

EVALUACIÓN DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y MORFOGENÉTICOS EN LA SIMBIOSIS *Azolla filiculoides* – *Anabaena azollae* COMO RESPUESTA A LA INTERACCIÓN DE LA CALIDAD DE LUZ Y DOS NIVELES DE NITRÓGENO

Javier Mosquera Lenti¹ y Abelardo Calderón Rodríguez²

Resumen

En el presente trabajo experimental se evaluó el efecto producido por la interacción de tres calidades de luz (roja, blanca y azul) con dos niveles de nitrógeno (IRRI +N e IRRI -N) en la simbiosis *Azolla filiculoides* – *Anabaena azollae*, mediante el análisis de diversos parámetros como: la tasa de crecimiento, el contenido de clorofila, proteína y prolina, la actividad de las enzimas nitrato reductasa y nitrogenasa, así como la cantidad de células vegetativas y heterocistos presentes en cada tratamiento. Los resultados indicaron que las plantas crecidas en el medio sin nitrógeno presentaron una mayor tasa de crecimiento, así como una mayor cantidad del endosimbionte *Anabaena azollae* Strass. con relación a las plantas crecidas en el medio con nitrógeno, independientemente de la cantidad de luz. A su vez, las plantas crecidas en el medio IRRI con nitrógeno (IRRI +N) presentaron un mayor contenido de clorofila así como de prolina con relación a las plantas crecidas en el medio IRRI sin nitrógeno (IRRI -N). En cuanto a la cantidad de proteína, las plantas iluminadas con luz azul, mostraron contenidos significativamente mayores que aquellas crecidas bajo luz blanca y roja.

Palabras clave: *Azolla*, *Anabaena*, Simbionte, Fijación de Nitrógeno, prolina.

Abstract

The objective of the present study was to investigate the interaction between three light qualities (red, white and blue) and two nitrogen levels (IRRI +N and IRRI -N) on the symbiosis *Azolla filiculoides* – *Anabaena azollae* through the evaluation of parameters such as: Growth rate of vegetative cells and heterocysts, chlorophyll, protein and proline contents and the nitrogenase and nitrate reductase activities. The results show that the plants grown on IRRI -N medium had the greater rate of growth, and the best development of the endosymbiont *Anabaena azollae* Strass with relation the ones grown on IRRI +N medium, in all the light levels. On the other hand, the plants grown on IRRI +N medium show the greater content of chlorophylls, and proline in contrast with the plants grown on IRRI -N medium. With respect to the protein content, we found that the blue light has a positive effect, than those grown under white and red light, elevating the concentration in the plants Nitrogenase and nitrate reductase activities.

Keywords: *Azolla*, *Anabaena*, Symbiont, Nitrogen Fixation, proline.

Introducción

La *Azolla filiculoides* Lam (Figura 1) es un pequeño helecho acuático flotante que vive en muchos espejos de agua dulce y en áreas tropicales y es capaz de fijar nitrógeno atmosférico debido a la simbiosis que mantiene con la cianobacteria *Anabaena azollae* Stras (Figura 2) que habita en unas grandes cavidades en el lóbulo superior de la fronda de *Azolla*.

La fijación del nitrógeno se debe a la actividad de la enzima nitrogenasa en la cianobacteria. Esta enzima se encuentra presente en células especializadas denominados heterocistos, los cuales convierten en Nitrógeno molecular del aire en amoníaco, que posteriormente es incorporado en los compuestos nitrogenados tanto por la planta como por la

cianobacteria. El simbionte de la cavidad foliar tiene de 15 a 20 por ciento de heterocistos comparado con las especies de *Anabaena* de vida libre que solo tiene un 5 por ciento de ellos.

En cuanto al hospedero *Azolla*, este contiene los pigmentos fotosintéticos clorofila a, clorofila b y carotenoides asociados a los cloroplastos; mientras que los filamentos de *Anabaena* presentan clorofila a, ficobiliproteínas y carotenoides. Esta suma de pigmentos fotosintéticos principales y accesorios permite al organismo simbiótico ampliar el rango de utilización de la energía luminosa aprovechable. Es probable que esta característica sea la responsable del crecimiento rápido y la gran acumulación de biomasa en períodos cortos.

¹Biólogo, asistente de Investigación del Laboratorio de Fisiología Vegetal- UNALM.

²Biólogo, M. Sc. Profesor Principal de Fisiología Vegetal Departamento de Biología UNALM.

La *Azolla*, puede duplicarse aproximadamente cada 5 días bajo condiciones favorables.

Por otro lado, el incremento desmedido de la población mundial y la escasez mas frecuente de combustibles fósiles para fabricar fertilizantes nitrogenados hacen necesario voltear nuestra mirada hacia estas alternativas biológicas de bajo costo y nada contaminantes. La *Azolla* es el abono verde que más eficientemente se usa en el cultivo del arroz y puede ser trasladado aún a otros cultivos y por ello es necesario investigar varios aspectos en los strains disponibles en nuestro país.

Revisión de literatura

Las simbiosis entre cianobacterias y plantas ocurre en un amplio segmento del reino Plantae, incluyendo algunas Briofitas (como Anthoceros, Blasia, Cavicularia), una Pteridofita (*Azolla*), Gimnospermas (9 géneros de Cycas, Zamia, Macrozamia y Encefalartos) y una Angiosperma (Gunnera de la familia Halagoraceae) (Peters & Calvert, 1983; Reddy & Fisher, 1988)

Todas las especies conocidas de *Azolla* contienen a la cianobacteria *Anabaena azollae* Strass; y están clasificadas sobre la base de sus estructuras reproductivas y vegetativas (Alves, 1985; Becking 1978; Fay, 1973; Neidhardt *et al.*, 1990)

Este helecho acuático, es considerado actualmente como un abono verde entre otros países como Filipinas, China, India, Vietnam, Tailandia e Indonesia (Ali & Malik, 1983; Alves, 1985; Peters & Calvert, 1983; Tovar, 1993); sin embargo en nuestro país poco o nada se ha hecho para incorporarla en las prácticas agrícolas, mas aún tomando en cuenta el creciente costo de los fertilizantes nitrogenados y la necesidad de aplicar una agricultura orgánica.

La asociación *Azolla-Anabaena* es literalmente una fábrica viva flotante de compuestos nitrogenados, que usa la energía de la fotosíntesis para fijar el nitrógeno atmosférico. La asociación puede fijar entre 100 a 150 Kg. de N₂ atmosférico por hectárea por año en aproximadamente 40-60 toneladas de biomasa. La fijación del nitrógeno ocurre tanto de noche como de día, pero la tasa es más baja en la oscuridad. Sobre la base del peso seco contiene aproximadamente 23.8 % de proteína cruda, 4.4% de grasas 6,4% de almidón y 9.5% de fibra (Becking, 1978; Peters & Calvert, 1983; Reddy & Ficsher, 1988).

La presencia de nitrógeno como fertilizante, en cualquier calidad de luz o la interacción entre ambos deprime el crecimiento de *Azolla* y ello nos lleva a pensar que esta debe ser una condición estresante para *Anabaena*, por ello que utilizamos a la prolina como un indicador de stress. La síntesis de proteínas tanto estructurales como enzimáticas (Bates, 1973; Katiyar, 1996, Moses & Chua, 1988; Yatazawa *et al.*, 1980) y el número de células vegetativas y heterocistos también se verán afectados en cierta medida si las

condiciones no son las óptimas como ocurre en otras especies (Calderón, 1988; Franco *et al.*, 1979, Grossman *et al.*, 1993; La Rue & Kuez, 1973; Zavaleta, 1992).

Materiales y métodos

El presente estudio se realizó en el laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Las plantas de *Azolla* fueron recolectadas en los pantanos de Villa y se aclimataron y multiplicaron vegetativamente durante un mes en agua fangosa.

Luego de pasar por este período de adaptación fueron trasladados a los medios de cultivos IRRI +N e IRRI -N (Tabla 1), en contenedores plásticos de 500 ml cada uno y a su vez, cada nivel de nitrógeno fue colocado bajo las diferentes calidades de luz (roja, azul y blanca) (Figura 3). El fotoperíodo fue de 12 horas de luz y 12 de oscuridad a temperaturas entre 23°C y 25°C.

TABLA 1. (International Rice Research Institute)

Medio IRRI +N		Medio IRRI -N	
Macronutrientes	(g / litro)	Macronutrientes	(g / litro)
NH ₄ NO ₃	1.650
CaCl ₂	0.333	CaCl ₂	0.333
MgSO ₄ 6H ₂ O	0.492	MgSO ₄ 6H ₂ O	0.492
K ₂ SO ₄	0.274	K ₂ SO ₄	0.274
NaH ₂ PO ₄	0.120	NaH ₂ PO ₄	0.120
Micronutrientes	(mg / litro)	Micronutrientes	(mg / litro)
Fe	0.2	Fe	0.2
Mn	0.1	Mn	0.1
Zn	0.012	Zn	0.012
Cu	0.005	Cu	0.005
Mo	0.005	Mo	0.005
B	0.635	B	0.635

Los parámetros evaluados para cada nivel de nitrógeno y calidad de luz fueron los siguientes:

Tasa de crecimiento en términos de peso fresco y de área foliar. Cantidad de células vegetativas y heterocistos, el cual se hizo por conteo de células al microscopio en un número determinado de campos visuales.

Se determinó el contenido de clorofila a, b y total siguiendo el método de De Motts y Wintermans (Calderón, 1998).

Se determinó el contenido de proteínas totales mediante el método de Biuret (Zabaleta, 1992). Se

evaluó la prolina siguiendo el método propuesto por Bates.

Se determinó la actividad de las enzimas Nitrato Reductasa y Nitrogenasa por el método de Neyra-Hageman y la Rue-Kurs respectivamente.

El diseño experimental se ajustó a un experimento factorial de 2 x 3 (3) dentro de un diseño completamente al azar (DCA). La bondad de los tratamientos se probó con un análisis de variancia y las comparaciones mediante pruebas de Duncan.

Finalmente para relacionar los diversos parámetros se empleó la correlación de variables.

Resultados y discusión

Los resultados corresponden a un promedio de dos evaluaciones en momentos diferentes y se muestran en la Tabla 2.

Estos resultados indicaron una mayor tasa de crecimiento (tanto en peso como en área foliar) en las plantas crecidas en el medio IRRI -N con un promedio de 0.092 día⁻¹, mientras que aquellas crecidas en el medio IRRI +N mostraron un promedio de 0.027 día⁻¹. Esta diferencia de alrededor del 340.7%, significó que mientras *Azolla* podía duplicar su masa en 7.54 días en el medio IRRI-N, en el medio IRRI +N requirió de 25.2 días.

A su vez, el contenido de células vegetativas y heterocistos fue mucho mayor en las plantas crecidas en el medio sin nitrógeno con un promedio de 29.16 mientras que aquellas crecidas en el medio IRRI +N tuvieron un promedio de 10.44. Estas diferencias podrían deberse al tiempo de contacto de la planta con los iones NO₃⁻ y NH₄⁺ que podrían haberla intoxicado al no poder esta obtener las cadenas carbonadas necesarias para su óptima conversión en proteínas u otros compuestos. Estos resultados concuerdan con las observaciones de varios autores como Talley y Grilli, en lo concerniente a la disminución del crecimiento en las cianobacterias simbióticas, como respuesta a la incorporación de fuentes nitrogenadas en el medio de cultivo, lo cual trae como consecuencia la síntesis de sustancias efectoras en la planta que actúan sobre la cianobacteria, impidiendo la síntesis de ciertas enzimas necesarias para la formación e incorporación de aminoácidos esenciales para su crecimiento. Los contenidos de clorofila a, b y totales fueron mayores en las plantas crecidas en el medio IRRI +N con todas las calidades de luz con un promedio de 0.085 mg/g PF mientras que las plantas tratadas con el medio IRRI-N presentaron en promedio 0.049 mg/g PF. El nitrógeno es un elemento estructural de las clorofilas y al estar disponible en la forma inorgánica (NO₃⁻, NH₄⁺) en el medio, puede pasar fácilmente a formar parte de las moléculas fotosintéticas, mientras que el Nitrógeno fijado por los simbioses mayormente se ubica en moléculas orgánicas y un menor porcentaje se incorpora en las clorofilas de hospedero y simbiote (Fay, 1973; Peters & Calvert, 1983). Con

respecto al contenido de proteínas totales, las plantas crecidas bajo la luz azul tuvieron un promedio de ambos niveles de nitrógeno 45.47 mg/g, mientras que las crecidas bajo el efecto de la luz blanca y la luz roja tuvieron promedios de 26.08 mg/g y 29.68 mg/g respectivamente. De esta observación podemos decir que los porcentajes de proteínas totales en *Azolla* crecida bajo luz azul en ambos niveles de nitrógeno con relación a los tratamientos de luz blanca y roja fueron mayores en un 74.34% y 53.20% respectivamente.

Estos resultados corroboran los datos de Alves (1985) en lo referente a la proteína total en condiciones de campo (luz natural) que está entre 23 y 26% evaluado por el método de Kjeldhal. Para las otras calidades de luz no existen datos comparativos, sin embargo de lo observado en otras plantas por varios autores, como Odum, Salisbury, Nichiporovitch citado por Calderón (1988) la producción de proteínas se estimula con la luz azul, sugiriéndose una activación de las enzimas ligadas a la flavina al absorberse la luz azul por medio de factores flavínicos de color amarillo activándose entonces la síntesis de ciertos aminoácidos. Se ha encontrado también que en las zonas altoandinas, en donde la proporción de radiación ultravioleta es mayor en relación a la costa, las 10 variedades de papa estudiadas presentan un mayor contenido proteico Calderón (1988).

Los contenidos de prolina indicaron una mayor concentración en las plantas crecidas en el medio IRRI+N que aquellas crecidas en el medio IRRI-N con valores de 1.87 mg/g y 0.97 mg/g respectivamente. Estos valores sugieren un cierto grado de estrés, que a su vez coinciden con las observaciones cualitativas y cuantitativas hechas en las plantas crecidas en el medio con NO₃⁻NH₄⁺, los cuales tuvieron tasas bajas de crecimiento y debilidad de las frondas. La prolina en niveles altos es un indicador de stress (Bates, 1973).

Con relación a las actividades de las enzimas Nitrogenasa y Nitrato reductasa, no se mostraron diferencias significativas en los diversos tratamientos, sin embargo, se observó cierta tendencia hacia una mayor actividad Nitrogenasa en las plantas crecidas sin Nitrógeno, a su vez una mayor actividad Nitrato Reductasa en aquellas plantas crecidas con suplemento nitrogenado. Lo observado tiene concordancia con los resultados de Zavaleta (1993) el sentido de que el sustrato induce la síntesis y la actividad de la Nitrato Reductasa. y a la vez la carencia de Nitrógeno en el sustrato, capacita a los simbioses a fijar la proporción de Nitrógeno para cubrir las necesidades. Por otro lado, dado que la luz azul y la luz roja tienen el mismo efecto en la fotosíntesis, entonces la provisión de energía para la fijación y de ferredoxina para la reducción tiende a ser la misma, quedando la pequeña diferencia solo debido

al efecto del nitrógeno en el sustrato (La Rue & Kuez, 1973; Moses & Chua, 1988).

Conclusiones

Las tasas de crecimiento relacionadas al peso fresco como al área foliar y la cantidad de células vegetativas y heterocistos mostraron valores promedio significativamente mayores en las plantas crecidas en el medio IRRI-N.

Los contenidos de clorofila a, b y totales, así como la prolina presentaron valores promedio significativamente mayores en las plantas crecidas en el medio IRRI +N.

En cuanto al contenido de proteínas, las plantas crecidas bajo luz azul presentaron contenidos promedio significativamente mayores que aquellas crecidas bajo luz roja y blanca respectivamente.

Finalmente podemos decir que la ausencia de Nitrógeno en el medio del cultivo influye de modo significativo en el crecimiento de la planta y de su endosimbionte, aunque las plántulas se vean de un tono más amarillento (no clorótico) por la menor síntesis de clorofilas.

Literatura citada

- Ali S. & Malik K.A. 1983. Use of Azolla in Pakistan. Nuclear Institute for Agriculture and Biology. Current Science (Faisalabad, Pakistan). :179-185.
- Alves M. 1985. *Azolla – Anabaena azollae*. Ministerio de Educación – Faculdade de Ciências Agrarias do Pará. Brasil.
- Bates L. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*. 39: 205 – 207.
- Becking J.H. 1978. Ecology and physiological adaptation of *Anabaena* in the *Azolla – Anabaena azollae* symbiosis. *Ecological Bulletins (Granhall. Stockholm)*. 26: 266 - 281
- Calderón R.A. 1988. Efectos de dos microclimas contrastantes en la composición Bioquímica de los tubérculos de diez genotipos de papa. Tesis para optar el título de Biólogo. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima – Perú.
- Drevon J. 1993. Evaluación de la actividad nitrogenásica de los nódulos de las leguminosas mediante la actividad reductora del acetileno. FAO/ GRET. I- BIOL 5 (Roma):. 1 – 5.
- Fay P. 1973. The Heterocysts: The Biology of Blue Green Algae. Carre and Whitton (eds). University of California. : 239 – 259
- Fay P. 1992. Oxygen Relations of Nitrogen Fixation in Cyanobacteria. *Microbiological Reviews*. 56 (2): 340 – 373.
- Franco A.A., Pereira J.C. & Neyra C.A. 1979. Seasonal patterns of nitrate reductase and nitrogenase activities in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiology*. 63: 421 – 424.
- Grossman A.R., Schaefer M.R., Chiang G.G. & Collier J.L. 1993. The Phycobilisome, a Light – Harvesting Complex Responsive to Environmental Condition. *Microbiological Reviews*. 157 (3): 725 –749.
- Gornall A.G., Bardawill C.S. & David M. 1949. Determination of Proteins by Biuret. *Journal. Biol. Chem* 1.77: 751 – 753.
- Katiyar V. 1996. Determination of Proteins by the Technique of Biuret. *Biochemistry Laboratory Manual IAU. Dept. of Chemistry*.
- La Rue T.A. & Kuez W.G. 1973. Estimation of nitrogenase using a colorimetric determination for ethylene. *Plant Physiology*. 51: 1074 – 1075.
- Moses P.B. & Chua N.H. 1988. Light switches for plant genes. *Scientific American* 258 (4): 88 – 93.
- Neidhardt C.F., Ingraham J.L., y Schaechter M. 1990. *Physiology of the Bacterial Cell*. Sinauer Associates. I.N.C. (Massachusetts E.U.). : 448 – 451.
- Paniagua J. y Sasson A. 1995. Moléculas de Microalgas de Importancia Económica. Manual de Métodos Ficológicos. Universidad de Concepción – Chile.
- Peters G.A. & Calvert H.E. 1983. The *azolla – Anabaena azollae* Symbiosis. In *Algal Symbiosis (New York, Cambridge)*: 109 –145. University Press.
- Reddy P.M. & Fisher R.W. 1988. A noble method to produce *Anabaena – free Azolla* by in vitro fertilization of micromanipulated megasporocarps. *Plant Cell Reports*. 7: 430 – 433.
- Tovar D.T. 1993. Capacidad de Fijación de Nitrógeno de los Ficobiontes aislados de líquenes del género *Leptogium* S.Gray. *Revista de Química (Lima – Perú)*. 7(2): 137 –154.
- Yatazawa M., Tomomatzu N., Hosoda N. & Nunone K. 1980. Nitrogen Fixation in *Azolla – Anabaena* symbiosis as affected by mineral nutrient status. *Soil Science and Plant Nutrition* 26: 415 – 426.
- Zavaleta A.J. 1992. Evaluación del efecto de la fertilización nitrogenada sobre la actividad de la Nitrogenasa y la Nitrato Reductasa en *Phaseolus vulgaris* L.var. canario corriente. Tesis para optar el título de Ingeniero Agrónomo Universidad Nacional Agraria La Molina Lima Perú.

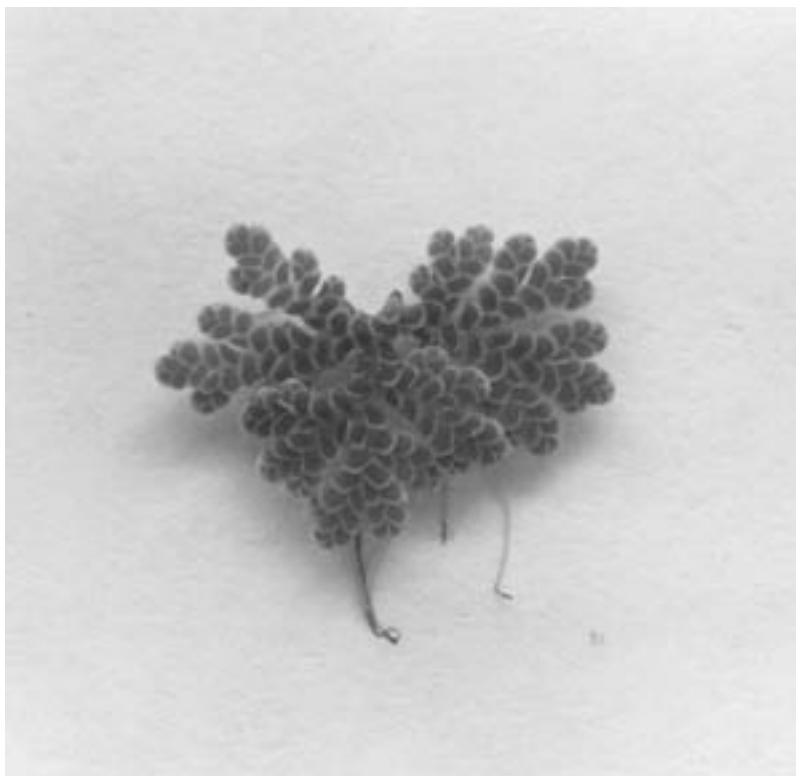


Figura 1. *Azolla filiculoides* Lam, pequeño helecho acuático flotante que vive en muchos espejos de agua dulce y en áreas tropicales y es capaz de fijar nitrógeno atmosférico debido a la simbiosis que mantiene con la cianobacteria *Anabaena azollae* Stras.

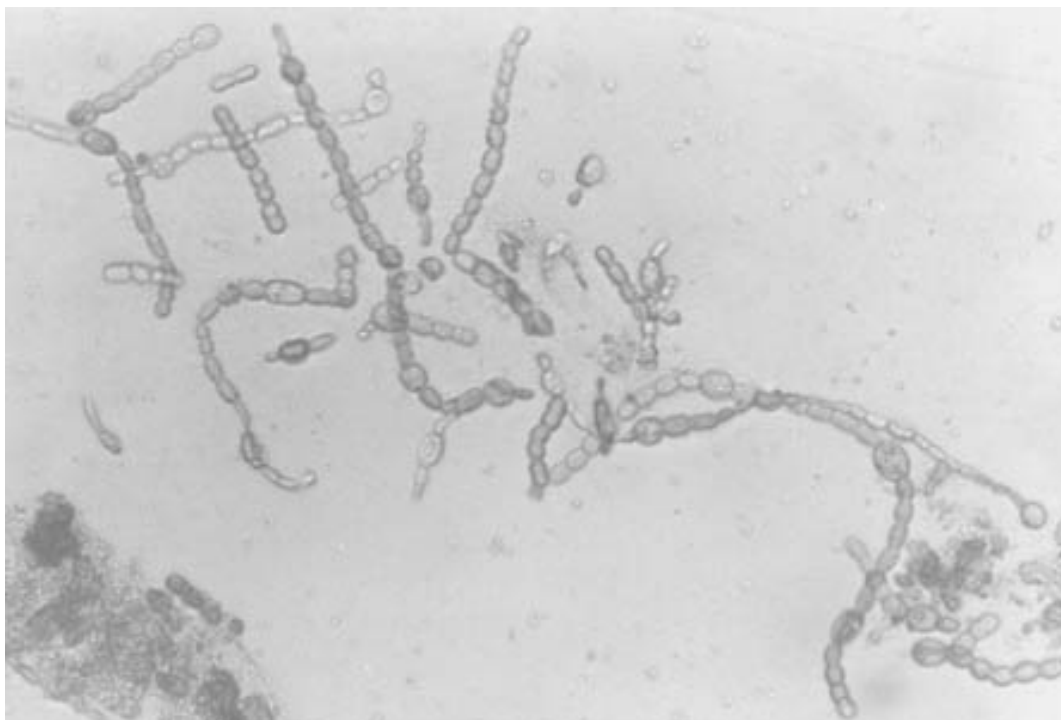


Figura 2. *Anabaena azollae* Stras, habita en unas grandes cavidades en el lóbulo superior de la fronda de *Azolla*.

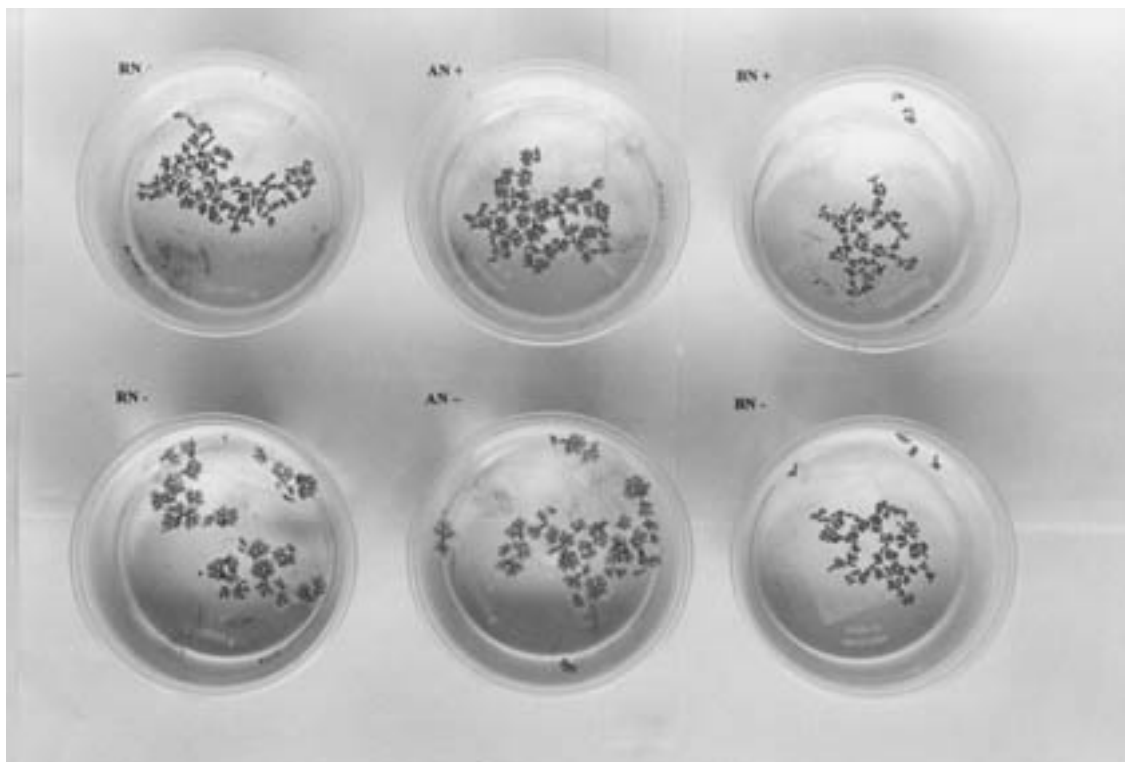


Figura 3. Contenedores plásticos de 500 ml, cada nivel de nitrógeno fue colocado bajo las diferentes calidades de luz (roja, azul y blanca). El fotoperíodo fue de 12 horas de luz y 12 de oscuridad.

Tabla 2. Parámetros bioquímicos evaluados.

LUZ AZUL, LUZ ROJA, LUZ BLANCA.	IRRI -N	IRRI + N
Tasa de crecimiento por día	0.092	0.027
Cantidad total de heterocistos y células vegetativas (promedio)	29.16	10.44
Clorofilas a, b y totales (promedio)	0.049	0.085
Contenido de prolina mg/g	0.97	1.87
Nitrato reductasa. μ moles NO_3^- /hora/g PF	0.174	0.273
Nitrogenasa. μ moles acetileno reducido/g PF/hora	26.765	35.348
Proteína mg/g	Luz azul	45.47
	Luz roja	26.08