

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Bacterias fijadoras de nitrógeno en nódulos del género *Inga* en
la Amazonía ecuatoriana, y su rol en la promoción del
crecimiento vegetal**

Danny Patricio Jiménez Hurtado

Biología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Biólogo

Quito, 16 de mayo de 2024

Universidad San Francisco de Quito USFQ
Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Bacterias fijadoras de nitrógeno en nódulos del género *Inga* en la
Amazonía ecuatoriana, y su rol en la promoción del crecimiento
vegetal**

DANNY PATRICIO JIMÉNEZ HURTADO

Director:
Pieter Marinus Johannes Van 't Hof, PhD

Quito, 16 de mayo de 2024

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Danny Patricio Jiménez Hurtado

Código: 209699

Cédula de identidad: 050343924-2

Lugar y fecha: Quito, 16 de mayo de 2024

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

Esta investigación examina la diversidad bacteriana de nódulos radiculares como estructura de la relación simbiótica entre bacterias y las especies *Inga leiocalycina* e *Inga edulis* en los ecosistemas de Várzea y Terra Firme de la Amazonía ecuatoriana. Mediante técnicas de secuenciación de nueva generación y análisis bioinformáticos, se identificaron diferencias significativas en la composición de las comunidades bacterianas fijadoras de nitrógeno entre ambos ecosistemas, con el género *Bradyrhizobium* predominando en ambas localidades. Además, se realizaron bioensayos bajo condiciones controladas en invernadero utilizando inóculos bacterianos aislados de estos nódulos para evaluar su impacto en el crecimiento y la nodulación de plántulas de frijol, revelando que dos cepas mejoraron significativamente el desarrollo de las plántulas. Como parte del estudio, se realizó un experimento in situ de intercambio de plántulas de *Inga* entre los ecosistemas de Várzea y Terra Firme dentro de la estación de biodiversidad Tiputini. Durante la salida, se recolectaron meticulosamente los nódulos y se tomaron medidas detalladas de cada plántula, incluyendo altura, diámetro del tallo, y número de hojas y folíolos, entre otros. Los nódulos fueron conservados en tubos con perlas de silicagel y almacenados en refrigeración hasta su análisis posterior.

Palabras clave: Amazonia ecuatoriana, nódulos radiculares, genus *Inga*, bacterias fijadoras de nitrógeno, bioensayos funcionales, Fabaceae, agricultura sostenible.

ABSTRACT

This research examines the microbial diversity in the root nodules as a structure of the symbiotic relationship between nitrogen-fixing bacteria and species *Inga leiocalycina* and *Inga edulis* in the Várzea and Terra Firme ecosystems of the Ecuadorian Amazon. Using next-generation sequencing techniques and bioinformatics analysis, significant differences were identified in the composition of nitrogen-fixing bacterial communities between both ecosystems, with the genus *Bradyrhizobium* predominating in both locations. Furthermore, bioassays using bacterial inoculates isolated from these nodules were conducted to assess their impact on the growth and nodulation of bean seedlings, revealing that two strains significantly enhanced the development of the seedlings. As part of the study, an in-situ experiment involving the exchange of *Inga* seedlings between the Várzea and Terra Firme ecosystems was conducted at the Tiputini Biodiversity Station (EBT). During the fieldwork, nodules were carefully collected and detailed measurements of each seedling were taken, including height, stem diameter, and the number of leaves and leaflets, among others. The nodules were preserved in tubes with silica gel and stored under refrigeration until further analysis.

Key words: Ecuadorian Amazon, root nodules, genus *Inga*, nitrogen-fixing bacteria, functional bioassays, Fabaceae, sustainable agriculture.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 ANTECEDENTES	10
1.2 JUSTIFICACIÓN	11
1.3 HIPÓTESIS.....	11
1.4 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	12
1.5 MARCO TEÓRICO	12
1.6 OBJETIVOS.....	15
<i>Objetivo general</i>	15
<i>Objetivos específicos</i>	15
2 METODOLOGÍA	15
2.1 ÁREA DE ESTUDIO.....	15
2.2 MUESTREO EN CAMPO.....	16
2.3 EXTRACCIÓN DE ADN	17
2.4 SECUENCIACIÓN	18
2.5 AISLAMIENTO DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO UTILIZANDO MICROBIOLOGÍA CLÁSICA.....	18
2.6 PREPARACIÓN DE INOCULO BACTERIANO.....	19
2.7 BIOENSAYOS.....	20
2.8 ANÁLISIS DE DATOS	21
2.8.1 ENSAMBLAJE MICROBIANO.....	21
2.8.2 INOCULACIÓN EN PLANTAS DE FRIJOL TOA (<i>PHASEOLUS VULGARIS L.</i>).....	21
3. RESULTADOS.....	22
3.1 NODULACIÓN RADICAL DEL GÉNERO <i>INGA</i> EN ECOSISTEMAS VÁRZEA Y TERRA FIRME EN LA EBT	22
3.1.1 <i>Parámetros fenotípicos de plántulas de Inga (T0)</i>	22
3.1.2 <i>Identificación morfológica</i>	23
3.1.3 <i>Nodulación Várzea Vs Terra firme</i>	24
3.2. COMPOSICIÓN BACTERIANA DENTRO DE NÓDULOS RADICALES DE ESPECIES DE <i>INGA</i> ..	25
3.2.1 <i>Resultados moleculares Oxford Nanopore</i>	25
3.2.2 <i>Identificación molecular de especies de Inga como plantas huésped</i>	26
3.2.3 <i>Identificación de posibles patógenos dentro de nódulos de Inga</i>	27
3.3 BACTERIAS CANDIDATAS DE FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO PROMUEVEN EL CRECIMIENTO INICIAL DE PLÁNTULAS DE FREJOL	29
3.3.1 <i>Resultados aislamiento</i>	29
3.3.2 <i>Resultados bioensayos funcionales en el invernadero</i>	30
DISCUSION.....	32
CONCLUSIONES.....	35
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Distribución de especies de <i>Inga</i> bajo diferentes tratamientos en ecosistemas de Terra Firme y Várzea.....	23
Tabla 2 Comparación de identificación morfológica y molecular de especies de <i>Inga</i>	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Diseño experimental en EBT	16
Figura 2 Comparación de nódulos entre Várzea y Terra firme.....	24
Figura 3 Bacterias fijadoras de nitrógeno por ecosistema.....	25
Figura 4 Distribución de géneros patógenos por ecosistema	28
Figura 5 Aislamiento bacteriano de <i>Rhizobiales</i>	29
Figura 6 Resultados de altura (cm)	30
Figura 7 Resultados biomasa seca (g).....	31

INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

La Amazonía, considerada un refugio para la vida silvestre, es un vasto ecosistema que alberga una inmensa diversidad biológica, desempeñando un papel vital en la regulación del clima global y la conservación de la biodiversidad. Dentro de esta región, árboles del género *Inga* destaca como un componente clave de la riqueza vegetal, comprende alrededor de 300 especies de árboles y arbustos distribuidos en América tropical (Rollo et al., 2016), con una presencia significativa en la cuenca del Amazonas.

Las especies de plantas dentro del género *Inga* (Familia Fabaceae) son conocidas por sus asociaciones comunes con las bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico (Martins da Costa et al., 2018), lo que las convierte en importantes contribuyentes a la fertilidad del suelo y al ciclo de nutrientes en ecosistemas tropicales. Varias especies del genus *Inga* presentan estructuras especializadas en sus raíces denominadas nódulos. Los nódulos alojan bacterias fijadoras de nitrógeno del orden de proteobacteria alfa Rhizobiales, como los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (Tortosa, 2016). Su función es convertir el nitrógeno atmosférico (N₂) en una forma que la planta puede utilizar como amonio o compuestos orgánicos nitrogenados, esenciales para la síntesis de proteínas, a cambio las bacterias reciben compuestos orgánicos y por la planta (Lyra et al., 2019).

Estudios han demostrado que la formación de nódulos es un proceso altamente regulado que implica la comunicación química entre la planta y las bacterias, mediada por señales específicas como flavonoides secretados por las raíces y los factores de nodulación producidos por las bacterias (Isidra-Arellano & Valdés-López, 2022). Sin embargo, la comprensión de la diversidad bacteriana presente en estos nódulos, especialmente en el

contexto de diferentes ecosistemas amazónicos como Várzea y Terra firme, sigue siendo un área de investigación en desarrollo.

La investigación sobre la identificación y aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno ha sido un área de interés clave en la biología de la simbiosis planta-microorganismo. Estudios recientes han utilizado una variedad de enfoques para este propósito. Por ejemplo, (Wolińska et al., 2017) emplearon técnicas moleculares, como la secuenciación de ADN, para identificar y caracterizar nuevas cepas de bacterias fijadoras de nitrógeno en muestras de suelo. Además, se han utilizado medios selectivos como el medio YMA con red Congo para el aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno, como demostraron Zhang y colaboradores (2022) en su estudio sobre la diversidad bacteriana asociada a leguminosas en sistemas agrícolas. La mayoría de los esfuerzos de aislamiento se han centrado en el suelo circundante y no en los nódulos radiculares.

1.2 Justificación

La investigación sobre la dinámica bacteriana en los nódulos de plántulas del genus *Inga* es crucial ya que, la comprensión de estas interacciones planta-microorganismo no solo contribuye al conocimiento fundamental de la ecología y la biología de la simbiosis, sino que también tiene importantes implicaciones para la agricultura sostenible y la conservación de la biodiversidad en la región amazónica (Moreno Reséndez et al., 2018). Por otro lado, no se conoce mucho sobre relaciones entre plantas y microorganismos benéficos en general en la Amazonia del Ecuador.

1.3 Hipótesis

Se postula que la diversidad microbiana en los nódulos de *Inga* exhibiría patrones específicos entre cada ecosistema, mostrando bacterias presentes en ambos ecosistemas y otras

exclusivas de Várzea o Terra firme. También se hipotetiza que las bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de estos nódulos tendrían la capacidad de mejorar significativamente el crecimiento y la fijación de nitrógeno (nodulación) en bioensayos con frijol, sugiriendo un potencial impacto positivo en prácticas agrícolas sostenibles y en la salud del ecosistema amazónico.

1.4 Pregunta de investigación

¿Cuáles son los patrones de diversidad microbiana presentes en los nódulos de *Inga leiocalycina* e *Inga edulis* en los ecosistemas de Várzea y Terra firme de la Amazonía, y cómo difieren entre sí? Además, ¿qué bacterias fijadoras de nitrógeno pueden ser aisladas de estos nódulos, y cuál es su potencial impacto en el crecimiento?

1.5 Marco teórico

La Reserva de la Biosfera Tiputini, situada en la región amazónica de Ecuador, presenta dos ecosistemas de bosques amazónicos tropicales con una enorme biodiversidad de especies de plantas y de animales. Várzea se caracteriza por ser una llanura inundable estacionalmente debido a su cercanía al río Tiputini, mientras que la Terra firme constituye las zonas elevadas no inundadas durante el período de crecida de los ríos. Estos dos ecosistemas presentan condiciones ambientales contrastantes, como fluctuaciones en el nivel del agua, disponibilidad de nutrientes y composición del suelo (Flores Aroni, 2022), lo que conlleva a diferencias significativas en la biodiversidad y el funcionamiento ecológico.

La velocidad de los ciclos biogeoquímicos en selvas tropicales es muy rápida debido a las altas temperaturas y la alta humedad, la fijación biológica de nitrógeno fomenta el

crecimiento y la supervivencia de las plantas en las condiciones mencionadas (Arévalo-Granda et al., 2023).

El género *Inga*, perteneciente a la familia Fabaceae, es un grupo diverso de árboles y arbustos que se encuentran predominantemente en América tropical (Castiblanco Guzmán, 2021). Estas plantas son conocidas por su capacidad para formar simbiosis con microorganismos beneficiosos, especialmente bacterias fijadoras de nitrógeno y hongos formadores de micorrizas, que residen en los nódulos de las raíces y contribuyen a la fertilización del suelo y al crecimiento de las plantas. La simbiosis planta-microorganismo es un fenómeno ampliamente estudiado en la ecología y la biología vegetal, donde las plantas establecen asociaciones mutualistas con diversos microorganismos para obtener nutrientes y mejorar su resistencia a perturbaciones ambientales (Toniutti, 2020). En el caso de *Inga*, la simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno es clave para su supervivencia en suelos con deficiencias en algunos macro y micronutrientes.

Los nódulos son estructuras especializadas presentes en las raíces de muchas plantas leguminosas, incluidas las del género *Inga*, donde se establecen simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno (Goncalves et al., 2024). Estos nódulos proporcionan un ambiente favorable para el crecimiento de las bacterias y la fijación de nitrógeno atmosférico, que luego se convierte en amonio (NH_4^+) una forma asimilable por las plantas (Maridueña et al., 2022).

El microbioma del suelo se refiere a la comunidad diversa de microorganismos que habitan en el suelo y desempeñan funciones clave en la descomposición de la materia orgánica, reciclaje de nutrientes y la promoción del crecimiento de las plantas (Erice et al., 2019). La composición y la diversidad del microbioma del suelo pueden influir en la salud de las plantas

y la productividad del ecosistema, incluida la capacidad de las plantas para formar simbiosis beneficiosas con microorganismos en sus raíces.

Para identificar las comunidades microbianas que habitan en la rizosfera de las plantas del género *Inga* se usa secuenciación de Oxford Nanopore Technologies con dispositivo GrindIon, es una tecnología que permite determinar la secuencia de ADN de manera rápida y eficiente (Rubio et al., 2020), permite analizar el ADN presente en las muestras de suelo de la Amazonía y, específicamente en sus nódulos. Esta técnica nos brinda la capacidad de obtener información detallada sobre la composición y diversidad de los microorganismos presentes en el suelo y las bacterias asociadas a las raíces de las plantas, en nuestro caso dentro de nódulos radicales.

Al utilizar la secuenciación de nueva generación buscando el marcador molecular ribosomal 16S rRNA (región completa), podemos explorar de manera exhaustiva la diversidad bacteriana y mediante bioinformática comprender mejor las interacciones entre las plantas y los microorganismos en los ecosistemas amazónicos. Esto nos permite identificar patrones de asociación entre las plantas de *Inga* y sus bacterias asociadas (Baldez et al., 2020), y luego comprender cómo estas interacciones afectan la salud del suelo y la productividad vegetal en la región amazónica (Eaton et al., 2023).

1.6 Objetivos

Objetivo general

Caracterización molecular y funcional de bacterias fijadoras de nitrógeno asociadas a de nódulos radicales de individuos del género *Inga* provenientes de la Reserva de la biodiversidad Tiputini en la Amazonia ecuatoriana

Objetivos específicos

Identificar y caracterizar las comunidades microbianas presentes en nódulos de individuos del género *Inga* provenientes de los ecosistemas de Terra firme y Várzea, en la Reserva de la Biodiversidad Tiputini.

Aislar bacterias fijadoras de nitrógeno presentes en los nódulos de miembros del género *Inga*.
Seleccionar y evaluar si los inóculos de bacterias obtenidas tienen un efecto positivo sobre el crecimiento y la fijación de nitrógeno en plantas de frijol cultivadas bajo condiciones controladas en invernadero.

2 METODOLOGÍA

2.1 Área de Estudio

La Estación de Biodiversidad Tiputini (EBT), ubicada en la región amazónica de Ecuador, en la provincia de Orellana, se encuentra inmersa en uno de los pulmones verdes vitales del planeta, caracterizado por su exuberante selva tropical húmeda con dos ecosistemas presentes, Terra firme y Várzea (Silva et al., 2010). Con una pluviometría que supera los

4000 mm anuales y una temperatura promedio que oscila entre los 24°C y los 26°C, la estación científica EBT alberga una vasta variedad de especies vegetales y animales.

La investigación propuesta se llevará a cabo en la Estación de Biodiversidad Tiputini, con la recolección de muestras de nódulos radiculares de plántulas del género *Inga* y la realización de los análisis de secuenciación de ADN y bioensayos funcionales en la ciudad de Quito, capital de Ecuador, aprovechando la infraestructura y recursos disponibles en la USFQ.

2.2 Muestreo en campo.

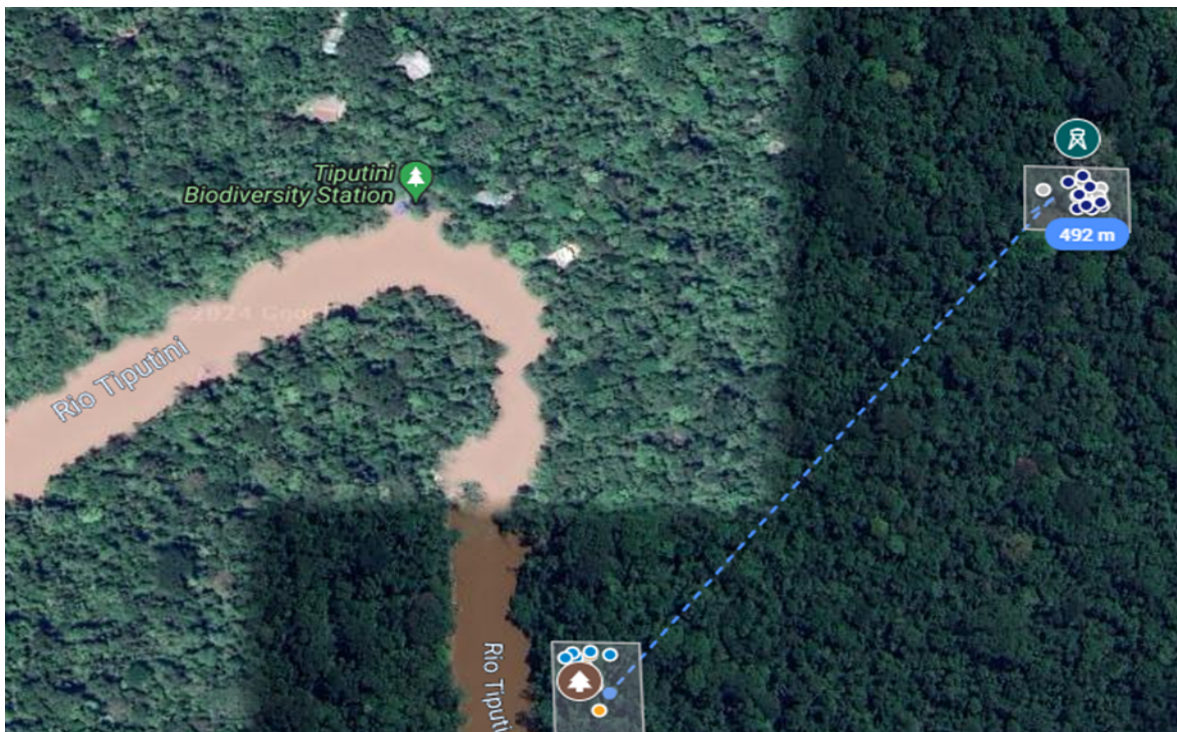


Figura 1 Diseño experimental en Estación de Biodiversidad Tiputini (EBT) en la Amazonia ecuatoriana con los dos sitios de intercambio de plántulas de *Inga*: El sitio cerca del río está situada en Várzea, mientras que el sitio cerca del icono de la torre de observación es el sitio del ecosistema Terra Firme.

En la Estación de Biodiversidad Tiputini se realizó un muestreo los días 24 y 25 de febrero del 2024. Durante esta salida de campo, se seleccionaron y georreferenciaron 40 plántulas de

Inga, 20 plántulas en cada ecosistema de la estación. Estas plántulas fueron distribuidas aleatoriamente en dos tratamientos: “control” (C), e “intercambio” (I), cada uno con 10 plántulas. Las plántulas asignadas al tratamiento intercambio, fueron sometidas a un intercambio entre los ecosistemas. Esto implicó que las plántulas que inicialmente se encontraban en Várzea fueron trasladadas a Terra firme, mientras que las plántulas de Terra firme fueron llevadas a Várzea (Figura 1). Este intercambio permitirá evaluar el efecto de las condiciones ambientales en el crecimiento y desarrollo de las plántulas.

En cada plántula se tomarán medidas que incluyeron la altura de la planta, medida desde la base del tallo hasta el meristemo más alto, así como el diámetro del tallo, el número de hojas y folíolos, la presencia de nectarios y hormigas, y se estimará visualmente el nivel de herbivoría en cada folíolo. También se medirá el peso de la plántula sin tierra utilizando una balanza digital.

Se recolectaron los nódulos cuidadosamente cavando a una profundidad de 10 cm y revisando entre la hojarasca unos 40 cm desde el centro del tallo a la redonda para captar la mayor cantidad de raíces. Estos nódulos se colocaron en tubos con perlas de silica para su conservación en seco. Los nódulos radiculares almacenados con perlas de silica se almacenaron en una hielera para mantenerlos refrigerados durante todo el viaje. Una vez en el campus de la USFQ en Quito, las muestras se guardaron en refrigeración (4°C) hasta su posterior procesamiento y análisis.

2.3 Extracción de ADN

Se empleó el kit DNeasy PowerSoil Pro de QIAGEN (EE.UU.). Se comenzó lavando los nódulos con agua destilada y alcohol al 70%, asegurando así la pureza de nuestras extracciones. Posteriormente, realizamos una lisis mecánica en los nódulos, utilizando una

combinación de agitación con perlas de vidrio y un buffer de extracción que contiene componentes para la disrupción de las membranas celulares y la liberación del ADN. Finalmente, resuspendimos el ADN en agua estéril y procedemos con su cuantificación para evaluar la calidad y la cantidad del ADN extraído utilizando Nanodrop.

2.4 Secuenciación

Se empleó la tecnología de Oxford Nanopore Technology, con interés en el marcador ribosomal 16S, una región altamente conservada pero lo suficientemente variable como para permitir la identificación precisa de procariotas (Pan et al., 2023). La tecnología de Oxford Nanopore ofrece ventajas significativas en términos de rapidez, portabilidad y capacidad de secuenciación de largos fragmentos de ADN en tiempo real. Al utilizar esta tecnología, se logró obtener secuencias de ADN de alta calidad y buena longitud que nos permitió revelar la diversidad bacteriana asociada a los nódulos radiculares las muestras vegetales. Una vez obtenidos los datos crudos de la secuenciación (fastq) se empleó el software Epi2me (Oxford Nanopore, UK) para procesarlos datos y obtener el ensamblaje bacteriano.

2.5 Aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno utilizando microbiología clásica.

Este proceso se llevó a cabo utilizando técnicas de cultivo bacteriano en medios de agar diferencial que favorezcan el crecimiento de bacterias capaces de fijar nitrógeno biológico. El aislamiento a partir de los nódulos se llevó a cabo siguiendo un protocolo detallado, inicialmente, se preparó el medio de cultivo YMA (Agar Levadura-Manitol) con Red Congo, siguiendo los pasos descritos en el protocolo (Guianeya et al., 2008). El medio YMA con rojo Congo es útil para aislar bacterias fijadoras de nitrógeno debido a que el rojo Congo es un indicador de pH que cambia de color en respuesta a la acidificación del medio por parte de las bacterias. Esto permite identificar las colonias que acidifican el medio, indicando una

posible capacidad de fijación de nitrógeno, ya que la fijación de nitrógeno conlleva la producción de ácido láctico y ácido acético por parte de las bacterias. Además, el YMA proporciona una fuente de carbono y nutrientes adecuada para el crecimiento de estas bacterias, promoviendo su desarrollo y formación de colonias distintivas en el medio.

A continuación, los nódulos previamente obtenidos en la EBT y guardados con perlas de silicagel fueron desinfectados con una solución de hipoclorito de sodio al 5% y lavados con agua destilada estéril. Luego, se maceraron y se sembraron en el medio de cultivo YMA mediante el método de estriamiento. Las placas Petri se incubaron a 37 °C durante 3-4 días. Una vez transcurrido este tiempo se pudo observar en crecimiento de colonias bacterianas en el medio de las placas Petri.

2.6 Preparación de inóculo bacteriano

Para preparar el inóculo bacteriano, de las colonias bacterianas previamente aisladas fueron seleccionadas 2 cepas y fueron subcultivadas en caldo nutritivo (TSB) e incubadas 48 horas. Posteriormente, se centrifugó los cultivos bacterianos a 4000-5000 x g durante 10-15 minutos a temperatura ambiente, lo que permite obtener un pellet bacteriano. El sobrenadante se descarta con cuidado, asegurando no perturbar el pellet bacteriano (PH & Hoben, 1994). El pellet se resuspendió en 4ml de suero fisiológico (0.9%) estéril utilizando pipeteo suave para asegurar una resuspensión completa.

La siguiente etapa involucra la medición de la turbidez o densidad óptica a 600 nm (OD600) con un espectrofotómetro previamente calibrado utilizando suero fisiológico como blanco para establecer el punto cero de absorbancia. La suspensión bacteriana se mide para determinar su OD600, donde una OD600 de 0.1 corresponde aproximadamente a 1×10^8 células/ml (Brockwell et al., 1980). Seguidamente, se diluye la suspensión con suero

fisiológico para alcanzar la densidad deseada, posteriormente se almacenaron los tubos falcón con los inóculos en refrigeración a 4°C.

2.7 Bioensayos funcionales en invernadero

Para llevar a cabo los bioensayos, se emplearon 40 semillas de frijol previamente germinadas, las cuales fueron desinfectadas mediante el uso de agua destilada y posteriormente sembradas en un semillero. El suelo utilizado en el experimento fue preparado mezclando 90% de arena y 20% de suelo de Várzea proveniente de la Amazonía, ambos esterilizados en autoclave. Se establecieron un total de cuatro tratamientos, cada uno con 10 individuos: el primer tratamiento consistió en suelo autoclavado e inoculado con la cepa bacteriana 1, el segundo suelo autoclavado e inoculado con la cepa bacteriana 2. El tercer tratamiento fue un control con suelo autoclavado sin inoculación bacteriana, y un control adicional en suelo sin autoclavar. Esta metodología permitió evaluar el efecto de diferentes tratamientos en el crecimiento y desarrollo de las plántulas de frijol, así como el papel de las cepas bacterianas seleccionadas en la promoción del crecimiento vegetal.

Para el riego en los bioensayos, se implementó un método específico. En los tratamientos que requerían inoculación bacteriana, se administró 1 ml de inoculante bacteriano junto con 2 ml de agua. Por otro lado, en los dos últimos tratamientos control, únicamente se aplicaron 3 ml de agua. El riego se realizó cada dos días para mantener un nivel de humedad adecuado en el suelo y promover el crecimiento de las plántulas.

Durante la primera semana, se incluyó el inoculante bacteriano en el riego, en la segunda semana, todas las plantas recibieron un riego uniforme de 3 ml de agua.

Una vez concluidas las 2 semanas se midió la altura de las plantas desde la base del suelo hasta su último foliolo además de registrar su biomasa seca, restando su peso fresco de su peso seco. Se realizó el secado en estufa a 50 °C durante 24 horas.

2.8 Análisis de datos

2.8.1 Ensamblaje microbiano

Con el objetivo de identificar y caracterizar las comunidades microbianas presentes en nódulos de individuos de *Inga leiocalycina* e *Inga edulis*, se realizó el ensamblaje microbioma utilizando el software CZId. Inicialmente, las secuencias en formato FASTQ fueron cargadas en el sistema, y se creó un archivo de manifiesto que indicaba el ecosistema al que pertenecía cada muestra. Luego, se llevó a cabo el preprocesamiento de las secuencias para eliminar adaptadores y calidad de filtrado. Posteriormente, se realizó el ensamblaje de las secuencias en amplicones utilizando el workflow 16S, que incluye la asignación taxonómica. Este proceso permitió caracterizar la composición y la diversidad del microbioma presente en las muestras.

2.8.2 Inoculación en plantas de frijol Toa (*Phaseolus vulgaris* L.)

Para analizar los datos de los bioensayos, se registraron dos variables principales: la altura del tallo y biomasa seca de las plántulas. La altura del tallo se midió desde el suelo hasta el último folíolo desarrollado en cada planta, utilizando una regla graduada. Este dato proporcionó información sobre el crecimiento vertical de las plántulas y su desarrollo estructural. Además, se recolectaron las plantas para determinar la biomasa seca, lo que permitió evaluar el efecto de los diferentes tratamientos en el crecimiento y la producción de biomasa de las plantas. Los datos recopilados fueron analizados estadísticamente utilizando análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existían diferencias significativas entre los tratamientos y los controles.

3. RESULTADOS

3.1 Nodulación radical del género *Inga* en ecosistemas Várzea y Terra firme en la EBT

3.1.1 Parámetros fenotípicos de plántulas de *Inga en situ*.

El análisis de plántulas de *Inga in-situ* mostro que las plántulas mostraron un valor medio de SPAD de 52.24, reflejando una buena salud foliar. El diámetro medio de tallo fue de 0.97 cm y el peso promedio de las plántulas se registró en 30.83 gramos. Además, se observó un número promedio de 26.97 foliolos y 29.44 alas foliares por planta. En contraste, en el ecosistema de Várzea, aunque el valor medio de SPAD fue similar, se notó una diferencia en el número promedio de hojas tiernas por planta. Por otro lado, el diámetro de tallo y el peso de las plántulas no mostraron diferencias consistentes entre los ecosistemas, indicando que estos rasgos podrían estar más influenciados por factores genéticos de las especies del género *Inga* estudiadas que por las condiciones ambientales externas.

El tamaño de muestra fue de 36 plántulas de *Inga*, la mayoría de las plántulas no presentó nódulos, con un promedio general de 3.94 nódulos por planta, aunque la desviación estándar es alta (9.38), lo que indica una variabilidad considerable. El ecosistema de Várzea mostró una mayor nodulación en comparación con Terra firme.

Este patrón sugiere que el ecosistema de Várzea puede proporcionar condiciones más favorables para la nodulación en comparación con Terra firme, lo que podría ser debido a diferencias en la humedad del suelo, composición de microorganismos o factores nutricionales que favorecen la simbiosis entre las plántulas de *Inga* y las bacterias fijadoras de nitrógeno.

3.1.2 Identificación morfológica al nivel de especie de plántulas del género *Inga*.

Para identificar las especies en el campo, se utilizaron características morfológicas como la presencia de nectarios y ases foliares en el tallo, siendo esta última indicativa de *Inga auristellae*. En Terra Firme, *Inga ruiziana* mostró un aumento en la cantidad bajo el tratamiento de intercambio con 7 individuos, comparado con 5 en el control. Sin embargo, *Inga auristellae* disminuyó drásticamente de 6 en el control a solo 1 en el tratamiento de intercambio.

Como se aprecia en la tabla 1, en Várzea, la situación fue inversa para *Inga auristellae*, que aumentó su número bajo el tratamiento de intercambio, pasando de 3 a 7, mientras que *Inga ruiziana* mantuvo una cantidad constante de 5 individuos bajo ambos tratamientos.

Tabla 1 Distribución de especies de *Inga* bajo diferentes tratamientos en ecosistemas de Terra Firme y Várzea

Especie	Ecosistema	Tratamiento	Cantidad
<i>Inga ruiziana</i>	TerraFirme	Control	5
<i>Inga auristellae</i>	TerraFirme	Control	6
<i>Inga ruiziana</i>	TerraFirme	Intercambio	7
<i>Inga auristellae</i>	TerraFirme	Intercambio	1
<i>Inga ruiziana</i>	Várzea	Control	5
<i>Inga auristellae</i>	Várzea	Control	3
<i>Inga ruiziana</i>	Várzea	Intercambio	5
<i>Inga auristellae</i>	Várzea	Intercambio	7

3.1.3 Nodulación total en Várzea Vs Terra firme.

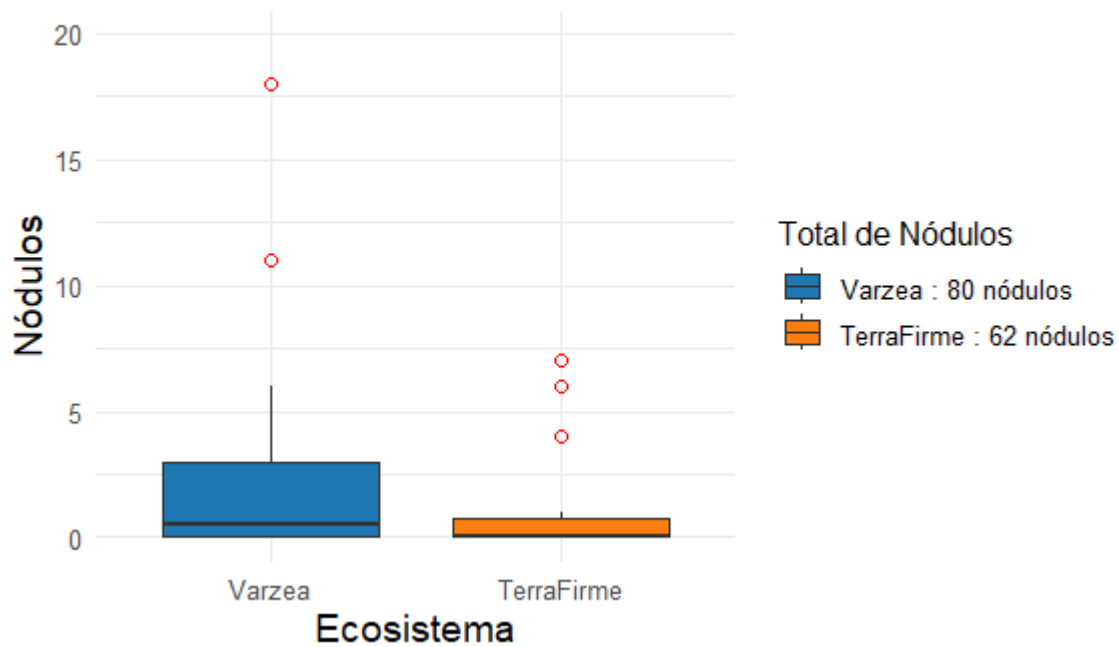


Figura 2 Comparación de nódulos radicales del genus *Inga* en ecosistemas Várzea y Terra firme

En total, se recolectaron 80 nódulos en el ecosistema de Várzea y 62 en Terra Firme. La variación en el número de nódulos entre los dos ecosistemas puede ser indicativa de diferencias ambientales o de manejo que afectan la formación y el desarrollo de nódulos. Los datos también revelan una mayor dispersión en el número de nódulos en Várzea, con algunos valores que significativamente exceden la media, lo cual podría sugerir variaciones locales en condiciones de crecimiento o en la interacción planta-microbio que favorecen una mayor nodulación en ciertas áreas.

3.2. Composición bacteriana dentro de nódulos radicales de especies de *Inga*

3.2.1 Secuenciamiento de comunidades bacterianas dentro de nódulos radicales de *Inga*

En la Figura 3 se presenta la abundancia de grupos bacterianos conocidos por sus capacidades de fijar nitrógeno atmosférico, encontrados en los nódulos radicales de plántulas del género *Inga*, secuenciados con el marcador rRNA 16S.

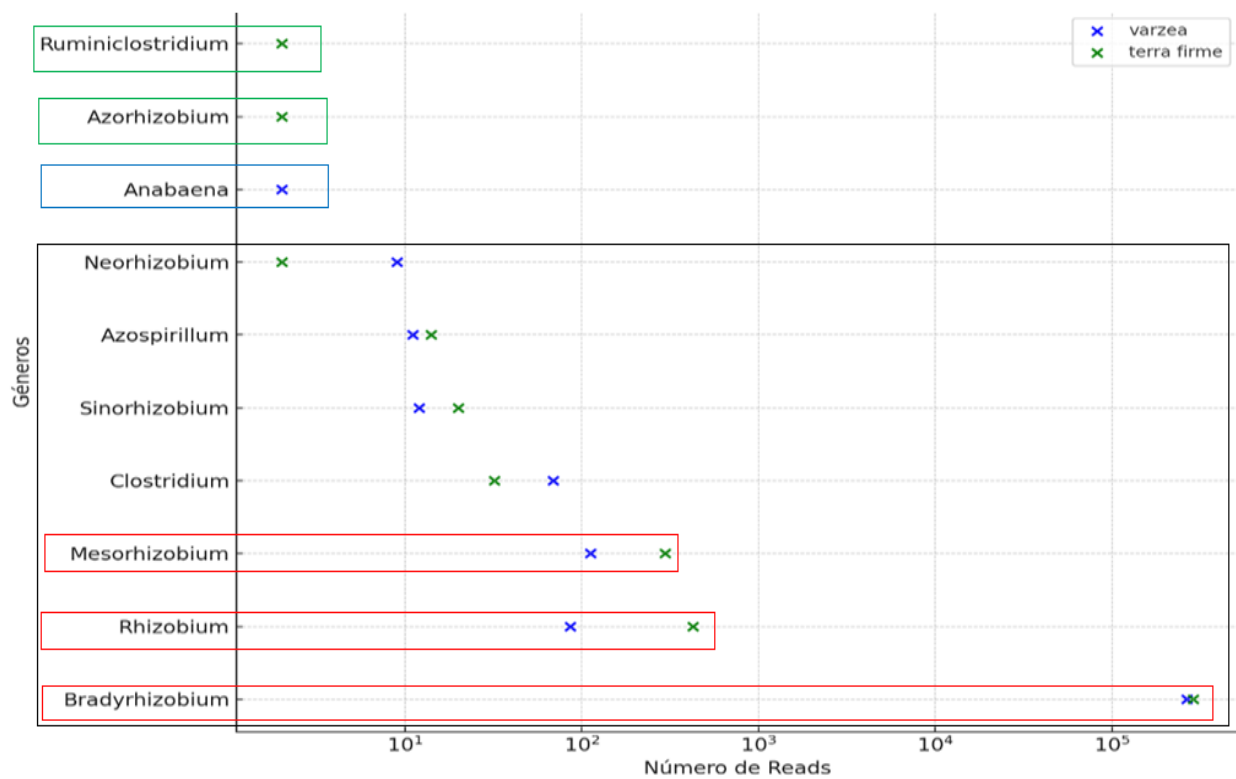


Figura 3. Abundancia de grupos conocidos por sus capacidades de fijar nitrógeno atmosférico, encontrado en los nódulos radicales de plántulas del género *Inga* secuenciado con el marcador rRNA 16^a. En la caja roja, se encuentran grupos de bacterias fijadoras de nitrógeno por ecosistema.

Los resultados muestran una diversidad significativa de géneros bacterianos, con distinciones claras entre los ecosistemas de Várzea y Terra firme, mostrando cada ecosistema géneros exclusivos. *Anabaena*, se encontró únicamente en Várzea, mientras que *Rumirizhobium* y *Azorhizobium* fueron exclusivos de Terra Firme.

En la caja roja, se destacan los grupos de bacterias fijadoras de nitrógeno predominantes compartidos por los ecosistemas, observándose que los géneros *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* son los más abundantes.

Estos hallazgos subrayan la importancia de estos grupos en la simbiosis de fijación de nitrógeno en las plántulas de *Inga*, lo que podría tener implicaciones para la comprensión de la ecología y el manejo de estos ecosistemas.

3.2.2 Identificación molecular de especies de *Inga* como plantas huésped

Tabla 2 Comparación de identificación morfológica y molecular de especies de *Inga*

Identificación morfológica	Identificación molecular	Ecosistema	Tratamiento	Cantidad
<i>Inga ruiziana</i>	<i>Inga leiocalycina</i>	TerraFirme	Control	5
<i>Inga auristellae</i>	<i>Inga edulis</i>	TerraFirme	Control	6
<i>Inga ruiziana</i>	<i>Inga leiocalycina</i>	TerraFirme	Intercambio	7
<i>Inga auristellae</i>	<i>Inga edulis</i>	TerraFirme	Intercambio	1
<i>Inga ruiziana</i>	<i>Inga leiocalycina</i>	Várzea	Control	5
<i>Inga auristellae</i>	<i>Inga edulis</i>	Várzea	Control	3
<i>Inga ruiziana</i>	<i>Inga leiocalycina</i>	Várzea	Intercambio	5
<i>Inga auristellae</i>	<i>Inga edulis</i>	Várzea	Intercambio	7

El análisis de secuenciación de la región completa del 16S, destinado inicialmente para identificar comunidades microbianas, reveló también la presencia de reads correspondientes a especies de plantas. Esto subraya la complejidad y la amplitud del metagenoma en los ecosistemas estudiados. Se identificaron discrepancias entre la identificación morfológica y molecular de especies del género *Inga*. Individuos morfológicamente clasificados como

Inga ruiziana fueron identificados molecularmente como *Inga leiocalycina*, y aquellos identificados morfológicamente como *Inga auristellae* correspondieron molecularmente a *Inga edulis*. Estas diferencias se observaron tanto en los tratamientos de control como en los de intercambio, y fueron consistentes a través de los ecosistemas de Terra Firme y Várzea.

3.2.3 Identificación de posibles patógenos dentro de nódulos de *Inga*

En total, como resultado del análisis de las secuencias obtenidas de muestras de nódulos radicales, se identificaron 23 géneros patógenos distintos en ambos ecosistemas, con una diversidad notablemente más alta en Várzea. Este ecosistema alberga una amplia gama de patógenos, con predominancia de géneros como *Escherichia*, *Pseudomonas*, y *Staphylococcus*, cada uno de los cuales exhibe más de cinco especies. En contraste, Terra Firme presenta una distribución más moderada, sin un género que supere las cinco especies,

lo que podría indicar condiciones menos favorables para la proliferación de patógenos específicos.

La diferencia en la carga patógena entre los ecosistemas podría estar influenciada por variaciones ambientales como la humedad, la temperatura y otros factores bióticos y abióticos que afectan la supervivencia y el crecimiento de estos microorganismos. Además, este patrón sugiere la necesidad de implementar estrategias de manejo diferenciadas que consideren la carga patógena específica de cada ecosistema para mitigar posibles impactos en la salud de las plantas y los animales, así como en la salud humana.

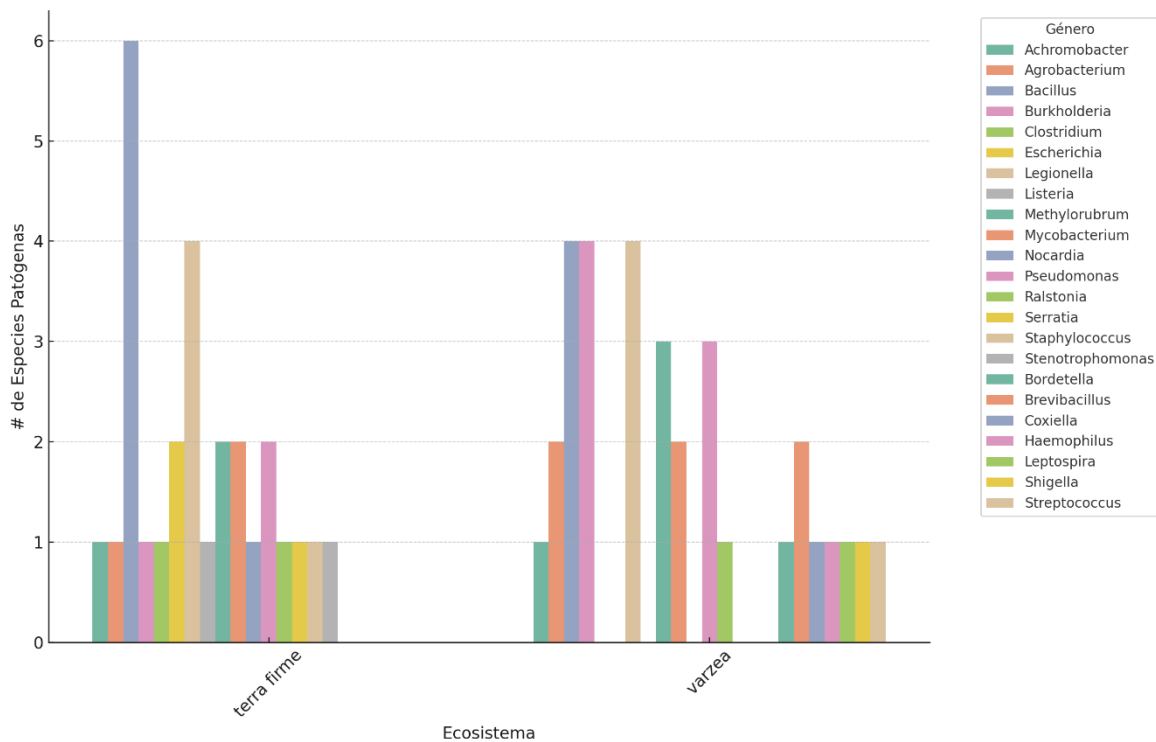


Figura 4 Distribución de géneros patógenos por ecosistema. Taxones fueron identificadas en el análisis molecular de los nódulos radicales de plántulas del género *Inga* en los ecosistemas de bosques neotropicales Várzea y Terra Firme.

3.3 Bacterias candidatas de fijación biológica de nitrógeno promueven el crecimiento inicial de plántulas de frejol

3.3.1 Resultados aislamiento bacterias fijadoras de nitrógeno

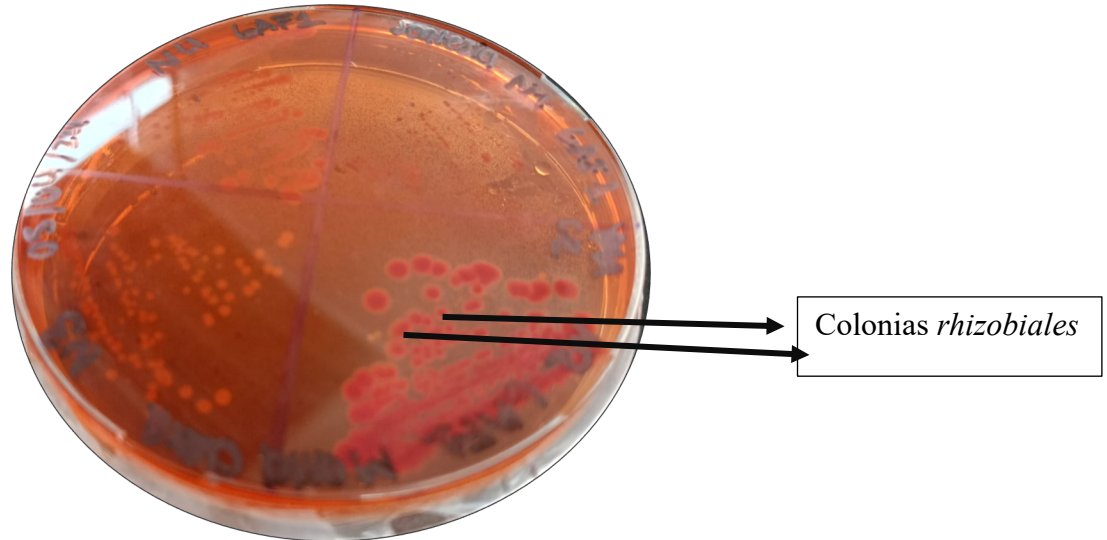


Figura 5 Aislamiento bacteriano de Rhizobiales en medio selectivo YMA con red Congo

En el laboratorio, se cultivaron un total de cuatro placas de agar utilizando medio YMA + red Congo para la identificación específica de colonias fijadoras de nitrógeno. Se observaron varias colonias con morfologías variadas. De estas, se destacaron especialmente dos colonias de la misma placa, las cuales fueron seleccionadas por su similitud fenotípica, indicando un posible aislamiento más puro y consistente de los microorganismos de interés (figura 5).

Estas dos colonias seleccionadas se tiñeron de rojo, característica que las señaló como candidatas a la fijación de nitrógeno debido a la interacción con red Congo en el medio YMA.

Ambas colonias mostraron una morfología similar, siendo elevadas y rugosas, lo que sugiere

una estabilidad fenotípica que podría ser indicativa de su capacidad para fijar nitrógeno de manera efectiva.

3.3.2 Resultados bioensayos funcionales con plantas trampa de frijol en el invernadero

Los resultados obtenidos de los análisis ANOVA, seguidos por pruebas post-hoc de Tukey, indican en cuanto a la altura, el tratamiento con el Inóculo 2 mostró un incremento significativo comparado tanto con el control de suelo autoclavado como con el control sin autoclavar. Esto sugiere que el Inóculo 2 tiene un efecto promotor en el crecimiento vertical de las plantas, figura 6.

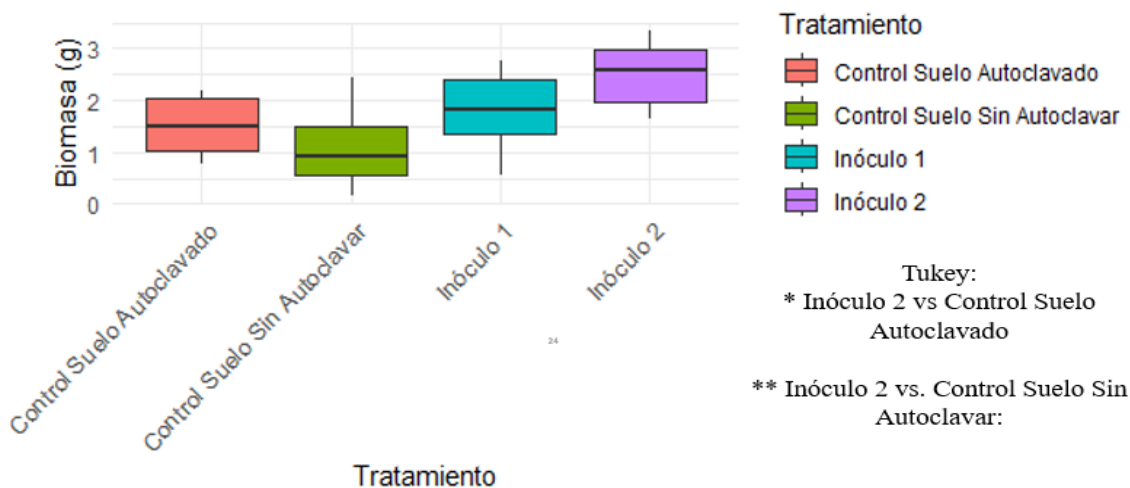


Figura 6 Resultados de altura (cm)

Para la biomasa, los resultados también destacan la efectividad del Inóculo 2, que no solo superó al control de suelo autoclavado, sino también al control de suelo no autoclavado, indicando un impacto positivo notable en el desarrollo de biomasa. Sin embargo, no se

observaron diferencias significativas entre el Inóculo 1 y los controles, lo cual puede implicar una menor eficacia de este inóculo en comparación con el Inóculo 2, figura 7.

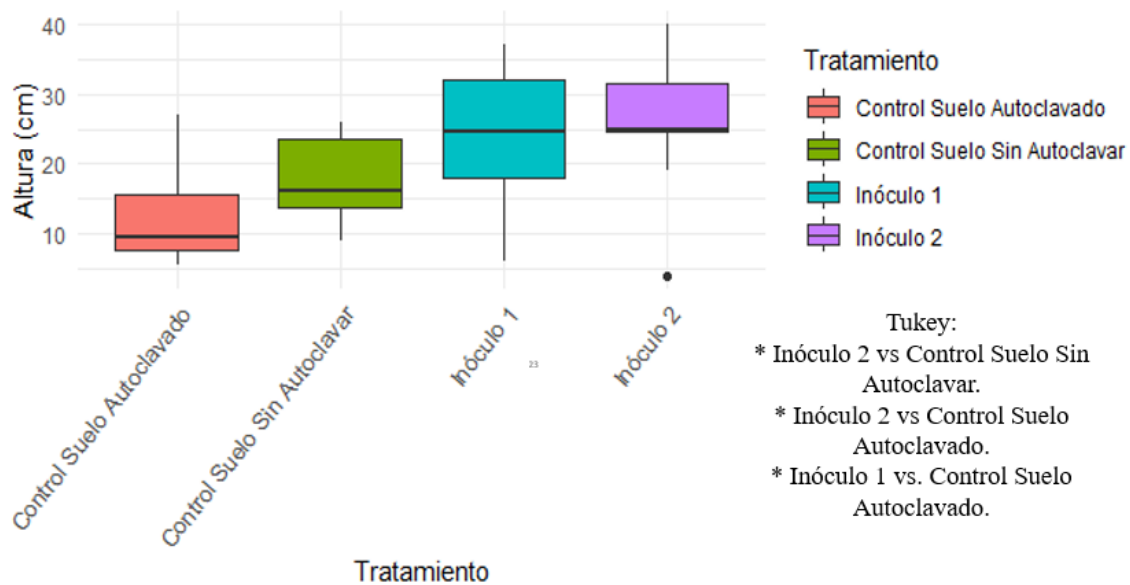


Figura 7 Resultados biomasa seca (g)

Los análisis también revelaron que la biomasa generada en condiciones de suelo autoclavado supera la del suelo sin autoclavar, un hallazgo que sugiere la influencia de la esterilización del suelo en la disponibilidad de nutrientes y la competencia microbiana. La autoclave, al eliminar microorganismos competidores y patógenos, podría estar facilitando un ambiente donde las plantas pueden aprovechar más eficientemente los recursos sin la interferencia de la biota del suelo que normalmente competiría por estos recursos.

DISCUSION

La salida de campo nos permitió averiguar que, aunque el diámetro del tallo y el peso de las plántulas no variaron significativamente entre los ecosistemas, la nodulación fue mayor en Várzea, con un promedio de 3.94 nódulos por planta y una desviación estándar alta, indicando una considerable variabilidad. Este patrón sugiere que el ecosistema de Várzea podría ofrecer condiciones más favorables para la nodulación, figura 2, posiblemente debido a diferencias en la humedad del suelo, la composición de microorganismos o factores nutricionales.

Mientras que la identificación morfológica clasificó a ciertos individuos como *Inga ruiziana* y *Inga auristellae*, la identificación molecular los identificó como *Inga leiocalycina* e *Inga edulis*, respectivamente, tabla 2. Estas discrepancias fueron consistentes en ambos ecosistemas y bajo diferentes tratamientos.

El análisis de la composición bacteriana, figura 3, dentro de los nódulos radicales mostró que géneros como *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* y *Mesorhizobium* eran abundantes en ambos ecosistemas, con *Bradyrhizobium* sobresaliendo en términos de fijación de nitrógeno. Sin embargo, otros géneros como *Anabaena* fueron exclusivos de Várzea, mientras que *Rumirizhobium* y *Azorhizobium* fueron exclusivos de Terra firme.

La identificación de posibles patógenos, figura 4, dentro de los nódulos reveló una mayor diversidad patógena en Várzea, destacando la necesidad de estrategias de manejo diferenciadas para mitigar los posibles impactos en la salud de las plantas y los animales.

La figura 5 muestra el aislamiento exitoso de colonias fijadoras de nitrógeno en medio YMA con red Congo. Este colorante es útil para diferenciar colonias en base a su capacidad de visualizar un cambio de pH, que a menudo se relaciona con el metabolismo de los carbohidratos por parte de las bacterias. Las colonias rojas visibles sugieren la presencia de

bacterias que pertenecen al orden *Rhizobiales*, un grupo conocido por su capacidad para fijar nitrógeno en simbiosis con plantas. Géneros como *rhizobium*, *bradyrhizobium*, *sinorhizobium*, *azorhizobium*, *neorhizobium* y *mesorhizobium* fueron obtenidos en la secuenciación, figura 3, lo que sugiere que en los inóculos preparados se encuentra alguna de estas bacterias.

Los suelos autoclavados, al ser esterilizados, eliminan microorganismos y factores bióticos que podrían influir en los resultados, proporcionando un medio más controlado para estudiar efectos específicos de tratamientos o adiciones experimentales. Sin embargo, este tipo de suelo puede alterar algunas propiedades físico-químicas, lo que podría afectar la interpretación de los resultados en un contexto ambiental real (Smith y Jones, 2020). Por otro lado, el uso de suelos no autoclavados como controles refleja más fielmente las condiciones naturales, permitiendo una evaluación más realista de la dinámica bacteriana y de nutrientes (Doe et al., 2019).

En la figura 6 apreciamos que la altura de las plantas fue significativamente influenciada por la aplicación de los inóculos bacterianos, lo cual sugiere un potencial efecto positivo de las bacterias fijadoras de nitrógeno en la promoción del crecimiento de las plantas de frijol sobre todo del inóculo 2. Estos resultados son consistentes con estudios previos que han demostrado la capacidad de las bacterias fijadoras de nitrógeno para estimular el crecimiento vegetal mediante la producción de hormonas vegetales y la mejora de la disponibilidad de nutrientes en el suelo (Smith & Goodman, 1999), (Gadelha et al., 2017).

La diferencia en la biomasa seca mostrada en la figura 7, entre los tratamientos también fue estadísticamente significativa, lo que indica que la aplicación de los inóculos bacterianos afectó la cantidad de masa vegetal producida por las plantas de frijol. Este resultado sugiere que las bacterias fijadoras de nitrógeno podrían estar mejorando la eficiencia en la absorción

de agua y nutrientes por parte de las plantas, lo que se traduce en un mayor crecimiento y desarrollo vegetal (Ahmad et al., 2022).

Durante el desarrollo de los bioensayos, no se observó nodulación en las raíces de las plantas de frijol. Esta ausencia de nodulación podría estar relacionada con la esterilización del suelo, que podría haber eliminado microorganismos nativos del suelo necesarios para la colonización y nodulación por parte de las bacterias fijadoras de nitrógeno (Sánchez-Cañizares et al., 2017). Investigaciones previas han demostrado que la esterilización del suelo puede afectar negativamente la formación de nódulos en las plantas leguminosas al eliminar microorganismos simbióticos beneficiosos y desequilibrar la comunidad microbiana del suelo (Bouhmouch et al., 2005). Por lo tanto, la falta de nodulación en las plantas de frijol en este estudio podría atribuirse a la falta de microorganismos nativos en el suelo autoclavado, lo que subraya la importancia de mantener la integridad del microbioma del suelo en estudios futuros. Sería interesante la inclusión de un tratamiento adicional que involucre suelo no autoclavado con un inóculo bacteriano proporciona una oportunidad para entender mejor la interacción entre los microorganismos introducidos y la comunidad microbiana nativa, crucial para aplicaciones en campo (Brown y Green, 2021). También aumentar el tiempo de los bioensayos podría tener efectos positivos para inducir nodulación.

CONCLUSIONES

La investigación presentada proporciona avances significativos en la comprensión de la ecología y el potencial microbiológico de las comunidades bacterianas asociadas con nódulos de *Inga* en diferentes ecosistemas de los bosques Neotropicales, como Terra firme y Várzea. El secuenciamiento utilizando Oxford Nanopore GrindION ha revelado que existen géneros fijadores de nitrógenos presentes en ambos ecosistemas siendo *Bradyrhizobium* el que domina en la fijación de nitrógeno (FBN), también se confirma que existen algunos géneros exclusivos de cada ecosistema.

Los bioensayos indican que es posible cultivar bacterias candidatas para la FBN utilizando medios diferenciales, y que inóculos bacterianos preparados a partir de estos aislados pueden estimular significativamente el crecimiento y la biomasa seca en plántulas de frijol. Este efecto prometedor subraya el potencial de aplicar inóculos bacterianos en la agricultura para mejorar el rendimiento de los cultivos mediante la mejora de la FBN.

Mirando hacia el futuro, es crucial secuenciar las colonias aisladas de los bioensayos para identificar con precisión las cepas más efectivas y repetir los bioensayos para validar los resultados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad, H. M., Fiaz, S., Hafeez, S., Zahra, S., Shah, A. N., Gul, B., Aziz, O., Mahmood-Ur-Rahman, Fakhar, A., Rafique, M., Chen, Y., Yang, S. H., & Wang, X. (2022). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Eliminate the Effect of Drought Stress in Plants: A Review. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 875774.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.875774>
- Arévalo-Granda, V., Hickey-Darquea, A., Prado-Vivar, B., Zapata, S., Duchicela, J., & van 't Hof, P. (2023). Exploring the mycobiome and arbuscular mycorrhizal fungi associated with the rizosphere of the genus *Inga* in the pristine Ecuadorian Amazon. *Frontiers in Fungal Biology*, *4*.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/ffunb.2023.1086194>
- Baldez, F. R., Pereira, M. G., Saldanha, T., Cabreira, W. V., da Silva, C. F., & Fraga, M. E. (2020). POPULATION DYNAMICS OF THE MICROBIOTA IN THE LITTER OF TWO TREE SPECIES OF THE ATLANTIC FOREST. *Floresta*, *50*(3), 1449-1456.
- Bouhmouch, I., Souad-Mouhsine, B., Brhada, F., & Aurag, J. (2005). Influence of host cultivars and Rhizobium species on the growth and symbiotic performance of *Phaseolus vulgaris* under salt stress. *Journal of Plant Physiology*, *162*(10), 1103-1113. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.12.003>
- Brockwell, J., Gault, R. R., Chase, D. L., Hely, F. W., Zorin, M., & Corbin, E. J. (1980). An appraisal of practical alternatives to legume seed inoculation: Field experiments on seed bed inoculation with solid and liquid inoculants. *Australian Journal of Agricultural Research*, *31*(1), 47-60. <https://doi.org/10.1071/ar9800047>

- Castiblanco Guzmán, S. L. (2021). *Importancia ecológica y carbono almacenado en biomasa forestal del género Inga en diferentes zonas de vida en Colombia.*
- Eaton, W., Hamilton, D., Chen, W., Lemenze, A., & Soteropoulos, P. P. (2023). *Genetic identification of potential nodulating bacteria and nodule-associated bacteria (NAB) within root nodules of Inga punctata trees in a Costa Rican Cloud Forest.*
- Erice, G., Bonini, P., Cirino, V., Colla, G., & Ruzzi, M. (2019). Influencia del microbioma del suelo en el rendimiento del cultivo de pimiento. *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal*, 309, 60-63.
- Flores Aroni, M. (2022). Dinâmica dos fluxos de dióxido de carbono e metano em área de várzea e terra firme do estuário Amazônico. *Superintendencia Nacional de Educación Superior Universitaria - SUNEDU.*
<https://renati.sunedu.gob.pe/handle/sunedu/3488955>
- Gadelha, C. G., Miranda, R. de S., Alencar, N. L. M., Costa, J. H., Prisco, J. T., & Gomes-Filho, E. (2017). Exogenous nitric oxide improves salt tolerance during establishment of *Jatropha curcas* seedlings by ameliorating oxidative damage and toxic ion accumulation. *Journal of Plant Physiology*, 212, 69-79.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.02.005>
- GONÇALVES, C. D. A., GOI, S. R., & JACOB NETO, J. (2024). Crescimento e nodulação de *Inga marginata* em resposta à adição de nitrogênio, fósforo e inoculação com rizóbio. *Floresta e Ambiente*, 6, 118-126.
- Guianeya, P., Gómez, G., Nápoles, M. C., & Morales, B. (2008). Aislamiento y caracterización de cepas de rizobios aisladas de diferentes leguminosas en la región de Cascajal, Villa Clara. *Pastos y Forrajes*, 31(2), 1-1.

- Isidra-Arellano, M. C., & Valdés-López, O. (2022). ¿Cómo controlan las leguminosas el número de nódulos para evitar comprometer su crecimiento y desarrollo? *Revista de Educación Bioquímica*, 41(2), 51-65.
- Lyra, M. D. C. C. P. D., Freitas, A. D. S. D., Silva, M. L. R. B. D., Bezerra, R. D. V., Silva, V. D. S. G. D., Silva, A. F. D., Mergulhão, A. C. D. E. S., Dantas, E. F., & Santos, C. E. D. R. E. S. (2019). Diversity Of Rhizobia Isolated from Nodules of Indigenous Tree Legumes from the Brazilian Dry Forest. *Acta Agronómica*, 68(1). <https://doi.org/10.15446/acag.v68n1.61243>
- Maridueña, D. M. C., Maridueña, B. J. C., David, W. O. P., & Torres, M. S. F. (2022). Beneficios del establecimiento de *Inga* spp en sistemas agroforestales de la zona agrícola del cantón El Triunfo. *Pro Sciences: Revista de Producción, Ciencias e Investigación*, 6(43), 1-11.
- Martins da Costa, E., Azarias Guimarães, A., Soares de Carvalho, T., Louzada Rodrigues, T., de Almeida Ribeiro, P. R., Lebbe, L., Willems, A., & de Souza Moreira, F. M. (2018). *Bradyrhizobium forestalis* sp. Nov., an efficient nitrogen-fixing bacterium isolated from nodules of forest legume species in the Amazon. *Archives of Microbiology*, 200(5), 743-752. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1486-2>
- Moreno Reséndez, A., Carda Mendoza, V., Reyes Carrillo, J. L., Vásquez Arroyo, J., & Cano Ríos, P. (2018). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: Una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20, 68-83.
- Pan, P., Gu, Y., Sun, D.-L., Wu, Q. L., & Zhou, N.-Y. (2023). Microbial diversity biased estimation caused by intragenomic heterogeneity and interspecific conservation of 16s rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 89(5), e02108-22.

- PH, S., & Hoben, H. (1994). *Handbook for Rhizobia: Methods in legume-Rhizobium technology*. xvi, 450. <https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8375-8>
- Rollo, A., Lojka, B., Honys, D., Mandák, B., Wong, J. A. C., Santos, C., Costa, R., Quintela-Sabarís, C., & Ribeiro, M. M. (2016). Genetic diversity and hybridization in the two species *Inga ingoides* and *Inga edulis*: Potential applications for agroforestry in the Peruvian Amazon. *Annals of Forest Science*, 73(2), 425-435. <https://doi.org/10.1007/s13595-015-0535-0>
- Rubio, S., Pacheco-Orozco, R. A., Milena Gómez, A., Perdomo, S., & García-Robles, R. (2020). Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica. *Universitas Médica*, 61(2), 49-63.
- Sánchez-Cañizares, C., Jorrín, B., Poole, P. S., & Tkacz, A. (2017). Understanding the holobiont: The interdependence of plants and their microbiome. *Current Opinion in Microbiology*, 38, 188-196. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.07.001>
- Silva, J. S. B., Montoya, Á. J. D., López, D. C., & Hurtado, F. H. M. (2010). Variación florística de especies arbóreas a escala local en un bosque de tierra firme en la Amazonia colombiana. *Acta Amazonica*, 40, 179-188. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672010000100023>
- Smith, K. P., & Goodman, R. M. (1999). HOST VARIATION FOR INTERACTIONS WITH BENEFICIAL PLANT-ASSOCIATED MICROBES. *Annual Review of Phytopathology*, 37, 473-491. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.37.1.473>
- Toniutti, M. A. (2020). *Caracterización simbiótica y molecular de rizobios noduladores de Desmodium incanum aislados de centro y norte de Argentina*.
- Tortosa, G. (2016, enero 20). Aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno presentes en el compost. *Compostando Ciencia*.

<http://www.compostandociencia.com/2016/01/aislamiento-de-bacterias-fijadoras-de-nitrogeno/>

- Wolińska, A., Kuźniar, A., Zielenkiewicz, U., Banach, A., Izak, D., Stępniewska, Z., & Błaszczuk, M. (2017). Metagenomic Analysis of Some Potential Nitrogen-Fixing Bacteria in Arable Soils at Different Formation Processes. *Microbial Ecology*, 73(1), 162-176. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0837-2>
- Zhang, X., Tong, J., Dong, M., Akhtar, K., & He, B. (2022). Isolation, identification and characterization of nitrogen fixing endophytic bacteria and their effects on cassava production. *PeerJ*, 10, e12677. <https://doi.org/10.7717/peerj.12677>