

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Nódulos radiculares de plántulas
del género *Inga* en la Amazonía Ecuatoriana:
Una exploración en su abundancia, diversidad
y ecología microbiana**

Carlos Felipe Quiñonez Necpas

Biología

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

Quito, 18 de diciembre de 2024

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Nódulos radiculares de plántulas
del género *Inga* en la Amazonía Ecuatoriana:
Una exploración en su abundancia, diversidad
y ecología microbiana**

Carlos Felipe Quiñonez Necpas

Nombre del profesor, Título académico

Pieter Marinus Johannes van 't Hof, PhD

Gonzalo Francisco Rivas-Torres, PhD

Quito, 18 de diciembre 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: Carlos Felipe Quiñonez Necpas

Código: 00210546

Cédula de identidad: 1726672262

Lugar y fecha: Quito, 18 de diciembre 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UNPUBLISHED DOCUMENT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 these publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) permite que el nitrógeno atmosférico (N_2) se transforme en compuestos asimilables esenciales para los organismos. Este proceso ocurre en la asociación simbiótica entre bacterias y plantas, lo que favorece el crecimiento vegetal. Aunque ampliamente estudiado en sistemas agrícolas, la ecología de la FBN en leguminosas silvestres y su papel en entornos megadiversos sigue siendo poco conocida. Este estudio evaluó la nodulación radicular en plántulas del género *Inga* en la Amazonía ecuatoriana, comparando la abundancia de nódulos y la composición de la microbiota endófito entre ecosistemas periódicamente inundados (várzea) y no inundados (terra firme). Se realizaron conteos de nódulos durante cinco salidas de campo, y las comunidades bacterianas fueron analizadas mediante extracción de ADN, secuenciación de tercera generación (marcador 16S rRNA) y caracterización taxonómica. Los resultados mostraron que las plántulas de várzea presentaron un mayor número de nódulos (promedio: 18.3 ± 22.1 nódulos por planta) en comparación con terra firme (promedio: 4.8 ± 9.1 ; Kruskal-Wallis, $p < 0.0001$). Proteobacteria (50–100% de abundancia relativa) y *Bradyrhizobium* (60–90%) fueron los taxones dominantes en ambos ecosistemas. Aunque los índices de diversidad alfa (Shannon, Simpson) no mostraron diferencias significativas entre ecosistemas ($p > 0.05$), la diversidad beta (Bray-Curtis) indicó estructuras comunitarias ligeramente distintas, con mayor heterogeneidad en las muestras de Várzea debido a la presencia de géneros como *Paenibacillus* y *Caballeronia*. Estos hallazgos resaltan la influencia de las condiciones ambientales en la nodulación y la diversidad microbiana, proporcionando una base para entender las interacciones planta-microbio y su papel en el ciclo de nutrientes y la productividad primaria en los ecosistemas amazónicos.

Palabras claves: Fijación biológica del nitrógeno (FBN), bacterias fijadoras de nitrógeno, nódulos radiculares, género *Inga*, selva amazónica, Estación de Biodiversidad Tiputini, Ecuador.

ABSTRACT

Biological nitrogen fixation (BNF) enables atmospheric nitrogen (N₂) to be converted into assimilable compounds essential for organisms. This process is exemplified by the symbiotic association between bacteria and plants, which supports plant growth. While extensively studied in agricultural systems, the ecology of BNF in wild legumes and its role in megadiverse environments remain poorly understood. This study evaluated root nodulation in seedlings of the genus *Inga* in the Ecuadorian Amazon, comparing nodule abundance and endophytic microbiota composition between periodically flooded (várzea) and non-flooded (terra firme) ecosystems. Nodule counts were conducted during five field trips, and bacterial communities were analyzed using DNA extraction, third-generation sequencing (16S rRNA marker), and taxonomic characterization. Results showed that *Inga* seedlings in várzea had significantly higher nodule counts (mean: 18.3 ± 22.1 nodules per plant) compared to terra firme (mean: 4.8 ± 9.1; Kruskal-Wallis, $p < 0.0001$). Proteobacteria (50–100% relative abundance) and *Bradyrhizobium* (60–90%) dominated the microbiota in both ecosystems. While alpha diversity indices (Shannon, Simpson) revealed no significant differences between ecosystems ($p > 0.05$), beta diversity (Bray-Curtis) indicated slightly distinct community structures, with greater heterogeneity in várzea samples due to the presence of genera such as *Paenibacillus* and *Caballeronia*. These findings highlight the influence of environmental conditions on nodulation and microbial diversity, providing a baseline for understanding plant-microbe interactions and their role in nutrient cycling and primary productivity in Amazonian ecosystems.

Key words: Biological nitrogen fixation (BNF), Nitrogen-fixing bacteria, root nodules, genus *Inga*, Amazon rainforest, Tiputini Biodiversity Station, Ecuador.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN-----	10
1.1 Marco teórico-----	10
1.2 Plantas del género Inga-----	12
1.3 Identificación de bacterias fijadoras de nitrógeno en suelos tropicales.-----	13
1.4 Objetivos del estudio-----	13
1.5 Preguntas de investigación-----	14
METODOLOGÍA-----	14
2.1 Área de estudio-----	14
2.2 Salidas de campo-----	15
2.3 Extracción de ADN-----	17
2.4 Secuenciación TGS-----	17
2.5 Caracterización microbiana-----	18
RESULTADOS-----	19
3.1 Ocurrencia de nodulación en plántulas Inga-----	19
3.2 Experimento de trasplantes-----	21
3.3 Caracterización molecular de comunidades bacterianas endófitas-----	21
3.4 Comunidad bacteriana de nódulos: Riqueza y Diversidad-----	24
DISCUSIÓN-----	26
4.1 Ocurrencia de nodulación por ecosistemas y salidas de campo-----	26
4.2 Supervivencia y nodulación en experimento de trasplantes-----	28
4.3 Taxonomía bacteriana de nódulos radiculares del género Inga-----	28
4.4 Diversidad de comunidad bacteriana en nódulos radiculares-----	29
4.5 Perspectivas a futuro-----	30
CONCLUSIONES-----	30
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	31
ANEXOS-----	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Puntos de muestreo en la Estación de Biodiversidad Tiputini.....	16
Figura 2. Distribución de nódulos asociados a raíces de Inga por ecosistema.....	20
Figura 3. Distribución de nódulos por mes de muestreo.	20
Figura 4. Experimento de trasplantes. Supervivencia y conteo de nódulos.	21
Figura 5. Abundancia relativa de principales Phyla encontrados.....	22
Figura 6. Abundancia relativa de principales géneros encontrados.	24
Figura 7. Alfa diversidad microbiana de taxones nodulares entre ecosistemas.	25
Figura 8. Beta diversidad microbiana de taxones nodulares entre ecosistemas.	26

INTRODUCCIÓN

1.1 Marco teórico

La evolución de la vida no solo ha dependido de la competencia entre organismos, sino también de la cooperación. Este fenómeno se estudia bajo el concepto de simbiosis, una interacción biológica en la que organismos colaboran para su subsistencia. En particular, la simbiosis mutualista genera beneficios para ambos socios, como ocurren entre ciertas plantas y bacterias en estructuras especializadas llamadas nódulos radiculares. Estos nódulos, presentes en su mayoría en raíces de plantas leguminosas, alojan bacterias capaces de fijar nitrógeno atmosférico (N_2), transformándolo en compuestos asimilables para las plantas, un recurso esencial en suelos con baja disponibilidad de nitrógeno (Angus & Hirsch, 2010).

El nitrógeno es un elemento clave en moléculas como ácidos nucleicos y proteínas, pero el N_2 atmosférico, que constituye el 70% del aire, no es directamente utilizable por la mayoría de los organismos de forma directa. Las bacterias fijadoras de nitrógeno, mediante la acción de la enzima nitrogenasa, reducen N_2 a formas como amonio y nitritos. Ciertas plantas como las leguminosas, se benefician de estas bacterias especializadas de vida libre que realizan estas funciones. A cambio, las plantas proporcionan carbono y un ambiente protector contra la oxidación de la nitrogenasa (Angus & Hirsch, 2010; Arévalo-Granda et al., 2023). De esta manera, este mutualismo se puede extrapolar para comprender de manera amplia la productividad primaria, encargada de introducir en los ecosistemas energía, agua y en este caso, nutrientes importantes como el nitrógeno. De este modo, las plantas no sostienen solas la red trófica del ecosistema, sino que también se ven asistidas por asociaciones microbianas que les permiten obtener recursos para sus propias funciones.

Un bioma altamente productivo y de relevancia global es el bosque amazónico, que alberga hasta cerca del 10% de todas las especies de plantas vasculares y vertebrados del mundo

(conocidos), concentradas en apenas el 0,5% de la superficie terrestre. Su conservación no solo es vital para preservar la biodiversidad, sino también para regular el clima planetario en el futuro (Jetz et al., 2012; Tedesco et al., 2017; ter Steege et al., 2020; Val et al., 2022). Dentro de este bioma, la Reserva de Biósfera del Yasuní en Ecuador es considerada una de las áreas más biodiversa del planeta, lo que subraya la importancia de estudiar sus ciclos de nutrientes, como la fijación biológica de nitrógeno, y su relación con la productividad primaria (Bass et al., 2010). Un centro de monitoreo de este bastión biológico es la Estación de Biodiversidad Tiputini (EBT) de la Universidad San Francisco de Quito (USFQ) localizada en esta región, cuyo estudio y monitoreo de sus ecosistemas son esenciales para comprender la dinámica del bosque amazónico, su biodiversidad y ecología.

En los últimos años, se han desarrollado numerosos estudios sobre el microbioma de las plantas y su influencia en la salud, nutrición y crecimiento vegetal. La evidencia muestra que las interacciones planta-microbio son cruciales no solo para comprender el desarrollo de las plantas, sino también para aplicaciones en la producción sostenible de cultivos, particularmente frente a crisis como el cambio climático y la degradación de los suelos (Berg et al., 2014; Bianco, 2020).

La nodulación es un fenómeno simbiótico mutualista, principalmente entre rizobios (bacterias de la familia Rhizobiaceae) y plantas leguminosas. Este proceso permite la fijación de nitrógeno en condiciones de limitación de este elemento esencial para las plantas (Angus & Hirsch, 2010; Moulin et al., 2001). Aunque existen estudios sobre nodulación en plantas de cultivo como soja y frijol, se conoce muy poco sobre su ocurrencia en plantas silvestres y cómo estas comunidades microbianas contribuyen a la supervivencia de las plántulas en diferentes tipos de suelos y ecosistemas.

En la Estación de Biodiversidad Tiputini (EBT), situada en el bosque tropical amazónico ecuatoriano dentro de la Reserva de Biósfera Yasuní, se encuentran dos tipos de ecosistemas: várzea y terra firme, que presentan diferencias en la disponibilidad de nutrientes, topografía y cercanía al río (Ensley-Field, 2016). El estudio de la nodulación en plántulas de *Inga* en estos ecosistemas busca sentar las bases para entender las asociaciones simbióticas en plantas silvestres. Además, se ha descubierto que no solo los rizobios son compatibles en la simbiosis, lo cual abre la puerta para estudiar la diversidad de microorganismos involucrados y su potencial uso en bioensayos para cultivos (Schaedel et al., 2021). Comprender estas interacciones en el contexto de la ecología del suelo contribuye a una visión holística de la productividad y dinámica del bosque amazónico, integrando el mundo visible macro ecológico con el invisible micro ecológico.

1.2 Plantas del género *Inga*

El género *Inga* es un taxón de árboles leguminosos perteneciente a la familia Fabaceae y Subfamilia Mimosoideae, cuenta con aproximadamente 300 especies descritas distribuidas en bosques húmedos y lluviosos del Neotrópico. Estas especies, conocidas comúnmente como “guaba o guabillas” son un componente importante de la biodiversidad amazónica (Pennington, 1997). Por ejemplo, en 25 ha en la Amazonía ecuatoriana, coexisten cerca de 40 especies de *Inga*, representando el 6% de los tallos de >1 cm de diámetro (Endara et al., s. f.).

Inga es un modelo excelente para explorar interacciones ecológicas y evolutivas, debido a su rápida diversificación en los últimos 4 millones de años (Coley et al., 2018; Richardson et al., 2001). Además, estas plantas mejoran la calidad del suelo mediante la acumulación de carbono y nitrógeno orgánico del suelo, lo que las hace valiosas para prácticas de reforestación y agroecología en suelos tropicales ácidos (Leblanc et al., 2005). Estas características han

facilitado su uso en prácticas agrícolas sostenibles en América Central y del Sur (Jaquetti et al., 2014).

1.3 Identificación de bacterias fijadoras de nitrógeno en suelos tropicales.

En los últimos años, se han hecho trabajos previos para identificar bacterias que se asocian simbióticamente en las raíces de plantas leguminosas. Aunque se han identificado bacterias fijadoras de nitrógeno en cultivos como soja y frijol, aún se desconoce mucho sobre la composición y dinámica en plantas silvestres como las leguminosas del género *Inga* (Aguiar et al., 2020; da Silva et al., 2014).

Tradicionalmente, estas bacterias se identifican mediante métodos de cultivo, pero esta técnica subestima la diversidad real, ya que la mayoría de las bacterias no son cultivables en medios microbiológicos (Bodor et al., 2020). Métodos recientes, como la metagenómica han revolucionado el estudio de microbiomas al permitir la identificación de taxones rizobianos y no rizobianos directamente a partir de ADN extraído de los nódulos (Hakim et al., 2018; Hartman et al., 2017). Este enfoque no solo mejora la caracterización de estas comunidades, sino que también ofrece información clave sobre su distribución y abundancia relativa, aspectos críticos para entender los ecosistemas tropicales.

1.4 Objetivos del estudio

Objetivo general: Evaluar la ocurrencia de la nodulación en plántulas del género *Inga* en dos diferentes ecosistemas (terra firme y várzea) durante cinco salidas de campo (mayo 2023, junio 2023, noviembre 2023, febrero 2024 y septiembre 2024), considerando las estacionalidades propias del bosque tropical.

Objetivos específicos:

- Identificar molecularmente los microorganismos asociados a los nódulos mediante secuenciación de tercera generación con el marcador genético 16S rRNA.
- Caracterizar la abundancia y la diversidad microbiana en función del ecosistema (terra firme y várzea).
- Evaluar posibles relaciones espacio-temporales entre la comunidad bacteriana de los nódulos y los hábitats naturales.

1.5 Preguntas de investigación

¿Varía la cantidad de nódulos asociados en raíces de plántulas del género *Inga* según el ecosistema (terra firme y várzea)?

¿Existen diferencias en la abundancia y diversidad de la comunidad bacteriana dentro los nódulos según el tipo de ecosistema?

METODOLOGÍA

2.1 Área de estudio

Dentro de la Reserva de Biosfera Yasuní predomina el Bosque Húmedo Tropical Lluvioso, parte de la cuenca alta occidental del Río Amazonas. La Reserva es considerada una de las zonas con mayor biodiversidad por metro cuadrado del planeta, con un 99.73% de su área representada por vegetación natural original (UNESCO). En este contexto, se encuentra la Estación de Biodiversidad Tiputini (EBT) administrada por la Universidad San Francisco de Quito, en la provincia de Orellana, Ecuador (ca 0°37' S, 76°10' O, 190–270 msnm). La EBT, con aproximadamente 744 ha, está ubicada en un bosque lluvioso de tierras bajas mayoritariamente inalterado por impacto antrópico (Bass et al., 2010). La Estación y sus áreas cercanas incluye principalmente bosque de terra firme, seguido de bosque de várzea, pantanos de palma y varios hábitats sucesionales en menor proporción (Blake et al., 2011).

La várzea es un ecosistema periódicamente inundable ubicado a lo largo de los márgenes de los ríos, influenciado por inundaciones estacionales. En contraste, terra firme es un área elevada que no sufre inundaciones periódicas, caracterizada por una vegetación más densa y diversa, con árboles de mayor altura y especies adaptadas a condiciones terrestres estables. El bosque en promedio recibe más de 4000 mm de lluvia anual, con temperaturas promedio 24°C y 26°C (Bass et al., 2010; Ensley-Field, 2016).

2.2 Salidas de campo

Se realizaron cinco salidas de campo en mayo, junio y noviembre de 2023, y febrero y septiembre de 2024. Cada salida presentó diferentes metodologías de muestreo: recorridos por senderos (mayo 2023), establecimiento de parcelas (junio 2023 y noviembre 2023, febrero 2024) y un experimento de trasplantes (febrero-septiembre 2024). Las ubicaciones se detallan en la Figura 1 junto con el cronograma en la Anexo 1. El conteo de nódulos se realizó en plántulas seleccionadas aleatoriamente tanto en várzea (VZ) como en terra firme (TF).

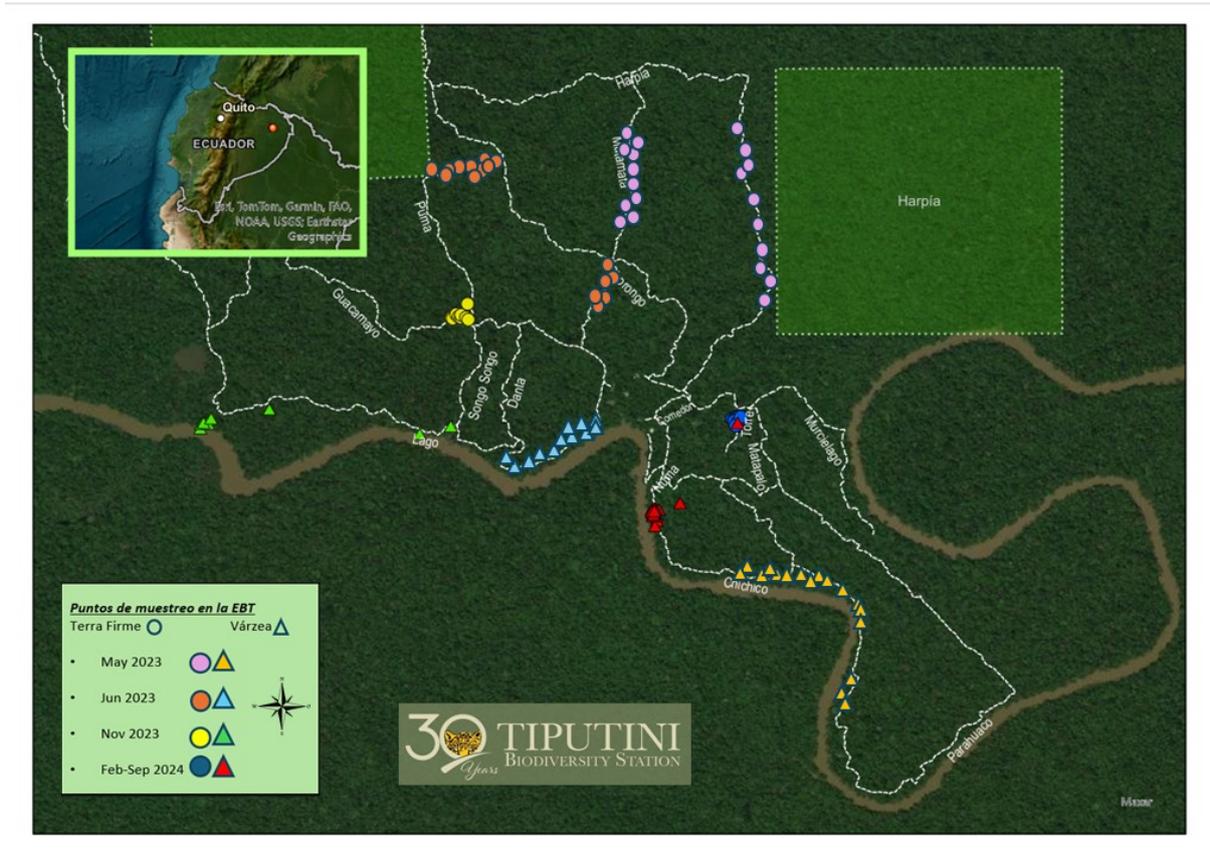


Figura 1. Puntos de muestreo en la Estación de Biodiversidad Tiputini.

Se seleccionaron plántulas de 20 a 100 cm de altura, con una distancia de 1-2 m entre ellas. Se limpió la hojarasca alrededor de las plántulas de *Inga* para evidenciar posibles nódulos superficiales dentro de un radio de 20 cm. Luego, se excavaron las raíces hasta 10 cm de profundidad para extraerlas cuidadosamente y contabilizar los nódulos presentes la arquitectura radicular de cada plántula.

En noviembre de 2023, además del conteo, se recolectaron muestras de nódulos para su procesamiento en el laboratorio del Instituto de Microbiología de la USFQ. Estas muestras fueron conservadas siguiendo la metodología de (Pang et al., 2021), utilizando todo el material estéril para extraer nódulos, y tubos estériles con perlas de sílica autoclavadas para reducir y prevenir crecimiento microbiano en el almacenamiento. Durante el transporte se utilizó un *cooler* con *ice packs*, y las muestras fueron transportadas con permiso Ministerial de Ecuador

(MAATE-CMARG-2022-0663), finalmente fueron almacenadas a -20°C hasta su procesamiento. Adicionalmente, se registraron parámetros como altura, número de hojas, alas foliares, nectarios, presencia de hormigas, ubicación GPS utilizando la plataforma de ArcGIS Survey123. En cuanto a datos meteorológicos propios de cada salida, estos fueron provistos por la Estación Tiputini.

Por último, en febrero de 2024 se inició un experimento de trasplantes, donde 20 plántulas (10 por ecosistema) fueron sometidas a tratamientos: controles, donde se removieron los nódulos radiculares y se reubicaron en su sitio original, y trasplantes, donde también se removieron los nódulos, pero se reubicaron al ecosistema opuesto. En septiembre de 2024 (casi siete meses después), se evaluó la supervivencia y nodulación de estas plántulas.

2.3 Extracción de ADN

De las muestras tomadas en noviembre de 2023, se extrajo ADN del interior de los nódulos radiculares seleccionados de 5 plántulas del género *Inga* por ecosistema. Los nódulos fueron limpiados siguiendo el protocolo del Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR, s. f.), utilizando etanol al 70%, hipoclorito de sodio al 4% y una serie de lavados en agua destilada. La extracción de ADN se realizó con el kit DNeasy PowerSoil Pro (QIAGEN, EE.UU.), combinando lisis mecánica con perlas de vidrio y química con buffer de extracción. El ADN fue purificado con fenol-cloroformo, precipitado en etanol absoluto y resuspendido en agua estéril. Finalmente, se cuantificó la calidad y cantidad de ADN con el fluorómetro Qubit (Invitrogen).

2.4 Secuenciación TGS

Se empleó la tecnología MinION de Oxford Nanopore Technology (ONT, Reino Unido) para la secuenciación de amplicones con el marcador ribosomal 16S. Este método permite identificar exclusivamente taxones bacterianos, con esta región del marcador altamente

conservada con la suficiente variabilidad nucleotídica (Johnson et al., 2019). La tecnología de Oxford Nanopore se utilizó por la ventaja de rapidez, costos y capacidad de secuenciación de fragmentos largos de ADN en tiempo real. Ya que el gen ribosomal 16s tiene una longitud de aproximadamente de 1500 pares de bases, la lectura de un fragmento largo puede cubrir la suficiente información que se necesita para identificar bacterias por su ADN, aumentando la resolución taxonómica (Johnson et al., 2019).

Los datos crudos obtenidos de la secuenciación fueron procesados con el software Epi2me de ONT con el workflow 16S. Este paso analizó, depuró y dió la asignación taxonómica de las lecturas con Kraken 2, generando archivos compatibles con el programa R Studio para el análisis ecología microbiana.

2.5 Caracterización microbiana

Las comunidades bacterianas fueron caracterizadas mediante los archivos dados por Epi2me y Kraken 2, y con el pipeline bioinformático adaptado de (Wen et al., 2023). Para analizar la ecología microbiana de las muestras se utilizaron los índices de diversidad alfa (Chao1, Shannon y Simpson) y diversidad beta (Bray-Curtis) calculados con el paquete Phyloseq en R Studio. El Índice de Chao1 estimó el número de taxones presentes en las muestras a nivel de riqueza total bacteriana para ambos ecosistemas. Por otro lado, El índice de Shannon y Simpson caracterizaron la diversidad de la comunidad tomando en cuenta tanto la riqueza como la uniformidad u homogeneidad de los taxones. Para el análisis de Diversidad Beta, Bray-Curtis implementó la métrica de disimilitud para comparar las comunidades bacterianas de las muestras. Estos análisis permitieron evaluar la riqueza, uniformidad y composición de las comunidades bacterianas en los nódulos de ambos ecosistemas.

RESULTADOS

3.1 Ocurrencia de nodulación en plántulas *Inga*

La Figura 2 muestra la cantidad de nódulos en plántulas de *Inga* en várzea (n=86) y terra firme (n=106) a lo largo de cinco salidas de campo en la EBT. Las plántulas en várzea presentaron mayor nodulación (18.3 ± 22.1) que en terra firme (4.8 ± 9.7). Las pruebas de Kruskal-Wallis y Dunn indicaron diferencias significativas entre ecosistemas ($H(1) = 42.7$, $p < 0.0001$). Sin embargo, se observó una considerable variabilidad en el número de nódulos dentro de cada ecosistema, especialmente en Várzea, como lo evidencia su mayor desviación estándar. También se observó una mayor nodulación en los meses lluviosos (mayo, junio y noviembre de 2023) comparados con los secos (febrero y septiembre 2024) presentados en la Figura 3, con diferencias significativas entre salidas ($H(4) = 62.0$, $p < 0.0001$). En general, se pudo observar una tendencia de mayor nodulación para las plántulas *Inga* que habitaban en el ecosistema periódicamente inundado de várzea y en los períodos de mayor precipitación en la EBT.

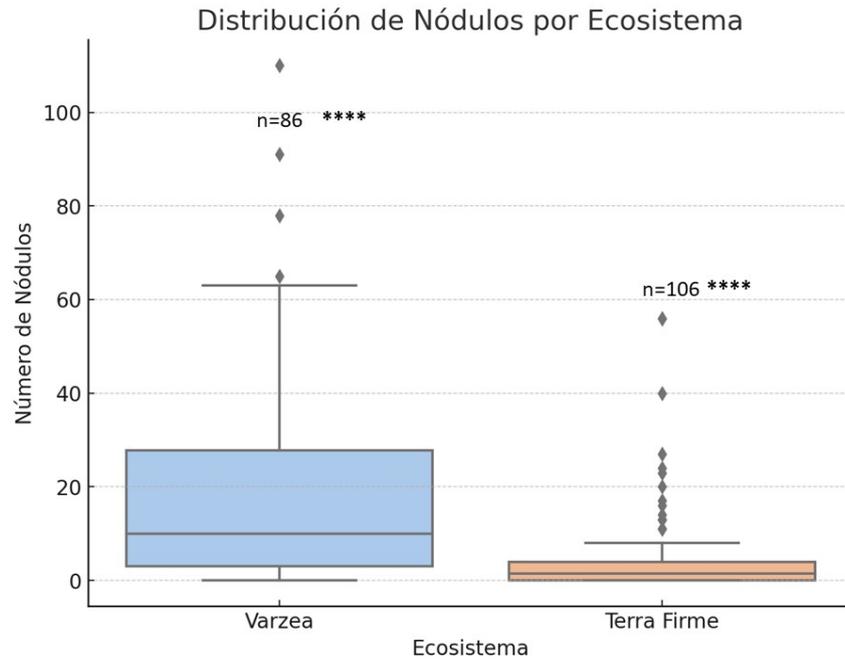


Figura 2. Distribución de nódulos asociados a raíces de *Inga* por ecosistema.

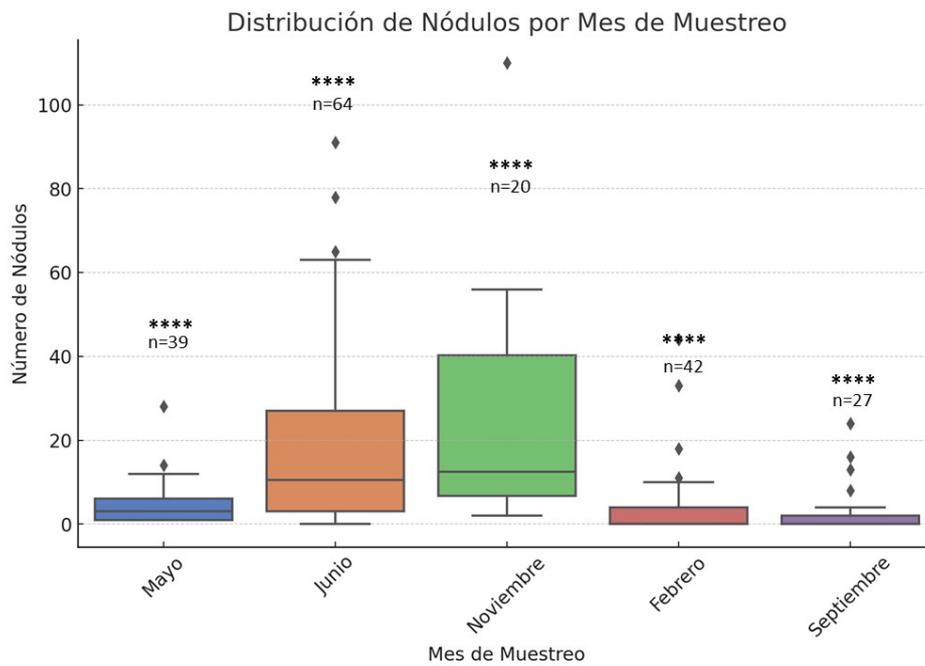


Figura 3. Distribución de nódulos por mes de muestreo.

3.2 Experimento de trasplantes

En el experimento de trasplantes, se agruparon los datos de la cantidad de nódulos por tiempos, T₀ tiempo inicial (febrero de 2024) y el T_c tiempo de cosecha (septiembre de 2024). La Figura 4, indica que las plántulas de terra firme a várzea tuvieron mayor supervivencia (50 %) y nodulación que las de várzea a terra firme (10 %). Los controles mostraron una supervivencia del 100 % en ambos ecosistemas, con nodulación similar en T₀ y T_c. Aunque las pruebas de Mann-Whitney no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$), se observó una tendencia hacia mayor nodulación y supervivencia en várzea.

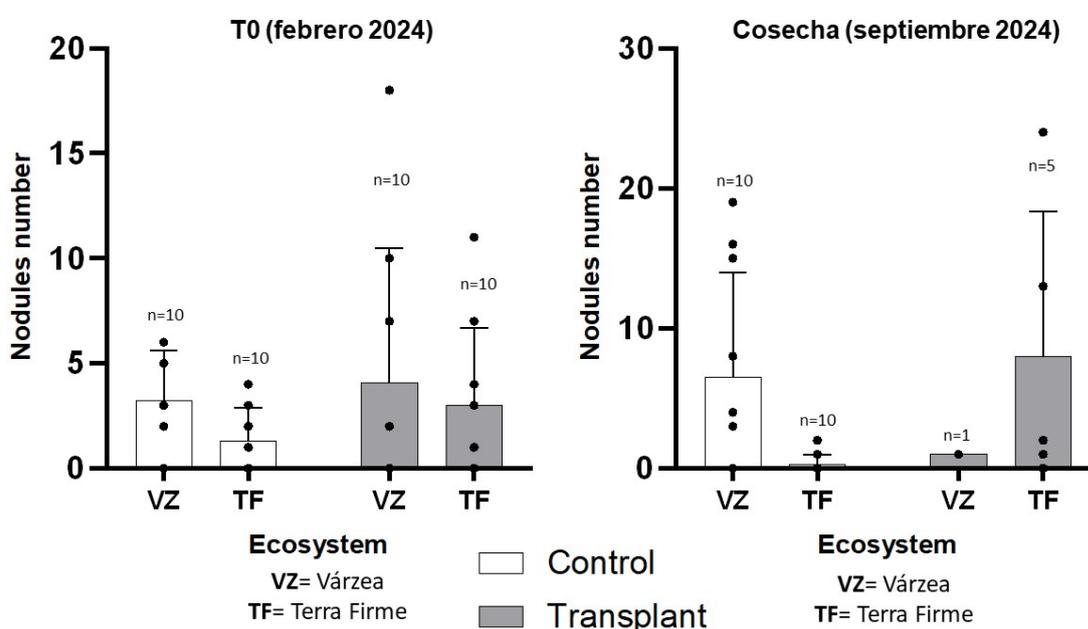


Figura 4. Experimento de trasplantes. Supervivencia y conteo de nódulos.

3.3 Caracterización molecular de comunidades bacterianas endófitas

Los resultados de secuenciación mostraron que la composición de taxones presentes en el interior de los nódulos de plántulas algunos fueron más dominantes y uniformes que otros. Las secuencias presentaron en promedio una calidad Q = 18, longitud de lecturas = 1439.3 (mínimo de 800 y máximo de 2001), rendimiento total = 0.0588 Gb y N50 = 800 kb. La Figura 5 indica

que Proteobacteria y Cyanobacteria fueron filos dominantes en la mayoría de las muestras, aunque con variaciones entre ecosistemas y códigos de muestra (*barcodes*).

En terra firme (desde barcode13 al barcode24), Proteobacteria presentó abundancias relativas que oscilaron entre el 50% y el 100%. Además, las cianobacterias mostraron también una alta representación, especialmente en barcode13 y barcode15 entre alrededor del 50%. Por otro lado, Firmicutes y Planctomycetota se detectaron en proporciones menores (<10–20%) en muestras puntuales como barcode16 y barcode21. En várzea (desde barcode17 al barcode22), se observó una mayor variabilidad en la composición de los filos. Mientras que Proteobacteria y Cyanobacteria continuaron siendo dominantes en muestras como barcode17 y barcode20 respectivamente, Firmicutes alcanzó una abundancia significativa (~60%) en barcode18. Actinobacteria se detectó únicamente en barcode18 con una contribución baja (<5%). En general, Proteobacteria y Cyanobacteria dominaron en ambos ecosistemas, con una mayor variabilidad en la distribución de Firmicutes y Actinobacteria en várzea.

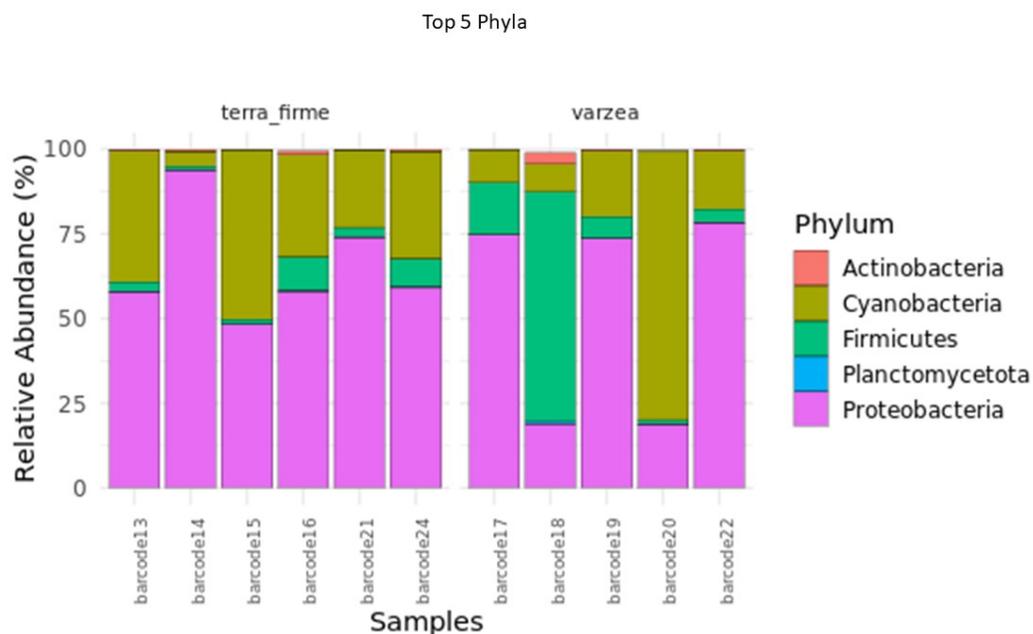


Figura 5. Abundancia relativa de principales Phyla encontrados.

En cuanto a la composición a nivel de género, la Figura 6 mostró una mayor diversidad y diferencias específicas entre ecosistemas. En terra firme, *Bradyrhizobium* fue el género dominante en todas las muestras (desde barcode13 a barcode24), con abundancias superiores al 50% en la mayoría de ellas. Además, se observaron contribuciones de *Caballeronia* y *Caldovatus* (~10–25%) en muestras puntuales como barcode15 y barcode24. *Herbaspirillum* y *Bacillus* se encontraron en proporciones bajas (<5%) en algunas muestras. En várzea, la distribución fue más heterogénea. *Bradyrhizobium* continuó siendo dominante en muestras como barcode17 y barcode19, no obstante, en barcode18 y barcode22, se observaron aumentos significativos de *Paenibacillus* (~50%) y *Paraburkholderia* (~25–30%) respectivamente. Además, *Anagnostidinema*, un género perteneciente a las cianobacterias alcanzó altas proporciones (>50%) en barcode20.

En conjunto, *Bradyrhizobium* fue el género dominante en ambos ecosistemas, particularmente en terra firme, donde presentó una distribución más homogénea. En várzea, la comunidad mostró mayor heterogeneidad, con una representación notable de géneros como *Paenibacillus*, *Paraburkholderia*, *Anagnostidinema* y *Caballeronia* en distintas muestras.

Como resumen, la composición de las comunidades bacterianas en los nódulos de *Inga* mostró patrones claros de dominancia a nivel de filo y género: Proteobacteria (a nivel de filo) y *Bradyrhizobium* (a nivel de género) dominaron en ambos ecosistemas, especialmente en terra firme. El ecosistema várzea presentó una mayor variabilidad en la estructura de la comunidad bacteriana, con una representación diferencial de Firmicutes, Actinobacteria, y géneros como *Paenibacillus*, *Anagnostidinema* y *Caballeronia*. La diversidad observada en várzea sugiere una posible influencia de las condiciones ambientales y edáficas propias de este ecosistema.

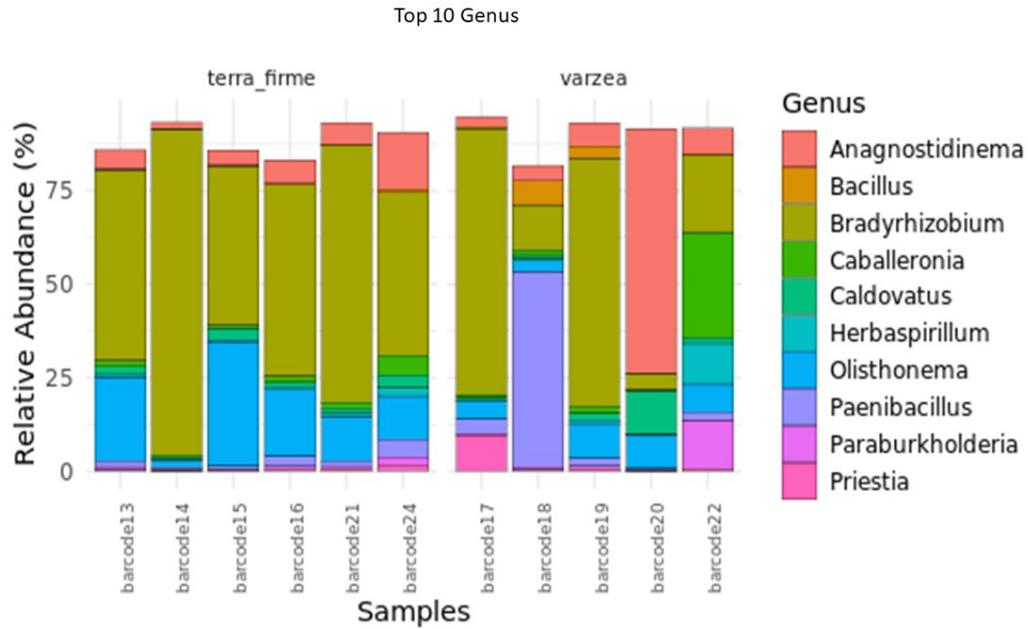


Figura 6. Abundancia relativa de principales géneros encontrados.

3.4 Comunidad bacteriana de nódulos: Riqueza y Diversidad

La Figura 7 de izquierda a derecha muestra una riqueza bacteriana total mayor en várzea según lo Observado y el Índice de Chao1. Seguidamente, se muestran la diversidad comunitaria dada por los análisis de Índices de Shannon y Simpson, en el cual ligeramente parece que várzea tiene una mayor diversidad. Aunque, el análisis estadístico no fue significativo ($p = 0.899$) mostrando que la diversidad y la dominancia entre los taxones son similares entre ambos ecosistemas.

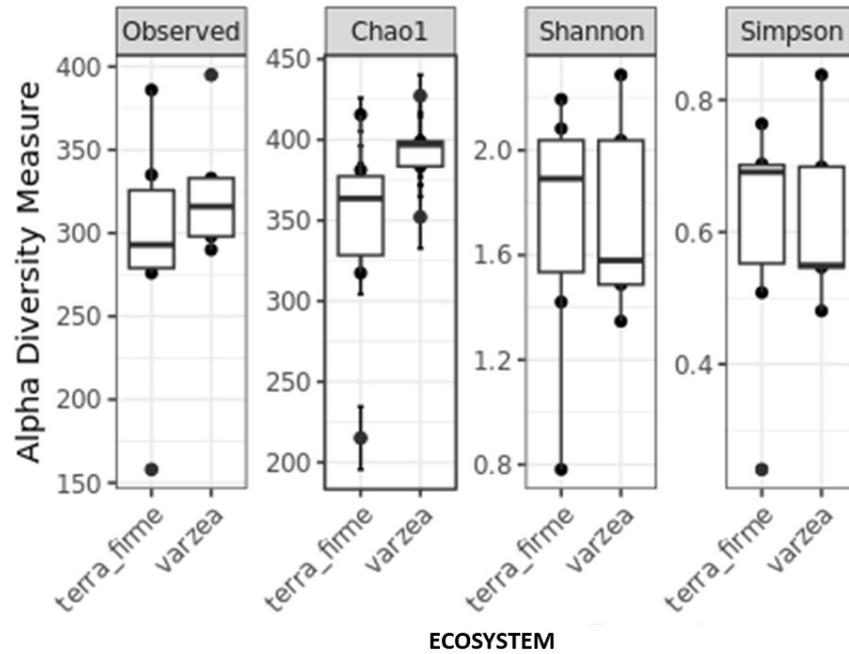


Figura 7. Alfa diversidad microbiana de taxones nodulares entre ecosistemas.

Por su parte, la diversidad beta presentado en la Figura 8, de acuerdo con la composición y recambio de taxones (presencia/ausencia y abundancias), el grafico de PCA muestra que las comunidades bacterianas tanto de várzea como de terra firme presentan similaridad, puesto que los análisis estadísticos tampoco muestran una diferencia significativa de la composición de las comunidades bacterianas (PERMANOVA [adonis2], $r^2=0.09597$, $p=0.427$).

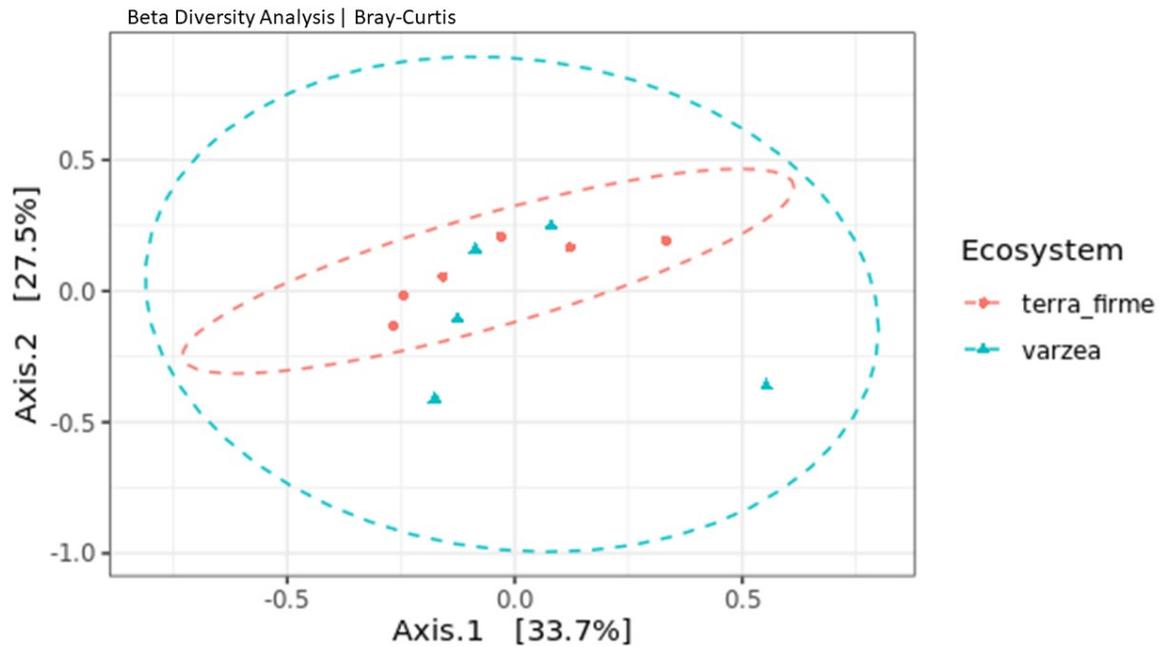


Figura 8. Beta diversidad microbiana de taxones nodulares entre ecosistemas.

DISCUSIÓN

4.1 Ocurrencia de nodulación por ecosistemas y salidas de campo

Los resultados del conteo de nódulos radiculares en plántulas de *Inga* sugieren que el bosque periódicamente inundado de várzea dentro de la Estación Tiputini favorece la nodulación en comparación con el ecosistema no inundable de terra firme. Esto se observó en la tendencia mostrada en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** y se confirmó significativamente en la prueba estadística de Kruskal-Wallis y Dunn ($p < 0.0001$). La mayor cantidad promedio de nódulos observada en várzea en comparación con terra firme podría estar relacionada con las características únicas de estos ecosistemas. En particular, las condiciones de inundación periódica en várzea podrían influir en la formación de nódulos al modificar factores como la disponibilidad de nutrientes o la actividad microbiana en el suelo. Sin embargo, la alta variabilidad observada dentro de cada ecosistema, especialmente en várzea

(desviación estándar de 22.1), sugiere que otros factores, como las diferencias entre microhábitats, podrían desempeñar un papel importante.

Estos resultados destacan la complejidad de los procesos ecológicos involucrados en la nodulación y la necesidad de estudios más detallados para identificar los factores abióticos y bióticos que regulan estas interacciones. Por ejemplo, sería relevante explorar cómo la composición del suelo, la presencia de especies bacterianas específicas y la heterogeneidad ambiental dentro de várzea influyen en la formación de nódulos. Este análisis proporciona información clave sobre cómo las diferencias entre ecosistemas podrían influir en la nodulación de plántulas, abriendo nuevas preguntas para futuras investigaciones.

Este hallazgo de abundancia de nódulos concuerda con estudios realizados en ecosistemas inundados como várzea e igapó en la Amazonía brasileña, donde se reportó mayor cantidad de nodulación en varias especies de leguminosas a nivel de estatus (de Faria et al., 2010; De Souza Moreira et al., 1992). En este caso, se cuantificó la nodulación para una sola leguminosa, que fue del género *Inga*. Además, estudios previos de análisis fisicoquímicos del suelo en la EBT mostraron mayor contenido de nitrógeno (N) en terra firme, mientras que en várzea el N es más limitado posiblemente por la lixiviación debido a las inundaciones periódicas, lo que podría estimular la simbiosis con bacterias (Arévalo-Granda et al., 2023; Darquea & Teresa, 2020). Si bien, los suelos de várzea por las inundaciones periódicas reciben sedimentos que se acumulan, como micro y macronutrientes provenientes de los Andes, el N aparentemente podría tender a no fijarse en estos ecosistemas por acción del agua (Val et al., 2022). En este sentido, las plántulas que crecen en estos suelos, al tener el N como elemento limitante podrían estimular la relación simbiótica con bacterias fijadoras de N₂.

En cuanto a la cantidad de nódulos radiculares y las salidas de campo (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), los meses con menor precipitación presentaron menor

nodulación, mientras que los meses más lluviosos mostraron mayor nodulación (Kruskall-Wallis y Dunn, $p < 0.0001$). En la Anexo 2 se resume la temporalidad climática mensual de cada salida de campo de muestreo. Esto es consistente con estudios que documentan una disminución de asociaciones simbióticas con bacterias en condiciones de sequía y un aumento con la humedad y precipitación (Cusack et al., 2021; McCulloch et al., 2021). En el contexto de la EBT, durante los meses secos (febrero y septiembre de 2024) al no haber pulsos de inundación y lixiviación, podría explicar la menor nodulación observada. Adicionalmente, el año 2024 se caracterizó por un evento de El Niño, lo que impactó la precipitación la precipitación y humedad en la cuenca amazónica (Rodrigues et al., 2023).

4.2 Supervivencia y nodulación en experimento de trasplantes

El experimento de trasplantes realizado en febrero y septiembre de 2024 en los tiempos T_0 y T_c respectivamente como se muestra en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, mostró una mayor supervivencia y nodulación en plántulas trasladadas a várzea en comparación con terra firme. Sin embargo, el reducido tamaño de muestra (10 controles y 10 trasplantes por ecosistema) limita la robustez de estos resultados (Mann-Whitney, $p > 0.05$). Además, la identificación de las especies de *Inga* pudo haber influido, ya que este género es críptico y algunas plántulas podrían ser generalistas o especialistas de un ecosistema particular (Pennington, 1997). De esta manera, esto podría explicar la mayor o menor supervivencia de plántulas al momento del cambio. Por ejemplo, la menor supervivencia de plántulas trasladadas de várzea a terra firme, posiblemente podría deberse a que la mayoría eran especialistas, y el intercambio a otro ecosistema pudo ser muy estresante y nada adaptativo a las nuevas condiciones.

4.3 Taxonomía bacteriana de nódulos radiculares del género *Inga*

Por primera vez, este estudio reporta la composición endófito de los nódulos de plántulas del género *Inga* para la Amazonía Ecuatoriana en la Reserva de Biósfera Yasuní. El filo predominante fue Proteobacteria y el género dominante fue *Bradyrhizobium*. Este género bacteriano, es conocido por ser fijador de nitrógeno, y ya ha sido reportado para *Inga laurina* en el Cerrado brasileño (da Silva et al., 2014). En la Anexo 3 se resume la composición de los principales géneros encontrados (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

Según la literatura, 7 de las 10 bacterias encontradas en este estudio tenían una relación con el proceso de fijación biológica del nitrógeno, sea esta de vida libre o en asociación endófito dentro de los nódulos radiculares (Eaton et al., 2024).

Un ejemplo es el género *Caballeronia* descubierto en plantas de bosques boreales que no solo realizan fijación biológica de nitrógeno, sino que también puede promover crecimiento de la planta hospedadora (Puri et al., 2020). Además, en un estudio reciente en el que evaluaron la composición bacteriana de nódulos para *Inga punctata* en los bosques montanos de Costa Rica, encontraron los géneros bacterianos de *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Herbaspirillum* y *Paenibacillus*, los cuales también se encontraron en los nódulos de *Inga* de la EBT aquí presentados (Eaton et al., 2024). Estos resultados validan la metodología molecular utilizada, demostrando su capacidad para caracterizar la diversidad bacteriana de los nódulos.

4.4 Diversidad de comunidad bacteriana en nódulos radiculares

Por el lado de la ecología microbiana, el análisis de riqueza directa basado en los índices Observado y Chao1 (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), mostró mayor riqueza en las muestras de várzea en comparación con terra firme. En cambio, el análisis de diversidad alfa de los Índices de Shannon y Simpson indicaron una comunidad similar ($p > 0.05$), mientras que el análisis de diversidad beta (PCA, **¡Error! No se encuentra el origen**

de la referencia.) reveló una composición similar ($p > 0.05$). Aunque, las elipses de las muestras de várzea era más amplia y variada en contraste de la elipse más compacta de terra firme. Esto podría deberse a las condiciones periódicamente inundables de várzea, que generan nichos ecológicos diversos.

En general, los resultados evidencian que las comunidades bacterianas en los nódulos de *Inga* parecen influenciadas por el ecosistema, mostrando mayor homogeneidad en terra firme y heterogeneidad en várzea. Sin embargo, la composición general fue similar, lo que sugiere que las plántulas de *Inga* reclutan comunidades bacterianas comparables independientemente del ecosistema.

4.5 Perspectivas a futuro

En síntesis, este estudio representa una línea base para explorar la diversidad microbiana dentro de los suelos del bioma amazónico, cuya diversidad microbiológica es poco explorada, y que en los últimos años se han venido desvelando por sus críticas funciones ecológicas (Ghai et al., 2011). Dado que los microorganismos están prácticamente en todas partes y desempeñan funciones importantes, el conocimiento de cómo operan estos organismos invisibles podría ayudar a predecir mejor las respuestas de los ecosistemas al cambio global, mejorar los servicios productivos y preservar la biodiversidad, especialmente en un entorno tan megadiverso como el bioma amazónico. Comprender estas interacciones es esencial para transicionar hacia prácticas agrícolas sostenibles que integren la dinámica ecológica de microorganismos y plantas en el contexto megadiverso de la Amazonía ecuatoriana.

CONCLUSIONES

La conservación de los bosques tropicales amazónicos es crucial en la actualidad, no solo porque es el refugio de la mayor cantidad de especies del mundo y biodiversidad única, sino

también por su papel en la regulación del clima global. Entender cómo funciona el proceso de la fijación biológica de nitrógeno ecológicamente en campo, y encontrar nuevos enfoques que permitan evaluar estas dinámicas en relación con la productividad primaria. Como base de la red trófica, el estudio de la productividad primaria contribuye a comprender como se mantiene el bosque neotropical, y cómo se están adaptando a perturbaciones actuales como el cambio climático. La relación entre la productividad primaria de las plantas y sus relaciones simbióticas permiten comprender de forma más profunda la introducción de nutrientes importantes como el nitrógeno al ecosistema. Desde el enfoque de la fijación biológica del nitrógeno, el estudio de la nodulación en leguminosas neotropicales abre al camino hacia esa comprensión holística. En este estudio, se exploraron las asociaciones simbióticas de bacterias en nódulos de *Inga* bajo diferentes condiciones ambientales. Además, se reportó por primera vez la composición bacteriana endófito de nódulos radiculares de una leguminosa común del bosque amazónico en Ecuador, destacando la importancia de *Bradyrhizobium* y otros géneros en estos procesos.

Se espera que en un futuro se reconozca el potencial del estudio del microbioma en los suelos amazónicos, del cual no solo permitirá entender los ciclos biogeoquímicos de nutrientes de estos suelos, sino que también se logre hacer una bioprospección con bacterias de características benéficas, que contribuyan a un mejor manejo de los suelos agrícolas en la Amazonía de Ecuador. De tal manera, que se pueda transicionar a una producción agrícola más sostenible, que toma en cuenta la dinámica ecológica entre los microorganismos y las plantas, dentro del contexto megadiverso ecuatoriano y amazónico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACIAR. (s. f.). *Working with rhizobia* | ACIAR. Recuperado 26 de octubre de 2024, de <https://www.aciar.gov.au/publication/books-and-manuals/working-rhizobia>

- Aguiar, L. M., Souza, M. de F., de Laia, M. L., de Oliveira Melo, J., da Costa, M. R., Gonçalves, J. F., Silva, D. V., & dos Santos, J. B. (2020). Metagenomic analysis reveals mechanisms of atrazine biodegradation promoted by tree species. *Environmental Pollution*, *267*, 115636. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115636>
- Angus, A. A., & Hirsch, A. M. (2010). Insights into the history of the legume-betaproteobacterial symbiosis. *Molecular Ecology*, *19*(1), 28-30. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04459.x>
- 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>
- Bass, M. S., Finer, M., Jenkins, C. N., Kreft, H., Cisneros-Heredia, D. F., McCracken, S. F., Pitman, N. C. A., English, P. H., Swing, K., Villa, G., Fiore, A. D., Voigt, C. C., & Kunz, T. H. (2010). Global Conservation Significance of Ecuador's Yasuní National Park. *PLOS ONE*, *5*(1), e8767. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008767>
- Berg, G., Grube, M., Schloter, M., & Smalla, K. (2014). Unraveling the plant microbiome: Looking back and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, *5*, 148. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00148>
- Bianco, L. (2020). Principales aspectos de la nodulación y fijación biológica de nitrógeno en Fabáceas. *Idesia (Arica)*, *38*(2), 21-29.
- Blake, J. G., Mosquera, D., Guerra, J., Loiselle, B. A., Romo, D., & Swing, K. (2011). Mineral Licks as Diversity Hotspots in Lowland Forest of Eastern Ecuador. *Diversity*, *3*(2), 217-234. <https://doi.org/10.3390/d3020217>
- Bodor, A., Bounedjoum, N., Vincze, G. E., Erdeiné Kis, Á., Laczi, K., Bende, G., Szilágyi, Á., Kovács, T., Perei, K., & Rákhely, G. (2020). Challenges of unculturable bacteria: Environmental perspectives. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, *19*(1), 1-22. <https://doi.org/10.1007/s11157-020-09522-4>
- Coley, P. D., Endara, M.-J., & Kursar, T. A. (2018). Consequences of interspecific variation in defenses and herbivore host choice for the ecology and evolution of *Inga*, a speciose rainforest tree. *Oecologia*, *187*(2), 361-376. <https://doi.org/10.1007/s00442-018-4080-z>

- Cusack, D. F., Addo-Danso, S. D., Agee, E. A., Andersen, K. M., Arnaud, M., Batterman, S. A., Brearley, F. Q., Ciochina, M. I., Cordeiro, A. L., Dallstream, C., Diaz-Toribio, M. H., Dietterich, L. H., Fisher, J. B., Fleischer, K., Fortunel, C., Fuchslueger, L., Guerrero-Ramírez, N. R., Kotowska, M. M., Lugli, L. F., ... Yaffar, D. (2021). Tradeoffs and Synergies in Tropical Forest Root Traits and Dynamics for Nutrient and Water Acquisition: Field and Modeling Advances. *Frontiers in Forests and Global Change*, 4. <https://doi.org/10.3389/ffgc.2021.704469>
- da Silva, K., De Meyer, S. E., Rouws, L. F. M., Farias, E. N. C., dos Santos, M. A. O., O'Hara, G., Ardley, J. K., Willems, A., Pitard, R. M., & Zilli, J. E. (2014). Bradyrhizobium ingae sp. Nov., isolated from effective nodules of Inga laurina grown in Cerrado soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(Pt_10), 3395-3401. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.063727-0>
- Darquea, H., & Teresa, A. (2020). *The hidden symbiont: Exploring arbuscular mycorrhizae in the Ecuadorian Amazon* [bachelorThesis, Quito]. <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/9576>
- de Faria, S. M., Diedhiou, A. G., de Lima, H. C., Ribeiro, R. D., Galiana, A., Castilho, A. F., & Henriques, J. C. (2010). Evaluating the nodulation status of leguminous species from the Amazonian forest of Brazil. *Journal of Experimental Botany*, 61(11), 3119-3127. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq142>
- De Souza Moreira, F. M., Da Silva, M. F., & De Sérgio Miana, F. (1992). Occurrence of nodulation in legume species in the Amazon region of Brazil. *New Phytologist*, 121(4), 563-570. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1992.tb01126.x>
- Eaton, W. D., Hamilton, D. A., Chen, W., Lemenze, A., Soteropoulos, P., Eaton, W. D., Hamilton, D. A., Chen, W., Lemenze, A., & Soteropoulos, P. (2024). Use of high throughput DNA analysis to characterize the nodule-associated bacterial community from four ages of *Inga punctata* trees in a Costa Rican cloud forest. *AIMS Microbiology*, 10(3), Article microbiol-10-03-027. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2024027>
- Endara, M.-J., Coley, P. D., Ghabash, G., Nicholls, J. A., Dexter, K. G., Donoso, D. A., Stone, G. N., Pennington, R. T., & Kursar, T. A. (s. f.). *Herbivore host choice in ecological and evolutionary time reflects plant defenses rather than a coevolutionary arms race*. Recuperado 22 de septiembre de 2024, de

https://www.research.ed.ac.uk/files/44088233/Endara_et_al_2017_PNAS_accepted_Coevolutionary_arms_race_or_defense_chase.docx

- Ensley-Field, M. (2016). Nutrient Cycling in the Amazon: A Comparison of Soil Characteristics, Insects, Root Types and Decomposition Rates between Varzea and Terra Firme habitats in the Ecuadorian Amazon. *Independent Study Project (ISP) Collection*. https://digitalcollections.sit.edu/isp_collection/2324
- Ghai, R., Rodríguez-Valera, F., McMahon, K. D., Toyama, D., Rinke, R., Oliveira, T. C. S. de, Garcia, J. W., Miranda, F. P. de, & Henrique-Silva, F. (2011). Metagenomics of the Water Column in the Pristine Upper Course of the Amazon River. *PLOS ONE*, 6(8), e23785. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023785>
- Hakim, S., Mirza, B. S., Zaheer, A., Mclean, J. E., Imran, A., Yasmin, S., & Sajjad Mirza, M. (2018). Retrieved 16S rRNA and nifH sequences reveal co-dominance of Bradyrhizobium and Ensifer (Sinorhizobium) strains in field-collected root nodules of the promiscuous host Vigna radiata (L.) R. Wilczek. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(1), 485-497. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8609-6>
- Hartman, K., van der Heijden, M. G., Roussely-Provent, V., Walser, J.-C., & Schlaeppi, K. (2017). Deciphering composition and function of the root microbiome of a legume plant. *Microbiome*, 5(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0220-z>
- Jaquetti, R. K., Gonçalves, J. F. de C., Ferraz, J. B. S., Ferreira, M. J., Junior, U. M. dos S., & Lacerda, C. F. de. (2014). Green Fertilization Enhances the Photosynthetic Performance and the Growth of Leguminous Trees for Restoration Plantation in Central Amazon. *American Journal of Plant Sciences*, 5(16), Article 16. <https://doi.org/10.4236/ajps.2014.516264>
- Jetz, W., Thomas, G. H., Joy, J. B., Hartmann, K., & Mooers, A. O. (2012). The global diversity of birds in space and time. *Nature*, 491(7424), 444-448. <https://doi.org/10.1038/nature11631>
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B.-Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*, 10(1), 5029. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>

- Leblanc, H. A., McGraw, R. L., Nygren, P., & Roux, C. L. (2005). Neotropical Legume Tree *Inga edulis* Forms N₂-fixing Symbiosis with Fast-growing Bradyrhizobium Strains. *Plant and Soil*, 275(1-2), 123-133. <https://doi.org/10.1007/s11104-005-0808-8>
- McCulloch, L. A., Piotta, D., & Porder, S. (2021). Drought and soil nutrients effects on symbiotic nitrogen fixation in seedlings from eight Neotropical legume species. *Biotropica*, 53(2), 703-713. <https://doi.org/10.1111/btp.12911>
- Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B., & Boivin-Masson, C. (2001). Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria. *Nature*, 411(6840), 948-950. <https://doi.org/10.1038/35082070>
- Pang, J., Palmer, M., Sun, H. J., Seymour, C. O., Zhang, L., Hedlund, B. P., & Zeng, F. (2021). Diversity of Root Nodule-Associated Bacteria of Diverse Legumes Along an Elevation Gradient in the Kunlun Mountains, China. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.633141>
- Pennington, T. (1997). *El género Inga en el Ecuador: Morfología, distribución y usos*. Unión Europea.
- Puri, A., Padda, K. P., & Chanway, C. P. (2020). Can naturally-occurring endophytic nitrogen-fixing bacteria of hybrid white spruce sustain boreal forest tree growth on extremely nutrient-poor soils? *Soil Biology and Biochemistry*, 140, 107642. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.107642>
- Richardson, J. E., Pennington, R. T., Pennington, T. D., & Hollingsworth, P. M. (2001). Rapid Diversification of a Species-Rich Genus of Neotropical Rain Forest Trees. *Science*, 293(5538), 2242-2245. <https://doi.org/10.1126/science.1061421>
- Rodrigues, J. I. de M., Martins, W. B. R., de Oliveira, V. P., Wanzerley, M. S. da S., dos Santos Júnior, H. B., & Oliveira, F. de A. (2023). ENSO impacts on litter stocks and water holding capacity in secondary forests in eastern Amazonia. *Journal of Forestry Research*, 35(1), 8. <https://doi.org/10.1007/s11676-023-01665-8>
- Schaedel, M., Hidrobo, G., & Grossman, J. (2021). From Microns to Meters: Exploring Advances in Legume Microbiome Diversity for Agroecosystem Benefits. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fsufs.2021.668195>
- Tedesco, P. A., Beauchard, O., Bigorne, R., Blanchet, S., Buisson, L., Conti, L., Cornu, J.-F., Dias, M. S., Grenouillet, G., Hugueny, B., Jézéquel, C., Leprieur, F., Brosse, S., &

- Oberdorff, T. (2017). A global database on freshwater fish species occurrence in drainage basins. *Scientific Data*, 4(1), 170141. <https://doi.org/10.1038/sdata.2017.141>
- ter Steege, H., Prado, P. I., Lima, R. A. F. de, Pos, E., de Souza Coelho, L., de Andrade Lima Filho, D., Salomão, R. P., Amaral, I. L., de Almeida Matos, F. D., Castilho, C. V., Phillips, O. L., Guevara, J. E., de Jesus Veiga Carim, M., Cárdenas López, D., Magnusson, W. E., Wittmann, F., Martins, M. P., Sabatier, D., Ireme, M. V., ... Pickavance, G. (2020). Biased-corrected richness estimates for the Amazonian tree flora. *Scientific Reports*, 10(1), 10130. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66686-3>
- Val, P., Figueiredo, J., Melo, G., Flantua, S., Quesada, C. A., Reinfelder, Y. F., Albert, J. S., Guayasamin, J. M., & Hoorn, C. (2022). Capítulo 1: Historia Geológica y Geodiversidad de la Amazonía (iTranslate, Trad.). En C. Nobre, A. Encalada, E. Anderson, F. H. Roca Alcazar, M. Bustamante, C. Mena, M. Peña-Claros, G. Poveda, J. P. Rodriguez, S. Saleska, S. Trumbore, A. Val, L. Villa Nova, R. Abramovay, A. Alencar, A. C. Rodriguez Alzza, D. Armenteras, P. Artaxo, S. Athayde, ... G. Zapata-Ríos (Eds.), *Informe de evaluación de Amazonía 2021*. UN Sustainable Development Solutions Network (SDSN). <https://doi.org/10.55161/AZXE7407>
- Wen, T., Niu, G., Chen, T., Shen, Q., Yuan, J., & Liu, Y.-X. (2023). The best practice for microbiome analysis using R. *Protein & Cell*, 14(10), 713-725. <https://doi.org/10.1093/procel/pwad024>

ANEXOS

Anexo 1. Resumen general del muestreo en la EBT en las cinco salidas de campo.

Tipo de muestra	objetivo	# Muestras várzea	#Muestras terra firme	Salida de campo
Plántulas <i>Inga</i>	Ocurrencia de nodulación	86	106	May 2023 - Sept 2024
Plántulas <i>Inga</i>	Identificación molecular y caracterización de comunidad bacteriana en nódulos radiculares	5	5	Nov 2023

Anexo 2. Resumen de temporalidad climática en salidas de campo.

Mes/año de muestreo	Promedio Precipitación (mm/h)	Promedio precipitación diario (mm)	Humedad relativa (%)	Temperatura (°C)
Mayo 2023	66.04	7.36	96	24.77
Junio 2023	70.104	4.064	95	24.33
Noviembre 2023	92.964	25	99	24.22
Febrero 2024	0.508	5.08	92.8	25.77
Septiembre 2024	0.00	2.28	89.2	26.11

Anexo 3. Descripción de géneros bacterianos encontrados en los nódulos de *Inga*.

Filo	Género	Tipo de bacteria	Fijación de nitrógeno endógena/vida libre	Reportada en <i>Inga</i> (Eaton et al., 2024)
Cyanobacteria	<i>Anagnostidinema</i>	alga	no	no
Firmicutes	<i>Bacillus</i>	gram+	N-fix vida libre	sí
Proteobacteria	<i>Bradyrhizobium</i>	gram-	N-fix endógena	sí
Proteobacteria	<i>Caballeronia</i>	gram-	N-fix	no
Proteobacteria	<i>Caldovatus</i>	gram-	no	no
Proteobacteria	<i>Herbaspirillum</i>	gram-	N-fix vida libre	sí
Cyanobacteria	<i>Olisthonema</i>	alga	no	no
Firmicutes	<i>Paenibacillus</i>	gram+	N-fix vida libre	sí
Proteobacteria	<i>Paraburkholderia</i>	gram-	N-fix	no
Firmicutes	<i>Priestia</i>	gram+	N-fix	no