

FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO EN ENDÓFITOS Y ENDOSIMBIOTES DE PLANTAS

González, M.¹; Catalán, A.I.¹; Carbó, A.¹; Rosconi, F.²; Gill, P.R.^{1, 3};
Fabiano, E.²; Batista, S.¹

RESUMEN

La asociación rizobio-leguminosa ha sido detalladamente estudiada en virtud de su indiscutible relevancia ecológica, económica y como modelo para el estudio de las interacciones planta-bacteria, organogénesis vegetal y procesos de diferenciación en procariotas. El aislamiento de microorganismos diazotófos endófitos de plantas no leguminosas, ha promovido el desarrollo de estudios fisiológicos de los microorganismos capaces de colonizar el interior del vegetal y, en determinados casos, reducir el nitrógeno atmosférico *in planta*.

PALABRAS CLAVES: endófito, diazótrofo, simbiosis, *Rhizobium*, *Herbaspirillum*.

SUMMARY

BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION IN ENDOPHYTES AND PLANT ENDOSYMBIONTS

Rhizobium-legume association has been studied in detail because of its ecological and economical importance. It has also been used as a model for the study of plant-bacteria interactions, plant organ development and differentiation/morphogenesis in prokaryotes. The identification of diazotrophic endophytes in non-leguminous plants encouraged the development of detailed studies of these microorganisms that upon colonization of the interior of a plant, in some cases are able to reduce the atmospheric nitrogen.

KEY WORDS: endophyte, diazotroph, symbiosis, *Rhizobium*, *Herbaspirillum*.

INTRODUCCIÓN

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) forma parte de uno de los procesos químicos y biológicos globales más estudiados. Sólo los organismos procariotas pueden reducir el nitrógeno atmosférico (N₂) (diazótrofos) y este proceso lo pueden desarrollar en condiciones de vida libre o asociados a eucariotas.

La FBN por bacterias asociadas a plantas ha sido empleada como estrategia alternativa a la fertilización química. La producción industrial de fertilizantes nitrogenados depende del uso de materias primas no renovables y, en los últimos años, con una persistente tendencia a incrementar sus costos. Además, el empleo intensivo de estos productos genera riesgos de contaminación ambiental por nitratos en los cursos de agua.

Las bacterias diazotófas del género *Rhizobium* son capaces de establecer asociaciones simbióticas con plantas leguminosas, induciendo y alojándose en estructuras vegetales especializadas denominadas nódulos. El uso de rizobios como inoculante es una práctica ampliamente utilizada para el mejoramiento de praderas. La FBN derivada de la simbiosis rizobio-leguminosa contribuye con los mayores niveles de nitrógeno directamente aportado a un organismo eucariota.

Durante la década de 1970, el aislamiento de bacterias diazotófas endófitas de gramíneas impulsó la investigación dirigida a extender el rango de plantas que podrían beneficiarse con un aporte de nitrógeno reducido por sus organismos asociados (Baldani & Baldani, 2005).

¹Departamento de Bioquímica.

²Laboratorio de Ecología Microbiana, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Unidad Asociada de Sección Bioquímica, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Av. Italia 3318, Montevideo, 11600, Uruguay.

³Laboratorio de Tecnología Molecular, Facultad de Ciencias, Iguá 4225, Montevideo, 11400, Uruguay.

Kloepper *et al.* (1992) define como endófitos a los microorganismos que, durante parte de su ciclo de vida, son capaces de colonizar los tejidos internos de una planta, sin distinguir dentro de esta definición el concepto de patógeno. Esta definición considera la existencia de algunos organismos que, sin causar síntomas de enfermedad aparente, pueden estar en una fase de latencia o ser patógenos en otras circunstancias u hospederos. La sobrevivencia de los microorganismos endófitos se ve favorecida con respecto al ciclo de vida que se desarrollaría en el suelo, tanto en lo que refiere a la disponibilidad de nutrientes como al resguardo del medio ambiente (Barraquio *et al.*, 1997).

Los organismos endófitos han sido agrupados en facultativos y obligados (Baldani *et al.*, 1997). Los microorganismos facultativos son capaces de sobrevivir en el suelo, en la superficie de las plantas y colonizar el interior de las mismas. Los organismos endófitos obligados no podrían “sobrevivir” de forma cultivable en el suelo en ausencia de plantas hospederos. Este concepto se define en el contexto de la recuperación de los organismos en forma cultivable sin considerar su viabilidad. Este último grupo incluye algunas especies del género *Herbaspirillum*, *Gluconoacetobacter diazotrophicus*, etc.

ASOCIACIÓN RIZOBIO-LEGUMINOSA

El nivel de complejidad de la relación rizobio-leguminosa se torna evidente al analizar los sistemas de comunicación a través de señales moleculares existentes entre ambos organismos. Esto determina que la planta hospedero y su pequeño huésped sean específicamente reconocidos, permitiéndole a la leguminosa disminuir las posibilidades de infecciones por patógenos y el establecimiento de nódulos no efectivos. El ingreso de la bacteria procede previa deformación de los pelos radicales e invaginación de los mismos para formar los hilos de infección que actúan como pequeños túneles de acceso. Las bacterias, una vez separadas del extremo del hilo de infección, son incorporadas en el citoplasma vegetal por endocitosis. Los rizobios son mantenidos dentro del nódulo en estructuras denominadas simbiosomas y se dividen unas pocas veces más antes de continuar el proceso de diferenciación como bacteroide que los habilita a reducir el N_2 . Los bacteroides están topológicamente aislados del citoplasma vegetal por una membrana peribacteroidea. Esta membrana, de origen vegetal, permite el pasaje vectorial de compuestos específicos. Es generalmente aceptado que la planta es la que decide, en última instancia, los nutrientes que va a consumir el microorganismo (Streeter, 1991). El ingreso de los bacteroides dentro del simbiosoma constituye un cambio fundamental en su ambiente, comparado con el existente

en los hilos de infección. El contenido de nutrientes, pH, pO_2 , presión osmótica y otros factores no identificados, determinan que la bacteria inicie un programa de diferenciación que culmina con el bacteroide maduro fijando N_2 .

De acuerdo con su morfología, los nódulos se clasifican en determinados o indeterminados, siendo ésta una característica dependiente de la planta (Michiels & Vanderleyden, 1994). Los nódulos indeterminados poseen un meristema apical persistente, por lo que las zonas más envejecidas se localizan en la base del mismo. En este tipo de nódulo cada simbiosoma contiene un solo bacteroide diferenciado. Los nódulos determinados tienen forma esférica y no se distingue actividad meristemática evidente en los nódulos maduros. Durante la formación de estos nódulos coexisten células vegetales infectadas en diferentes fases de desarrollo, conteniendo simbiosomas con más de un bacteroide (Patriarca *et al.*, 2002).

La FBN requiere una muy baja y bien controlada concentración de oxígeno, dado que el complejo nitrogenasa, responsable de la reducción del N_2 , es irreversiblemente inhibido en presencia de este elemento. En el caso particular de los rizobios asociados a las leguminosas, los nódulos poseen una capa de células no infectadas que rodea el grupo central de células infectadas. Esas células restringen el flujo de oxígeno actuando como barrera de difusión. Esto, junto con el metabolismo de los bacteroides y mitocondrias de las células vegetales infectadas, crean un ambiente microaerófilico dentro del nódulo (3-22 nM) (Hunt & Layzell, 1993). La alta tasa metabólica del bacteroide y por lo tanto la eficiente producción de ATP y poder reductor se destinan en gran parte para el mantenimiento de la actividad del complejo nitrogenasa. En este necesario ambiente microaerófilico participa también una proteína vegetal de unión al oxígeno (leghemoglobina) y que facilita el transporte de este elemento hacia los bacteroides, un sistema de citocromos de alta afinidad por el oxígeno que asegura la producción de ATP a concentraciones de O_2 menores de 10 nM (Bergersen & Turner, 1975) y el metabolismo modificado de carbono (McDermott *et al.*, 1989).

La planta suplementa al bacteroide con fuentes carbonadas a los efectos de satisfacer los requerimientos del proceso de fijación de nitrógeno. Los fotosintatos, incluyendo sucrosa, son transportados hacia el nódulo vía floema (Reibach & Streeter, 1983), pero no son consumidos directamente por el bacteroide. Fuera del simbiosoma, la sucrosa es hidrolizada principalmente por la sucrosa sintasa a UDP-glucosa y fructosa. Esta enzima es esencial para el mantenimiento de la fijación de nitrógeno (Craig *et al.*, 1999). Parte de los productos generados por la hidrólisis son metabolizados mediante las enzimas glicolíticas para generar fosfoenolpiruvato (FEP) (Reibach & Streeter, 1983)

y posteriormente malato (Day & Copeland, 1991). La concentración de malato dentro del nódulo es del orden de 3.4 mM y están también presentes otros ácidos C₄-dicarboxílicos (ADCs) (Streeter, 1987). Los mutantes de rizobio en el sistema de transporte de ADCs (DctA) no son capaces de reducir el N₂ al asociarse con la leguminosa (Ronson *et al.*, 1981; Finan *et al.*, 1983). Los mutantes *dctA* son capaces de infectar la raíz de la planta pero mueren rápidamente luego de establecerse en el nódulo. Las células infectadas de los nódulos presentan un alto contenido de almidón (Ronson *et al.*, 1981; Finan *et al.*, 1983), sugiriendo que las bacterias son capaces de consumir otras fuentes carbonadas en el hilo de infección, pero una vez iniciado el proceso de diferenciación los ADCs son esenciales para el mantenimiento de la fijación de nitrógeno. Además del sistema DctA, en nuestro laboratorio hemos identificado la presencia de un presumible sistema de transporte de oxoglutarato (KgtP) en bacteroides de *Rhizobium tropici* al asociarse con *Phaseolus vulgaris*. Los mutantes *dctA* retienen una cierta capacidad de reducir el N₂ y son capaces de crecer en presencia de succinato y oxoglutarato pero no en malato ni fumarato. Los dobles mutantes *dctA kgtP* forman nódulos inefectivos y no crecen en ninguno de los ácidos orgánicos mencionados. En este momento se analiza la posible función de este sistema de transporte para incorporar fuentes de carbono en el bacteroide o como registro de los niveles de nitrógeno en la planta.

Aporte de nitrógeno a la planta. El N₂ es reducido a amonio mediante el complejo nitrogenasa. La expresión de las vías de asimilación de amonio es pobre en los bacteroides, por lo que la mayor parte del nitrógeno reducido es suministrado en forma de amoníaco a la planta, aunque existen evidencias de que parte del nitrógeno sería transportado previa incorporación en la síntesis del aminoácido alanina (Waters *et al.*, 1998). Se presume que el amoníaco atraviesa la membrana citoplasmática del bacteroide mediante difusión. Aunque esto no ha sido claramente establecido, el amoníaco sería rápidamente protonado a amonio gracias al ambiente ácido del espacio peribacteroide (Udvardi *et al.*, 1991). En el citoplasma de la planta, el amonio transportado desde los simbiosomas es utilizado para la síntesis de glutamato mediante la glutamato deshidrogenasa (GDH) o la vía glutamina sintetasa-glutamato sintasa (GS-GOGAT). El nitrógeno reducido incorporado en el glutamato es posteriormente transferido a otros compuestos antes de ser transportado al resto de la planta vía xilema.

Metabolismo carbonado del bacteroide. Los estudios sobre el metabolismo del bacteroide se basan en su mayor parte en la caracterización de mutantes incapaces de expresar determinadas actividades enzimáticas y el análisis

de sus fenotipos simbióticos. Los ADCs son metabolizados mediante el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ATCs). De todos modos se considera que el mismo no trabaja con su total capacidad debido a los elevados niveles de poder reductor (McDermott *et al.*, 1989; Day & Copeland, 1991). Las condiciones microaeróbicas del nódulo limitan la actividad de la cadena respiratoria, contribuyendo a aumentar la concentración interna de NADH. En estudios previos se estimó que la relación NADH:NAD⁺ presente en bacteroides de *Bradyrhizobium japonicum* sería aproximadamente 0.83, lo que resultaría en una disminución de más de un 50% en la actividad *in vitro* de la oxoglutarato deshidrogenasa (Salminen & Streeter, 1990). Esto determina que existan vías alternativas o para mantener el balance de carbono y poder reductor del bacteroide. Dentro de estas vías alternativas se incluyen las rutas del glioxilato, oxoglutarato decarboxilasa y la síntesis de compuestos de reserva (McDermott *et al.*, 1989).

El acetil-CoA se sintetiza dentro de los nódulos mediante la acción concertada de la enzima málica (ME) y la piruvato deshidrogenasa, responsables de decarboxilar el malato a piruvato y luego a acetil-CoA respectivamente (Driscoll & Finan, 1993). La ME dependiente de NAD⁺ (DME) es esencial en simbiosis y se supone que la misma es activa en los bacteroides cuando existe un buen suministro de nutrientes desde la planta, en virtud de su menor afinidad por el malato en comparación con la ME dependiente de NADP⁺ (TME).

Síntesis de poli-β-hidroxi-butarato (PHB). Los primeros estudios de las inclusiones de PHB en nódulos de leguminosas datan de finales de la década de 1950 (Forsyth *et al.*, 1958). Este polímero constituye una excelente fuente de reserva de carbono debido a su alto estado reducido, a su estructura cristalina virtualmente insoluble y a que ejerce una presión osmótica casi despreciable dentro de las células (Dawes y Senior, 1973). La producción de PHB resulta de la relación entre la velocidad de síntesis y degradación, la cual depende de las condiciones de crecimiento.

Los rizobios que se establecen en nódulos determinados acumulan gran cantidad de PHB (hasta un 70% de contenido). Sin embargo, no se han visualizado inclusiones importantes de PHB en rizobios contenidos en nódulos indeterminados. *Sinorhizobium meliloti* se asocia con alfalfa estableciéndose en nódulos indeterminados sin contenido apreciable de PHB, pero es capaz de acumular hasta un 50% de su peso seco en condiciones de vida libre (Tombolini & Nuti, 1989). Además, es capaz de acumular PHB en el hilo de infección pero estas inclusiones desaparecen en el simbiosoma (Hirsch *et al.*, 1983). En el caso de *Rhizobium etli*, que se asocia a *P. vulgaris* estableciendo nódulos determinados, el PHB se acumula en los

bacteroides pero no en el hilo de infección (Cermola *et al.*, 2000).

Los mutantes en el gen *nifA* de *R. etli* acumulan muy poco PHB (Cermola *et al.*, 2000). La proteína NifA es un activador transcripcional de los genes que codifican para la nitrogenasa, por lo que esto indicaría que la acumulación de PHB en el nódulo estaría relacionada con el proceso de fijación de nitrógeno en este organismo.

De todos modos, no se ha logrado establecer los mecanismos que controlan la acumulación de PHB en los rizobios que se asocian formando nódulos indeterminados o determinados. Las diferencias en la capacidad de acumular PHB podrían derivarse de las diferentes condiciones internas que alterarían las actividades enzimáticas involucradas en la síntesis del polímero.

Importancia del PHB en los bacteroides. En el caso de los nódulos determinados, se ha propuesto que el PHB acumulado podría contribuir como desvío de los excesos de poder reductor y fuente de carbono de modo de mantener el ciclo de los ATCs activo en condiciones microaeróbicas. También se ha propuesto que el PHB podría suministrar energía y poder reductor cuando los derivados fotosintéticos aportados por la planta son limitados o, en último término, ser una vía competitiva con la FBN y no relacionada directamente. Existen diversas evidencias que apoyan o contradicen cada una de estas hipótesis.

La limitación del oxígeno promueve la acumulación de PHB en *R. etli*, sugiriendo que los bacteroides acumulan el polímero en respuesta a la limitación de este elemento (Encarnación *et al.*, 1995). En caso de que esta ruta sea esencial en el nódulo, los mutantes incapaces de acumular PHB deberían presentar un fenotipo de no fijación (Fix⁻) en simbiosis. Sin embargo, los mutantes en la enzima PHB sintasa (*phbC*) de *R. etli* fueron capaces de reducir el N₂ de forma más eficiente que la cepa salvaje, evidenciando una reordenación del flujo de carbono hacia, por ejemplo, la acumulación de glicógeno (Cevallos *et al.*, 1996). Este trabajo apoyaría así la tercer hipótesis.

Sin embargo, los mutantes *phbC* de *Azorhizobium caulinodans* fueron incapaces de fijar el N₂ en vida libre y en planta (Mandon *et al.*, 1998). En este caso, la ausencia de fijación de nitrógeno es debida a la no expresión de los genes involucrados en la síntesis de la nitrogenasa, no lográndose establecer aún la relación entre la síntesis de este complejo enzimático y la producción de PHB.

Las fluctuaciones en los niveles de PHB y nitrogenasa a lo largo del día y del desarrollo de la planta, relacionados posiblemente con el aporte de carbono por parte del hospedero (Romanov *et al.*, 1980) apoyan la hipótesis de que el PHB podría constituir una reserva de carbono y poder

reductor utilizable durante los períodos de limitación de nutrientes. En ese trabajo aumentó el contenido de polímero en bacteroides de *Rhizobium lupini* durante la noche y en la etapa de formación de las semillas, en donde la actividad nitrogenasa disminuyó (Romanov *et al.*, 1980).

Los mutantes incapaces de metabolizar el PHB son los organismos más apropiados para establecer la importancia de este polímero en el bacteroide. La presencia o ausencia del polímero en nódulos determinados o indeterminados parece ser dependiente de los flujos de carbono y estado redox del bacteroide y no sugiere en sí mismo que el polímero sea importante en algunos rizobios y no en otros.

MICROORGANISMOS DIAZÓTROFOS ENDÓFITOS

Dentro de este grupo de microorganismos se destaca *Herbaspirillum* sp. capaz de asociarse endofíticamente con una amplia gama de plantas, incluyendo caña de azúcar, palmeras, bananas, arroz, etc. La especie *H. seropedicae* ha recibido una especial atención, dado que algunas cepas son capaces de promover el crecimiento vegetal en determinadas variedades de arroz, y se considera que la FBN podría contribuir a este efecto (Baldani *et al.*, 2000; Elbeltagy *et al.*, 2001). *H. seropedicae* coloniza los espacios intercelulares, aerénquima y xilema de raíces y parte aérea de las plantas de arroz (James *et al.*, 2002). La bacteria ingresa a través de fisuras en el punto de emergencia de las raíces laterales.

Al inocular plantas de arroz de secano de la variedad Guaraní con 80 aislamientos distintos de *H. seropedicae*, cerca del 12% de las cepas promovieron un incremento del 100% de la biomasa vegetal comparado con el control sin inocular. Los aislamientos más eficientes fueron las cepas de *H. seropedicae* Z67 y Z94, aisladas del interior de raíces de arroz (Baldani *et al.*, 2000).

Se dispone de poca información sobre las funciones que participan en la colonización interna de la planta hospedero y la FBN *in planta*. Estas bacterias han sido estudiadas en lo que refiere a los sistemas genéticos involucrados en la FBN, y de forma parcial, en su metabolismo carbonado.

Los microorganismos diazótrofos endófitos de plantas establecen asociaciones con características diferentes a las descritas en la asociación rizobio-leguminosa: a) la ausencia de simbiosomas sugiere que los sustratos que estas bacterias pueden consumir no están definidos ni controlados por la planta de manera tan estricta como en los bacteroides; b) al igual que en los diazótrofos libres, los mecanismos para el control de la concentración de O₂ son

específicos y la fijación de N_2 no está desacoplada con la asimilación de nitrógeno; c) a diferencia de rizobio, el nitrógeno reducido parecería ser directamente consumido por el microorganismo, o por lo menos en su mayor proporción; d) los estudios *in vivo* suelen ser más complicados que en el caso de rizobio, en virtud de la presencia de diversas poblaciones de microorganismos endófitos en un mismo hospedero.

H. seropedicae es capaz de crecer en presencia de diversos carbohidratos y ácidos orgánicos. Se presume que la bacteria es capaz de consumir un espectro de diversas fuentes carbonadas dentro de la planta. Los mutantes incapaces de utilizar determinadas fuentes de carbono posiblemente retienen una cierta capacidad de reducir el N_2 *in planta*.

Los estudios *in vivo* e *in vitro* de la función y estructura de NifA, indicaron que este activador responde a los niveles de amonio y O_2 del medio (Souza *et al.*, 1999). La proteína PII participaría en el control por nitrógeno de NifA y Fnr en el control por O_2 (Monteiro *et al.*, 2003). Uno de los temas de particular relevancia ha sido la modificación de los organismos diazotrofos, de modo que se excrete el amonio reducido por alteración de sus vías de asimilación como, por ejemplo, la GS y que no se inhiba la fijación de nitrógeno en presencia de amonio en el medio.

El metabolismo carbonado en condiciones de fijación ha sido poco estudiado. Estos organismos son capaces de sintetizar PHB en presencia de un exceso de fuente de carbono como la glucosa y por limitación de otro nutriente esencial como, por ejemplo, el nitrógeno. En nuestro laboratorio construimos un mutante *phbC* de *H. seropedicae* Z67. Este clon exhibió, en condiciones de vida libre, un comportamiento similar al mutante *phbC* de *Azospirillum brasilense* previamente descrito por Kadouri *et al.* (2003). Comparado con la cepa salvaje, el mutante presentó mayor sensibilidad a condiciones estresantes incluyendo desecación, hiperosmolaridad, estrés oxidativo en presencia de peróxido de hidrógeno y metil viológeno. Sin embargo, aún no se ha establecido la importancia fisiológica que posee el PHB en condiciones de fijación de nitrógeno *in vitro* e *in vivo*.

Los sistemas planta-endófito diazotrofo definen una amplia área de investigación a desarrollar tanto en lo que refiere a la identificación de asociaciones eficientes en fijación de N_2 , como a los aspectos fisiológicos de las mismas. La selección y estudio de un sistema modelo en particular, contribuirá a identificar las funciones que participan en la colonización interna de la planta y en la reducción del nitrógeno atmosférico.

BIBLIOGRAFÍA

- BALDANI, J. I. & BALDANI, V. L. D. 2005. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *An. Acad. Bras. Cienc.* 77: 549-579.
- BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R. & DÖBEREINER, J. 1997. Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil. Biol. Biochem.* 29: 911-922.
- BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. & DÖBEREINER, J. 2000. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotroph *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. *Biol. Fertil. Soils.* 30: 485-489.
- BARRAQUIO, W. L.; REVILLA, L. & LADHA, J. K. 1997. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. *Plant Soil* 194: 15-24.
- BERGERSEN, F. J. & TURNER, G. L. 1975. Leghemoglobin and the supply of O_2 to nitrogen fixing root nodule bacteroids: presence of two oxidase systems and ATP production at low free O_2 concentrations. *J. Gen. Microbiol.* 91:345-354.
- CERMOLA, M.; FEDOROVA, E.; TATE, R.; RICCIO, A., FAVRE, R. & PATRIARCA, E. J. 2000. Nodule invasion and symbiosome differentiation during *Rhizobium etli-Phaseolus vulgaris* symbiosis. *Mol. Plant-Microbe Interact* 13: 733-741.
- CEVALLOS, M. A.; ENCARNACIÓN, S.; LEIJA, A.; MORA, Y. & MORA, J. 1996. Genetic and physiological characterization of a *Rhizobium etli* mutant strain unable to synthesize poly-beta-hydroxybutyrate. *J. Bacteriol.* 178: 1646-1654.
- CRAIG, J.; BARRATT, P.; TATGE, H.; DEJARDIN, A.; HANDLEY, L.; GARDNER, C. D., BARBER, L.; WANG, T.; HEDLEY, C.; MARTIN, C. & SMITH, A. M. 1999. Mutations at the *rug4* locus alter the carbon and nitrogen metabolism of pea plants through an effect on sucrose synthase. *Plant J.* 17: 353-362.
- DAWES, E. A. & SENIOR, P. J. 1973. The role and regulation of energy reserve polymers in micro-organisms. *Adv. Microb. Physiol.* 10: 135
- DAY, D. A. & COPELAND, L. 1991. Carbon metabolism and compartmentation in nitrogen fixing legume nodules. *Plant Physiol. Biochem.* 29: 185-201.
- DRISCOLL, B. T. & FINAN, T. M. 1993. NAD^+ -dependent malic enzyme of *Rhizobium meliloti* is required for symbiotic nitrogen fixation. *Mol. Microbiol.* 7: 865-873.

- ELBELTAGY, A.; NISHIOKA, K.; SATO, T.; SUZUKI, H.; YE, B.; HAMADA, T.; ISAWA, T.; MITSUI, H. & MINAMISAWA, K. 2001. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *App. Environ. Microbiol.* 67: 5285-5293.
- ENCARNACIÓN, S.; DUNN, M.; WILLMS, K. & MORA, J. 1995. Fermentative and aerobic metabolism in *Rhizobium etli*. *J. Bacteriol.* 177: 3058-3066.
- FINAN, T. M.; WOOD, J. M. & JORDAN, D. C. 1983. Symbiotic properties of C₄-dicarboxylic acid transport mutants of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Bacteriol.* 154: 1403-1413.
- FORSYTH, W. G. C.; HAYWARD, A. C. & ROBERTS, I. B. 1958. The occurrence of poly- β -hydroxybutyrate in Gram-negative bacteria. *Nature* 182: 800-801.
- HIRSCH, A. M.; BANG, M. & AUSUBEL, F. M. 1983. Ultrastructural analysis of ineffective alfalfa nodules formed by *nif*::Tn5 mutants of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 155: 367-380.
- HUNT, S. & LAYZELL, D. B. 1993. Gas exchange of legume nodules and the regulation of nitrogenase activity. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 44: 483-511.
- JAMES, E. K.; GYANESHWAR, P.; MATHAN, N.; BARRAQUIO, W. L.; REDDY, P. M.; IANNETTA, P.; OLIVARES, F. L. & LADHA, J. K. 2002. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15: 894-906.
- KADOURI, D.; JURKEVITCH, E. & OKON, Y. 2003. Involvement of the reserve material poly-beta-hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* stress endurance and root colonization. *Appl Environ Microbiol.* 69: 3244-3250.
- KLOPPER, J. W.; SCHOONERS, B. & BAKER, P. A. H. M. 1992. Proposed elimination of the term *Endorhizosphere*. *Phytopathology* 82: 726-727.
- MANDON, K.; MICHELREYDELLET, N.; ENCARNACION, S.; KAMINSKI, P. A.; LEIJA, A.; CEVALLOS, M. A.; ELMERICH, C. & MORA, J. 1998. Poly- β -hydroxybutyrate turnover in *Azorhizobium caulinodans* is required for growth and affects *nifA* expression. *J. Bacteriol.* 180: 5070-5076.
- McDERMOTT, T. R.; GRIFFITH, S. M.; VANCE, C. P. & GRAHAM, P. H. 1989. Carbon metabolism in *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids. *FEMS Microbiol. Lett.* 63: 327-340.
- MICHIELS, J. & VANDERLEYDEN, J. 1994. Molecular basis of the establishment and functioning of a N₂-fixing root nodule. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10: 612-630.
- MONTEIRO, R. A.; DE SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O. & CHUBATSU, L. S. 2003. Fnr Is Involved in Oxygen Control of *Herbaspirillum seropedicae* N-Truncated NifA Protein Activity in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 69: 1527-1531.
- PATRIARCA, E. J.; TATÈ, R. & IACCARINO, M. 2002. Key role of bacterial NH₄⁺ metabolism in *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66: 203-222.
- REIBACH, P. H. & STREETER, J. G. 1983. Metabolism of ¹⁴C-labeled photosynthate and distribution of enzymes of glucose metabolism in soybean nodules. *Plant Physiol.* 72: 634-640.
- ROMANOV, V. I.; FEDULOVA, N. G.; TCHERMENSKAYA, I. E.; SHRAMKO, V. I.; MOLCHANOV, M. I. & KRETOVICH, W. L. 1980. Metabolism of poly- β -hydroxybutyric acid in bacteroids of *Rhizobium lupini* in connection with nitrogen fixation and photosynthesis. *Plant Soil* 56: 379-390.
- RONSON, C. W.; LYTTLETON, P. & ROBERTSON, J. G. 1981. C₄-dicarboxylate transport mutants of *Rhizobium trifolii* form ineffective nodules on *Trifolium repens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 4284-4288.
- SALMINEN, S. O. & STREETER, J. G. 1990. Factors contributing to the accumulation of glutamate in *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids under microaerobic conditions. *J. Gen. Microbiol.* 136: 2119-2126.
- SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; DRUMMOND, M.; RIGO, L. U. & YATES, M. G. 1999. Control of *Herbaspirillum seropedicae* NifA activity by ammonium ions and oxygen. *J. Bacteriol.* 181: 681-684.
- STREETER, J. G. 1987. Carbohydrate, organic acid, and amino acid composition of bacteroids and cytosol from soybean nodules. *Plant Physiol.* 85: 768-773.
- STREETER, J. G. 1991. Transport and metabolism of carbon and nitrogen in legume nodules. *Adv. in Botan. Res.* 18: 129-183.
- TOMBOLINI, R. & NUTI, M. P. 1989. Poly(β -hydroxyalkanoate) biosynthesis and accumulation by different *Rhizobium* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 60: 299-304.
- UDVARDI, M. K.; LISTER, D. L. & DAY, D. A. 1991. ATPase activity and anion transport across the peribacteroid membrane of isolated soybean symbiosomes. *Arch. Microbiol.* 156: 362-366.
- WATERS, J. K.; HUGHES, B. L.; PURCELL, L. C.; GERHARDT, K. O.; MAWHINNEY, T. P. & EMERICH, D. W. 1998. Alanine, not ammonia, is excreted from N₂ fixing soybean nodule bacteroids. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 12038-12042.