bergman, B., Johansson, C. and Soderback, E. 1992. The *Nostoc*-*Gunnera* symbiosis. New Phytol. 122:379-400.
- Brodo, I.M., Sharnoff, S.D., Sharnoff, S. 2001. The Lichens of North America. New Haven, MA, USA: Yale University Press.
- Capone, D. G., Zehr, J. P., Paer, H. W. I, Bergman, B. and Carpenter, E. J. 1997. *Trichodesmium*, a globally significant marine cyanobacterium. Science 276:1221-1229.
- Carrapiço, F. 2002. The *Azolla-Anabaena*-bacteria system as a natural microcosm. Proceedings of SPIE 4495: 261-265.
- Casida, L. E. Jr. 1982. *Ensifer adhaerens* gen. nov., sp. nov. a bacterial predator of bacteria in soil. Int. J. Syst. Bacteriol. 32, 339-345.
- Ching-Hong, Y., Crowley, D.E., Borneman, J. and Keen, N. T. 2001. Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. Proc. Nat. Acad. Sci. 98(7):3889-3894.
- Costa, J. L. Paulsrud, P., Rikkinen, J. and Lindblad, P. 2001. Genetic diversity of *Nostoc* symbionts endophytically associated with two bryophyte species. Appl. Environ. Microbiol. 67(9):4393-4396.
- Dreyfus, B., Garcia, J. L., and Gillis, M. 1988. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. Int. J. Syst. Bacteriol. 38:89-98.
- Dugan, M. 2004. Field Training Manual for Laboratory Analysts. Disponible en: [www.home.alltel.net/mikeric/chap10up/Chapter10Nitrogen.htm](http://www.home.alltel.net/mikeric/chap10up/Chapter10Nitrogen.htm). (Última visita 15 de noviembre de 2004)
- Eckert, B., Weber, O.B., Kirchhof, G., Halbritter, A., Stoffels, M. and Hartmann, A. 2001. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 17-26.
- Espinoza, Y. y Gutiérrez, R. 2003. Variabilidad intraespecifica de *Azolla filiculoides*, colectadas en la zona centro-occidental de Venezuela. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 2003, 20: 156-167.
- Estrada, P., Bustillos, R. and Caballero, J. 2001. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. Appl. Environ. Microbiol. 67(6):2790-2798.
- Fred, E. B., Baldwin, I. L. and McCoy, E. 1932. Root Nodule Bacteria and Leguminous Plants. Madison, U.S.A.: The University of Wisconsin Press.
- Gage DJ. 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 68(2):280-300.
- González, J. E. and Marketon, M. M. 2003. Quorum sensing in nitrogen-fixing rhizobia. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67(4):574-592.
- Halbleib, C. M. and Ludden, P. W. 2000. Regulation of Biological Nitrogen Fixation. J. Nutr. 130:1081-1084.
- Harrison, J., Pou de Crescenzo, M. A., Sené, O. and Hirel, B. 2003. Does lowering glutamine synthetase activity in nodules modify nitrogen metabolism and growth of *Lotus japonicus*?. Plant Physiol. 133:253-262.
- Hellriegel, H. and Wilfarth, H. 1888. Untersuchungen über die stickstoff-nahrung der Gramineen und Leguminosen. Zeitschrift für die verschiedene Rubenzucker des Deutschen Reichs. Beilageheft.
- Herrero, A., Muro-Pastor, A. M., and Flores, E. 2001. Nitrogen Control in Cyanobacteria. J. Bacteriol. 183(2):411-425.

- Hill, D. 2001. Lichens and co-ordination of the symbionts. *Microbiol. Today* 28:124-137.
- Hiltner, L. 1904. Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. *Arbeiten Deutscher Landwirtschafts Gesellschaft* 98:59-78.
- Hirano S. S. and Upper, C. D. 2000. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*-a pathogen, ice Nucleus, and epiphyte. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64(3):624-653.
- Hirsch, A. M. 1992. Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol.* 122:211-237.
- Huss, K. 1990. The physiology of actinorhizal root nodules. In *The Biology of Frankia and Actinorhizal Plants*. Schwintzer, C. R. and Tjepkema, J. D. (eds.) London: Academic Press. pp. 129-156.
- Huss, K. 1999. Nitrogen fixation in *Frankia* symbioses. XVI International Botanical Congress 1999. 1-7 August, Saint Louis, Missouri, U.S.A.
- Jarvis, B. D. W., Van Berkum, P., Chen, W. X., Nour, S. M., Fernandez, M. P., Cleyet-Marel J. C. and Gillis, M. 1997. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:895-898.
- Jordan, D.C. 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32:136-139.
- Khammas, K.M., Ageron, E., Grimont, P.A.D. and Kaiser, P. 1989. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. *Res. Microbiol.* 140: 679-693.
- Laplaze, L., Duhoux, E., Franche, C., Frutz, T., Svistoonoff, S., Bisseling, T., Bogusz, D., Pawlowski, K. 2000. *Casuarina glauca* prenodule cells display the same differentiation as the corresponding nodule cells. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13: 107-112.
- Lechevalier, M.P. and Lechevalier, H.A. 1979. The taxonomic position of the actinomycete endophytes. In *Symbiotic Nitrogen Fixation in the Management of Temperate Forests*. Gordon, J.C., Wheeler, C.T. and Perry, D.A. (eds.). Oregon State University Forest Research Laboratory, Corvallis. pp 111-121.
- Lee, S., Flores-Encarnación, M., Contreras-Zentella, M., Garcia-Flores, L., Escamilla, J.E. and Kennedy, C. 2004. Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome c biogenesis genes. *J. Bacteriol.* 186(16):5384-5391.
- Lindblad, P. and Costa, J.L. 2002. The cyanobacterial-cycad symbiosis. *Biol. Environ. Proc. Royal Irish Academy* 102B (1):31-33.
- Lindow, S.E. and Brandl, M.T. 2003. Microbiology of the Phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(4):1875-1883.
- Magelhaes, F.M.M., Baldani, J.I., Souto, S.M., Kuykendall, J.R. and Döbereiner, J. 1983. A new acid tolerant *Azospirillum* species. *An. Acad. Bras. Cienc.* 55: 417-429.
- Mantelin, S. and Touraine, B. 2004. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *J. Exp. Bot.* 55(394):27-34.
- Martin, J.K. and Kemp, J.R. 1980. Carbon loss from roots of wheat cultivars. *Soil Biol. Biochem.* 12:551-554.
- Mayz, J. 1997. *Simbiosis Leguminosas/Rizobia*. Ediciones del Instituto de Investigaciones Agropecuarias IAPUDO. Universidad de Oriente. Núcleo de Monagas. Maturín. Venezuela. 113 p.
- Medeiros, J and Stevenson D 2004. Coralloid roots and nitrogen fixation. Disponible en: <http://plantnet.rbgsyd.gov.au/PlantNet/cycad/nitrogen/nfixd.html>. (Última visita 15 de noviembre de 2004)
- Meeks, J. C. and Elhai, J. 2002. Regulation of Cellular Differentiation in Filamentous Cyanobacteria in Free-Living and Plant-Associated Symbiotic Growth States. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66(1):94-121.
- Mifflin, B. J. and Habash, D. Z. 2002. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *J. Exp. Bot.* 53(370):979-987.

- Mirza, M.S., Ahmad, W., Latif, F., Haurat, J., Bally, R., Normand, P., Malik, K.A. 2001. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane *in vitro*. *Plant Soil* 237:47–54.
- Nalin, R., Putra, S. R., Domenach, A. M., Rohmer, M., Gourbiere, F. and Berry, A. M. 2000. High hopanoid/total lipids ratio in *Frankia* mycelia is not related to the nitrogen status. *Microbiol.* 146:3013-3019.
- Obertello, M., Oureye, M., Laplaze, L., Santi, C., Svistoonoff, S., Auguy, F., Bogusz, D. and Franche C. 2003. Actinorhizal nitrogen fixing nodules: infection process, molecular biology and genomics. *Afr. J. Biotech.* 2 (12):528-538.
- Oksanen, I., Jokela, J., Fewer, D.P., Wahlsten, M., Rikkinen, J. and Sivonen, K. 2004. Discovery of rare and highly toxic microcystins from lichen-associated cyanobacterium *Nostoc* sp. Strain IO-102-I. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(10):5756-5763.
- Omoregie, O. E., Crumbliss, L. L., Bebout, B. M. and Zehr, J. P. 2004. Determination of Nitrogen-Fixing Phylotypes in *Lyngbya* sp. and *Microcoleus chthonoplastes* Cyanobacterial Mats from Guerrero Negro, Baja California, Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(4): 2119-2128
- Ortega, J.L., Temple, S.J., Bagga, S., Ghoshroy, S., Sengupta-Gopalan, C. 2004. Biochemical and molecular characterization of transgenic *Lotus japonicus* plants constitutively over-expressing a cytosolic glutamine synthetase gene. *Planta* 219(5):807-18.
- Parsons, R. 2004. Plant - Microbe Metabolism. Disponible en: [www.personal.dundee.ac.uk/~rparsons/andfrank.htm](http://www.personal.dundee.ac.uk/~rparsons/andfrank.htm). (Última visita 15 de noviembre de 2004)
- Parsons, R. and Sunley, R.J. 2001. Nitrogen nutrition and the role of root–shoot nitrogen signalling particularly in symbiotic systems. *J. Exp. Bot.* 52:435-443.
- Per, P. 2001. The Nostoc Symbiont of Lichens. Diversity, Specificity and Cellular Modifications. *Acta Universitatis Upsaliensis* 662:1-56.
- Perret, X., Staehelin, C., Broughton, W.J. 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64(1):180-201.
- Persello-Cartieaux, F., Nussaume, L. and Robaglia, C. 2003. Tales from the underground: molecular plant–rhizobia interactions. *Plant Cell Environ.* 26:189–199.
- Purvis, W. 2000. Lichens. Smithsonian Institution Press: Washington. 112 p.
- Rai, A. N., Soderback, E. and Bergman, B. 2000. Tansley Review No. 116: Cyanobacterium-plant symbioses. *New Phytol.* 147:449-481.
- Reinhold, B., Hurek, T., Fendrik, I., Pot, B., Gillis, M., Kersters, K., Thielemans, S. and De Ley, J. 1987. *Azospirillum halopraeferans* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca*) (L. Kunth.). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 43-51.
- Robson, R. L., and Postgate, J. R. 1980. Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation. *Annu. Rev. Microbiol.* 34:183-207.
- Schofield, S.C., Campbell, D. A., Funk, C. and MacKenzie, T.D.B. 2003. Changes in macromolecular allocation in nondividing algal symbionts allow for photosynthetic acclimation in the lichen *Lobaria pulmonaria*. *New Phytologist* 159: 709–718.
- Scott, D. B., Farnden, K. J. F. and Roberts, J. G. 1976. Ammonia assimilation in lupin nodules. 263:705-707.
- Segura, D. and Espín, G. 1998. Mutational Inactivation of a Gene Homologous to *Escherichia coli ptsP* Affects Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate Accumulation and Nitrogen Fixation in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 180(18):4790-4798.
- Sellstedt, A. and Atkins, C. A. 1991. Composition of amino compounds transported in xylem of *Casuarina* sp. *J. Exp. Bot.* 42:1493–1497.
- Silverside, A. J. 2002. *Caloplaca saxicola* (Hoffm.)Nodin. Biodiversity Reference Pages. University of Paisley, U.K. Disponible en: [http://www-biol.paisley.ac.uk/research/Asilverside/lichens/Caloplaca\\_saxicola.html](http://www-biol.paisley.ac.uk/research/Asilverside/lichens/Caloplaca_saxicola.html). (Última visita 12 de noviembre de 2004).
- Silvester, W. B., Harris, S. L. and Tjepkema, J. D. 1990. Oxygen regulation and hemoglobin. In *The Biology of Frankia and Actinorhizal Plants*, pp. 157-173. Schwintzer, C. R. and Tjepkema, J. D. (Eds.). New York: Academic Press.

- Sly, L. I. and Stackebrandt, E. 1999. Description of *Skermanella parooensis* gen. nov., sp. nov. to accommodate *Conglomerans largomobilis* subsp. *parooensis* following the transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum*. Int. J. Syst. Bacteriol. 49: 541-544.
- Smith, W.H. 1976. Character and significance of forest tree root exudates. Ecology 57:324-331.
- Sprent, J. I. and Sprent, P. 1990. Nitrogen Fixing Organisms. Pure and Applied Aspects. Londo, U.K.:Chapman-Hall. 256 p.
- Stanier, R. Y. and Cohen-Bazire, G. 1977. Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. Annu. Rev. Microbiol. 31:225-274.
- Stockholm University (S.U.). 2004. Establishment and communication in cyanobacterial - plant symbiosis: Molecular cyanobacterial-plant interactions.
- Sundin, G. W. and Jacobs, J. L. 1999. Ultraviolet radiation (UVR) sensitivity analysis and UVR survival strategies of a bacterial community from the phyllosphere of field-grown peanut (*Arachis hypogaea* L.). Microb. Ecol. 38:27-38.
- Tarrand, J., Krieg, N.R. and Döbereiner, J. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov., and two species *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) sp. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. Can. J. Microbiol. 24: 967-980.
- Thoumire, E. 2004. Corraloid Roots of Cycads. In Chapter 3: Biology of Cycads. Disponible en: <http://www.plantapalm.com/vce/biology/biology.htm>. (Última visita 15 de noviembre de 2004)
- Todar, K. 2004. Todar's Online Textbook of Bacteriology. Important Groups of Prokaryotes. Disponible en: <http://www.textbookofbacteriology.net>. (Última visita 15 de noviembre de 2004)
- Ureta, A. and Nordlund, S. 2002. Evidence for Conformational Protection of Nitrogenase against Oxygen in *Gluconacetobacter diazotrophicus* by a Putative FeSII Protein. J. Bacteriol. 184(20):5805-5809.
- van Hove, C. and Lejeune, A. 2002. The *Azolla-Anabaena* symbiosis. Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy 102B(1):23-26.
- Vance, C. P., Miller, S. S., Driscoll, B. T., Robinson, D. L., Trepp, G., Gantt, J. S. and Samas, D. A. 1998. Nodule carbon metabolism: organic acids for N<sub>2</sub> fixation. In Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century. Elmerich, C., Kondorosi, A and Newton, W. E. (eds.) Dordrecht: Kluwer pp. 443-448.
- Vergheese, S. and Misra A. K. 2002. *Frankia*-actinorhizal symbiosis with special reference to host-microsymbiont relationship. Current Sci. 83(4):404-408.
- Virtual Cycad Encyclopedia (VCE). 2004. Disponible en: [http://www.plantapalm.com/vce/species/cycas\\_revoluta.htm](http://www.plantapalm.com/vce/species/cycas_revoluta.htm). (Última visita 15 de noviembre de 2004).
- Walsh, K.B., Ng, B. H., Chandler, G. E. 1984. Effects of nitrogen nutrition on xylem sap composition of the Casuarinaceae. Plant Soil 81:291-293.
- Wanntorp, L. and Wanntorp, H.E. 2003. The biogeography of *Gunnera* L.: vicariance and dispersal. J. Biogeography 30:979-987.
- Weir, B. 2004. Rhizobia taxonomy: The current taxonomy of rhizobia. Disponible en: [http://www.rhizobia.co.nz/Rhizobia\\_Taxonomy.html](http://www.rhizobia.co.nz/Rhizobia_Taxonomy.html). (Última visita 15 de noviembre de 2004)
- Wheeler, C. T. and Bond, G. 1970. The amino acids of non-legume root nodules. Phytochem. 9:705-708.
- Wong, F. C.Y. and Meeks J. C. 2002. Establishment of a functional symbiosis between the cyanobacterium *Nostoc punctiforme* and the bryophyte *Anthoceros punctatus* requires genes involved in nitrogen control and initiation of heterocyst differentiation. Microbiol. 148: 315-323.
- Yoon, H.S. and Golden, J. W. 2001. Pats and products of nitrogen fixation control heterocyst pattern. J. Bacteriol. 183(8): 2605-2613.