

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Caracterización molecular de bacterias simbióticas provenientes de
especies forestales leguminosas y evaluación de la respuesta de
inoculación

Tesis sometida a consideración de la Comisión del Programa de Estudios de
Posgrado para optar al grado y título de Maestría Académica en
Biología con énfasis en Genética y Biología Molecular

Candidato: Andres Zuñiga Orozco

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

2023

Dedicatoria

A mi familia. A mi esposa a quien amo y agradezco todo su apoyo durante todo este viaje académico, así mismo y por casualidades de la vida, me brindará la oportunidad de ser padre en el mismo momento que culmine este posgrado. Así que a mi esposa y a mi hijo le dedico este capítulo de mi vida en el cual han sido mi motivo de vida.

Agradecimientos

A la Universidad de Costa Rica y al Sistema de Estudios de Posgrado (SEP) por la excelente formación obtenida.

A todos los profesores con quienes compartí por el conocimiento que me brindaron siempre de buena manera. Aprecio mucho que siempre estuvieron abiertos a responder cualquier pregunta por más básica o elaborada que fuera.

Al tribunal examinador a quien le debo gran parte de mi formación profesional en este posgrado, quiero expresarles mi más sincero agradecimiento y reconocerles el alto grado de profesionalismo y cordialidad con el cual hemos construido estos resultados.

Agradecer a la Universidad Estatal a Distancia quien confió en mi persona y me becó para fortalecer el área académica y de investigación.

Un agradecimiento especial a mi familia por siempre apoyarme.

“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Biología con énfasis en Genética y Biología Molecular.”



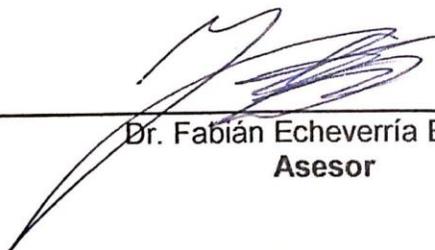
Dr. Erick Castellón Elizondo
**Representante del Decano
Sistema de Estudios de Posgrado**



Dra. Laura Y. Solís Ramos
Directora de Tesis



Dr. Keilor Rojas Jiménez
Asesor



Dr. Fabián Echeverría Beirute
Asesor



Dra. Lidieth Uribe Lorío
**Representante
Programa de Posgrado en Biología
con énfasis en Genética y Biología Molecular**



Andrés D. Zúñiga Orozco
Candidato

INDICE GENERAL

Introducción	1
Artículo 1: Resumen Ejecutivo.....	4
Artículo 1: Micorrizas y rhizobios: un diálogo molecular con el huésped vegetal.....	5
Artículo 2: Resumen Ejecutivo.....	39
Artículo 2: Caracterización de diversidad y efecto de inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno en especies de leguminosas forestales de Costa Rica.....	40
Conclusiones.....	69

Índice de Tablas y Figuras

Artículo 1: Micorrizas y rhizobios: un diálogo molecular con el huésped vegetal5

- Figura 1. Genes responsables de acidificar la membrana perisimbótica y perihaustral (ANN2 y Ha1) y genes responsables de transportar glucosa (Sweet1 y Sweet3) e hidrolizar sacarosa (Sus1 y Sus3)..... 15
- Figura 2. Genes que codifican para los transportadores de calcio (CASTOR, POLLUX/DM1, NUP85, NUP133, NENA) dentro del núcleo celular vegetal e inducción de una gradiente del catión 17
- Figura 3. Inducción del mecanismo de aceptación del huésped vegetal al exponerse a Rhs y HMA..... 18
- Figura 4. Genes que codifican para los receptores vegetales involucrados con el reconocimiento de los factores de nodulación y colonización en Rhs y HMA..... 19
- Figura 5. Péptidos CLE enviados desde los nódulos a los brotes y estos, a su vez, activan el mecanismo AON para regular la cantidad de los mismos..... 21

Artículo 2: Caracterización de diversidad y efecto de inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno en especies de leguminosas forestales de Costa Rica.....40

- Tabla 1. Descripción de tratamientos a utilizar en la inoculación de bacterias nitrificantes sobre diferentes cultivos utilizados en el experimento..... 46
- Figura 1. Relación filogenética de las cepas bacterianas aisladas de diferentes especies vegetales forestales leguminosas e identificadas con el gen marcador 16S rRNA.... 48
- Figura 2. Medias de mediciones morfométricas, respiración microbiana por CO₂ y actividad nitrogenasa (umol de N/hr/planta) efectuadas en las ocho especies forestales leguminosas aplicadas y no aplicadas con inoculante bacteriano. 50
- Tabla 2. Medias de mediciones morfométricas, actividad nitrogenasa y respiración microbiana en las especies forestales leguminosas estudiadas..... 50
- Figura 3. Medias de las variables morfométricas, respiración microbiana por CO₂ y actividad nitrogenasa (umol de N/hr/planta) cuantificadas en las ocho especies forestales leguminosas y agrupadas por subfamilia. 52

Figura 4. Contenido de nutrimentos en hoja (izquierda) y raíz (derecha) para las especies forestales leguminosas estudiadas.	53
Figura 5. Contenido de nutrimentos en hoja (izquierda) y raíz (derecha) agrupados por subfamilia en las especies leguminosas forestales en estudio.	54
Tabla 3. Correlaciones entre variables utilizadas para evaluar la eficacia de inoculación con bacterias simbióticas provenientes de leguminosas forestales.	54

Introducción

El cambio climático, los altos costos de producción y la dependencia de insumos sintéticos son factores que caracterizan la producción agroforestal en Costa Rica. Por otra parte, este modelo tiene una viabilidad limitada a largo plazo. Es por estas razones que la comunidad científica se ha enfocado en desarrollar tecnologías verdes que tengan bajo impacto ambiental. Una alternativa de bajo impacto ambiental para la producción agroforestal es el uso del microbioma del suelo.

En el suelo de un bosque o plantación forestal existen millones de organismos interactuando entre sí, algunas veces de manera antagónica y en otras de forma sinérgica. Un ejemplo de sinergia es la simbiosis que se presenta en las raíces de leguminosas (Fabaceae). La familia Fabaceae en general coloniza rápidamente nichos ecológicos con condiciones adversas (Grossnickle, 2012), además es muy diversa en cuanto a usos para el ser humano, pero cobra interés para el sector agroforestal por su capacidad para fijar nitrógeno a través de bacterias simbiotes (Cabral, 2010; Cordero y Boshier, 2003). Los investigadores reportan un aporte de nitrógeno de entre 60-300 Kg/ha/año en materia seca (Céspedes *et al.* 2019, Castro-Rincón *et. al.* 2018).

Estas interactúan tomando nutrientes directamente de la planta, pero a cambio le brindan a la misma una mejora en absorción de elementos esenciales, especialmente nitrógeno. Incorporar nitrógeno atmosférico al suelo de una forma biológica tiene consecuencias económicas positivas para los productores, sobre todo en zonas donde los suelos son pobres en fertilidad, hay periodos de sequía prolongados o en suelos que han sido degradados por mal manejo.

La interacción entre bacteria-huésped es bastante compleja a nivel molecular pero se han obtenido avances importantes para entender mejor el proceso y se ha estudiado el desarrollo de la infección (Bulgarelli *et al.*, 2013; Ferguson *et al.*, 2018), los genes asociados, la morfogénesis, la asociación simbiótica (Wang *et al.* 2019, Burke *et al.* 2011), el origen de las especies por medio de la filogenómica, la asociación con otros organismos no huéspedes, la efectividad de inoculación y la diversidad.

Hay evidencia de que dependiendo de la bacteria simbiótica que esté presente en determinado momento en la relación planta-bacteria, puede actuar como un organismo generalista o específico, según la especie de planta y según la especie de bacteria (Sánchez y Gómez 2001, Ribó 2004, Labrador 2009, Acuña y Uribe 1996). Lo anterior puede provocar diferencias en las variables morfométricas de una especie, es por esta razón que, es importante identificar la especie de bacteria, estudiar sus características biológicas y a su vez el potencial como biofertilizante. Este último aspecto es de especial interés para mejorar aspectos productivos y a su vez desarrollar productos con potencial económico.

En Costa Rica se han identificado especies de bacterias simbióticas en relación con leguminosas agrícolas a nivel taxonómico clásico (Acuña 1996, Acuña y Ramírez 1987, Acuña y Uribe 1996, León, Acuña y Ramírez 1986(a), León, Acuña y Ramírez 1986(b), Morales 1987, Uribe, Acuña y Hernández 1990), sin embargo, poco se ha estudiado en cuanto a la diversidad de bacterias en el sector forestal. Esa diversidad puede ser estudiada actualmente por medio de técnicas moleculares y con ello mejorar la asignación de especies. A la fecha no se han utilizado herramientas moleculares para la identificación de bacterias simbiotas asociadas a árboles leguminosos en Costa Rica.

Si bien es cierto han sido reportadas bacterias simbiotas relacionadas con raíces de leguminosas a nivel mundial y local, es escasa la literatura en relación a zonas tropicales y es más escasa aun utilizando técnicas moleculares.

El objetivo de este estudio fue realizar un levantamiento de bacterias a nivel molecular en ocho especies forestales leguminosas en Costa Rica. Así mismo, evaluar el efecto de los aislamientos bacterianos sobre variables morfométricas, respiración microbiana y actividad nitrogenasa al ser inoculadas en los hospederos de las cuales fueron aisladas. Con lo anterior se buscó observar el potencial de cada especie de bacteria para un posible uso como biofertilizante para el sector agroforestal.

Cabe resaltar que se presentó un artículo científico de tipo revisión con el marco teórico que se realizó para establecer esta investigación.

Artículo 1: Resumen Ejecutivo

Micorrizas y rhizobios: un diálogo molecular con el huésped vegetal

Estado: Aceptado para publicar en próximo número

Revista: Cultivos Tropicales (Cuba)

Recibido: 12/3/2021

Aceptado: 9/8/2021

Publicado: 17/2/2023 (Vol. 43(2): e13)

Resumen Ejecutivo: adicionalmente y en paralelo al estudio principal se presentó este artículo de revisión cuyo objetivo fue relacionar la similitud que tienen los rhizobios (Rhs) y los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en cuanto al mecanismo de penetración inicial.

Dentro de lo indicado por la literatura, los HMA aparecieron y Rhs simbiotes aparecieron hace 400 y 100 millones de años respectivamente. A lo largo del tiempo las relaciones que establecieron con hospederos fue diversificándose pero se cree que en cierto momento pudieron haberse originado uno del otro y por eso comparten, tanto huéspedes como mecanismos de penetración inicial.

En este artículo se hace una descripción del huésped al cual se le llamó el macrosimbionte y por su parte a los HMA y Rhs los microsimbiontes. En cada apartado se describió el mecanismo molecular por el cual se da la relación entre HMA/Rhs con el hospedero y como se dan ciertas similitudes al momento de percibir la señal por parte de los microsimbiontes. Aunque los huéspedes son los que controlan quien entra y quien no, cuando los microsimbiontes perciben la señal no discriminan en acercarse a las raíces.

Por mecanismos moleculares “llave-cerradura” que se da a nivel de membrana celular en las raíces, las plantas permiten la entrada de cierta especie de bacteria o micorriza, pero en ocasiones los microsimbiontes aprovechan que la “puerta se abre” para lograr ingresar. En ocasiones se establecen relaciones donde hay incluso hifo-bacterias interactuando con el huésped.

En esta revisión se recopiló un listado de estudios referentes a los microsimbiontes, a nivel de pre-colonización, colonización y mecanismo compartido debido a que incluso comparten genes comunes. Además, se realizaron figuras propias para lograr explicar ciertas interrelaciones que se dan entre HMA y Rhs.

Finalmente se presentó una propuesta de posibles genes candidatos comunes entre Rhs y HMA en los que se podría aplicar ingeniería genética y/o edición genómica, de tal forma que se optimice la relación huésped-microsimbionte.

Artículo 1: Micorrizas y rhizobios: un diálogo molecular con el huésped vegetal

Andrés Zúñiga Orozco^{1*}

<https://orcid.org/0000-0001-8214-4435>

Ayerin Carrodegua Gonzalez²

<https://orcid.org/0000-0001-5890-4174>

Laura Yesenia Solís-Ramos³

<https://orcid.org/0000-0002-8935-5507>

¹Escuela de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Estatal a Distancia. San Pedro, San José, Costa Rica

²Instituto de Investigaciones Hortícolas Lilliana Dimitrova, Mayabeque, Cuba.

³Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica. San Pedro, San José, Costa Rica

*Autor para correspondencia: azunigao@uned.ac.cr

RESUMEN

Los rhizobios (Rhs) y los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son microsimbiontes edáficos que se encuentran asociados a raíces de cultivos. Para los Rhs la mayoría de ellos son leguminosas y para los HMA hay un rango de hospedantes más amplio; sin embargo, hay cultivos que desarrollan la colonización por parte de ambos simbioses. En cualquiera de las relaciones simbióticas, los beneficios que reciben los cultivos al ser colonizados por estos microorganismos son variados y contribuyen al empleo de alternativas para la agricultura sostenible. El mecanismo por el cual ambos simbioses penetran en su huésped vegetal ha sido estudiado a nivel molecular y se han identificado genes comunes, así como las vías en las que intervienen. Algunos de estos genes se relacionan con la recepción de la señal mediada por los factores Nod, en el caso de los Rhs y por los factores Myc, en el caso de los HMA, otros están relacionados con el mecanismo de penetración y finalmente con la ruta por la cual se comunican el simbiote y la planta. En la presente revisión se realiza un listado de estudios referentes a los microsimbioses, a nivel de pre-colonización, colonización y mecanismo compartido. Se presenta una propuesta de posibles genes candidatos comunes para Rhs y HMA para aplicar ingeniería genética, de tal forma que se explore un campo de investigación que se denomina: optimización de genes. Por la similitud por la cual estos simbioses penetran en su huésped y por el potencial de modificación genética que esto supone, se describe una estrecha relación molecular, metabólica y fisiológica.

Palabras clave: rhizobio micorrizas arbusculares, ingeniería genética, simbiosis, genes

Recibido: 12/3/2021

Aceptado: 9/8/2021

ABSTRACT

Rhizobia (Rhs) and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are edaphic microsymbionts that are associated with crop roots. For Rhs most of them are legumes and for AMF there is a broader range of hosts; however, there are crops that develop colonization by both symbionts. In any of the symbiotic relationships, the benefits that crops receive when colonized by these microorganisms are varied and contribute to the use of alternatives for sustainable agriculture. The mechanism by which both symbionts penetrate their plant host has been studied at the molecular level and common genes have been identified, as well as the pathways in which they are involved. Some of these genes are related to signal reception mediated by Nod factors, in the case of Rhs, and by Myc factors, in the case of AMF, others are related to the penetration mechanism and finally to the pathway by which the symbiont and the plant communicate. In the present review, a list of studies referring to microsymbionts is made, at the level of pre-colonization, colonization and shared mechanism. A proposal of possible common candidate genes for Rhs and AMF to apply genetic engineering is presented, in such a way that a field of research called: gene optimization is explored. Due to the similarity by which these symbionts penetrate their host and the potential for genetic modification that this entails, a close molecular, metabolic and physiological relationship is described.

Keywords: rhizobia arbuscular mycorrhizae, genetic engineering, symbiosis, genes

INTRODUCCIÓN

La creación de bioeconomías sustentables enmarcadas en el concepto de economía circular demanda la optimización de recursos biológicos para mejorar la productividad agrícola. Los hallazgos encontrados durante los últimos 30 años, en cuanto a la simbiosis, el uso de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y rhizobios (Rhs), ha sido de gran interés por el impacto que tienen en la agricultura (1-3).

La simbiosis es la relación mutualista estrecha entre dos organismos, que tiene un efecto benéfico en la adaptación, ecología y evolución para ambas partes (4-6). Entre las relaciones simbióticas mutualistas más interesantes se encuentran las que se establecen entre hongos, bacterias y células vegetales (7). Los HMA y Rhs se originaron aproximadamente hace 400 y 100 millones de años respectivamente (8-12).

Los HMA pertenecen al phyla *Glomeromycota* y son organismos que colonizan entre el 70-90 % de las especies vegetales, algunos autores mencionan que colonizan todas las gimnospermas, 83% de dicotiledóneas y 79 % de monocotiledóneas (12,13); mientras los Rhs son más restringidas al clado FaFaCuRo (Fabales, Fagales, Cucurbitales y Rosales) (14-16).

Los HMA han recibido especial atención desde el punto de vista agrícola por los beneficios que proveen para las plantas; tales como, mayor resistencia a estreses bióticos y abióticos, aumento en la superficie de absorción de agua y nutrientes (11, 15), así como su uso en la bioremediación (17), entre otros. Por su parte, los rhizobios también son muy importantes por la habilidad de fijar nitrógeno atmosférico, incluso hay estudios que mencionan que podrían fijar la cantidad anual producida de amonio sintético (1,18).

En la actualidad, se ha promovido el uso natural de la simbiosis de bacterias fijadoras de nitrógeno en plantas leguminosas para disminuir la cantidad de nitrógeno aplicado a través de fertilizantes químicos, los cuales, pueden ocasionar eutroficación y disminuir la diversidad de microorganismos del suelo (3,19).

Los HMA penetran en el hospedante por el córtex del parénquima de las raíces más finas y en el interior de las células forman estructuras ramificadas llamadas arbusculos (20); mientras que los Rhs, penetran su hospedero a través de los pelos radiculares, realizan un plegamiento de los mismos hasta que se forma un tubo de infección en el que se desarrolla, en el extremo interno, el simbiosoma (21,22). Los mecanismos de colonización de HMA y Rhs tienen gran similitud, incluso al grado de activar y/o desactivar genes comunes. Para su estudio, se han utilizado especies de la familia de las leguminosas, las cuales pueden hospedar ambos microsimbiontes y como resultado acumulan mayor masa seca y tienen mayor superficie radical para la absorción de nutrientes (23).

Hay evidencia clara de la existencia de un mecanismo compartido en la colonización compartida que induce un tipo de autoregulación entre los microsimbiontes y que ocurre en una constante comunicación con la planta (24).

Por medio de estudios de la composición de comunidades de microorganismos se ha comprobado que diversos hábitats son capaces de albergar una gran diversidad biológica de HMA y Rhs (25), los cuales tienen aplicaciones en la agricultura. Además, recientemente se ha logrado un gran avance en cuanto a la secuenciación y los perfiles de expresión génica, lo que ha permitido dilucidar aspectos comunes que posee la colonización compartida entre HMA y Rhs (26-30).

Teniendo en cuenta los criterios escritos anteriormente, este artículo constituye una recopilación de una serie de evidencias científicas que reflejan la similitud del comportamiento en el proceso de colonización que realizan los HMA y los Rhs, ante las señales del huésped vegetal. De esta forma se considera esta recopilación de información un puente para definir nuevas líneas de investigación en ingeniería genética; por lo tanto, contribuir al estado del conocimiento en cuanto a genes candidatos que podrían modificarse a futuro haciendo más eficiente la relación entre a los Rhs y HMA con sus huéspedes vegetales.

El microsimbionte: los rhizobios

Las bacterias que forman parte de la microbiota del suelo están incluidas, principalmente, en los siguientes phyla: Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi (Chlorobacteria), Firmicutes y Proteobacteria (31,32). Las raíces, al crecer, incorporan depósitos orgánicos (células muertas + compuestos orgánicos) a nivel de la rizosfera, lo cual resulta en una rizodeposición que modifica la estructura y la composición poblacional de las bacterias. Consecuentemente, se reduce la diversidad, principalmente, de los phyla Acidobacterias, Proteobacterias y Actinobacterias (32).

Las bacterias son atraídas hacia su huésped por células de la rizodermis, rizodepósitos y el mucílago que es exudado en el extremo de las raíces. Ese mucílago está compuesto por ácidos orgánicos e inorgánicos, sideróforos, vitaminas, aminoácidos, purinas y nucleósidos, pero especialmente hay unos compuestos en particular: los flavonoides e isoflavonoides, que son los principales encargados de atraer a las bacterias hacia la planta (33,34). Los Rhs al percibir la señal comienzan a secretar un lipo-chito-oligosacárido (LCO) mediado por los factores Nod (NF, por sus siglas en inglés) (35,36,37). En el caso de los Rhs, el LCO interactúa con las hidrolasas NFH1 y CHIT5 emitidas por el huésped para preparar así el contacto con la membrana celular vegetal (38).

Por su parte, los Rhs colonizan a la planta, principalmente, por una infección tubular que se forma después de que los pelos radicales se pliegan en forma de bucle, aunque en menor medida, pueden acceder también por heridas, o a través de espacios intercelulares de forma independiente a los factores Nod (31).

Por lo tanto, el proceso de colonización de los Rhs en su huésped transcurre por varias etapas progresivas, que van desde la señalización inicial, la restricción del rango del hospedante, la colonización bacteriana, la autoregulación del número de nódulos (AON por sus siglas en inglés), la maduración bacteriana, la formación del simbiosoma, el desarrollo del metabolismo del nódulo y el transporte hasta que comienza la fase final de senescencia (18,38).

La correcta comunicación química entre bacteria-huésped depende de los factores Nod y de un acoplamiento adecuado con los receptores de la membrana vegetal. Este proceso es clave para desencadenar la colonización, la cual resulta, posteriormente, en un cambio en el gradiente de calcio en la membrana nuclear de la célula vegetal, lo cual será explicado más adelante.

El microsimbionte: los hongos micorrízicos arbusculares

Los HMA son organismos que inician su ciclo de vida a partir de un propágulo que puede ser una espora, un fragmento de hifa o de raíz colonizada. El propágulo germina estimulado por señales derivadas del hospedante potencial, aunque también puede germinar en ausencia de estas. Se produce una hifa de germinación que comienza a crecer en busca de un huésped y al encontrarlo se adhiere a las paredes del córtex de las raíces más finas (secundarias o terciarias) produciendo una estructura de sostén denominada apresorio. Posteriormente, penetra al interior del córtex sin atravesar el cilindro central y coloniza la planta intracelular y extracelularmente. Al acceder a las células atraviesa la pared celular, no así la membrana plasmática, ocurre una retracción del citoplasma y la hifa comienza a ramificarse para formar los arbusculos, que son las estructuras de intercambio entre el hongo y su huésped.

En la mayoría de especies de HMA se producen vesículas que son estructuras de reserva (39), sin embargo, las vesículas no están presentes en todas las especies de HMA, algunas como las pertenecientes a la familia *Gigasporaceae* pueden formar en su lugar estructuras denominadas células auxiliares, pero en el micelio externo y se reconoce que tienen similar función a las vesículas.

Los HMA tienen la particularidad de que son simbioses obligados por lo que requieren un hospedante para completar su ciclo de vida. Cuando encuentran uno, se reproducen aceleradamente e incluso se conoce que comparten varios hospedantes al mismo tiempo a través de una red conectiva de micelio extrarradical, por lo cual su diversidad funcional es alta y le permite tener gran adaptabilidad a diversas condiciones ambientales (40,41).

El hongo invagina las células corticales internas, donde produce una ramificación extensa convirtiéndose en una estructura que llena enteramente las células corticales (42). En consecuencia, la arquitectura de la célula hospedante cambia: el núcleo se mueve de una posición periférica a una central, la vacuola comienza a fragmentarse y una extensa membrana periarbuscular se sintetiza de forma continua a la membrana plasmática (43). A pesar de la intensa actividad de ambos simbioses que permite la formación de arbusculos en las células, éstos colapsan después de varios días, dejando la célula cortical intacta y lista para hospedar un nuevo arbusculo (42).

Existen varias situaciones que se presentan en la relación simbiote-planta, una de ellas es cuando el huésped tiene suficiente disponibilidad de nutrientes, en este caso, las vesículas, almacenan estructuras carbonadas como medio de sobrevivencia siendo muy similar en función a los gránulos de polihidroxibutirato que se presentan en los Rhs (44, 45). Tal es el caso del fósforo, puesto que la planta inactiva genes transportadores de este elemento cuando se presenta alta disponibilidad de éste nutriente (46).

Por otra parte, se ha encontrado que los arbusculos proveen de mayor cantidad de fósforo a los tejidos que le proveen mayor cantidad de carbono. Lo descrito anteriormente indica que puede existir un mecanismo de autoregulación por parte de la planta. Se ha encontrado que moléculas como lisofosfatidilcolina (LPC) podrían ayudar al huésped a percibir la concentración de fósforo en el suelo; sin embargo, se necesita profundizar en nuevas investigaciones al respecto, pues no está bien descrito en comparación a lo que sucede con los Rhs (47).

Otra de las características menos exploradas de los HMA es que tienen la capacidad de proteger las raíces del huésped de hifas patogénicas, ya que, crecen cerca de 100 veces más rápido que los pelos radiculares, lo que les permite una colonización más rápida del área de la raíz. Tal es el caso de la familia *Glomeraceae*, cuyas especies han mostrado alta tolerancia a *Fusarium* sp. y *Pythium* sp. (46), también es posible que exista un mecanismo molecular de interacción simbiótica aún inexplorado. Lo anterior se suma a muchos otros estudios enfocados en cuantificar la tolerancia a diversos patógenos como: *Alternaria*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia* y *Verticillium*, bacterias como *Ralstonia solanacearum* y *Pseudomonas syringae*, nemátodos de los géneros *Pratylenchus* y *Meloidogyne*) e incluso insectos como *Otiorynchus sulcatus* (48,49,50,51,52).

En cuanto a la colonización de los HMA en su huésped es importante señalar que sus propágulos se ven estimulados por flavonoides e isoflavonoides procedentes de las plantas, al igual que como sucede con los Rh; sin embargo, los HMA se estimulan también por sesquiterpenos como es el caso de las estrigolactonas, las cuales estimulan la ramificación de las hifas germinantes (53). Los flavonoides e isoflavonoides secretados por las plantas activan el proceso de germinación y el crecimiento hifal; y por su parte, los HMA comienzan a secretar un lipo-chito-oligosacárido (LCO) mediado por los factores Myc (35,36,37) y un oligómero de quitina de cadena corta o quitooligosacárido (COS) (54).

En respuesta a los factores Myc se ha registrado en las plantas el gen ENOD11 como responsable de codificar proteínas ricas en lisina en la membrana, por lo cual, de cierta forma, las plantas también se preparan para recibir a los HMA (55). Además, como se profundizará más adelante, el gen ENOD tiene cierta relación con los Rh.

Otros genes han sido identificados como necesarios para inducir la formación del apresorio de la membrana perihustorial tal es el caso de los genes DMI2 y DMI3 (18). De manera similar, se ha encontrado en hongos patógenos (*Magnaporthe oryzae* y *Colletotrichum inemuthianum*) un gen ortólogo relacionado con la penetración, denominado STE12 (56).

Finalmente, se conocen genes vegetales que codifican para transportadores de fósforo (PT3 y PT4), como responsables de asociarse con las hifas, además de un gen llamado Gmar-CuZnSOD que codifica para la superóxido dismutasa, que le brinda a la planta tolerancia a estrés oxidativo (57).

El macrosimbionte: el huésped vegetal y el mecanismo de colonización

En esta sección se realizará un recuento general de lo descrito para el mecanismo de colonización por Rhs, pues, aunque para los HMA ha sido descrito, aún faltan estudios relacionados con los genes involucrados y su regulación. No obstante, en la siguiente sección, se abordarán las similitudes entre ambas vías de colonización.

El papel que juega el huésped vegetal es trascendental en la atracción de Rhs y HMA, así como en la aceptación y en el mantenimiento de los microorganismos, ya que los simbioses se ven beneficiados por fuentes de carbono producidas por la planta, principalmente sacarosa, hexosas y almidón, en una especie de “comercio mutuo” entre Rhs-HMA-planta (38,39,42,58).

Primeramente, es importante describir cómo la planta realiza el proceso de atracción de las bacterias, dando paso a la pre-colonización o fase presimbiótica; en este paso están relacionados los genes CHS, CHR, FNS y IFS, que son responsables de producir los flavonoides e isoflavonoides, por parte de la planta (59,60,61). Algunos investigadores muestran evidencias de que las isoflavonas genisteína y diadzeína producidas por *Glycine max* y *Phaseolus vulgaris*, inducen la activación de los genes Nod en bacterias simbioses muy específicas de su especie, como son *Bradyrhizobium japonicum* y *Rhizobium leguminosarum* bv phaseoli (62).

Una vez que la planta percibe los factores Nod en la membrana, se activan genes que inducen la degradación de la pared celular y el plegamiento de los pelos radiculares para que los Rhs se alojen y se forme el tubo de colonización, en este proceso se han identificado los siguientes genes: NPL, FLOT2, FLOT4 y SYMREM1 (63,64,65).

Posterior al estímulo de los genes Nod y al plegamiento de los pelos radiculares, el huésped vegetal, percibe en los receptores de membrana la señal, estos receptores están codificados por los genes de pares ortólogos LjNFR1/MtLYK3 y LjNFR5/MtNFP, los cuales son receptores quinasas con tres dominios extracelulares de lisina (LysM) en el que forman un complejo homo y heteromérico entre la membrana celular y la de colonización (66,67,68). De acuerdo a lo anterior, se realiza la comunicación con los factores provenientes de las bacterias, a través del complejo LCO, además de la unión con las hidrolasas NFH1/CHIT5; esa interacción es el punto de entrada para desencadenar en el huésped un complejo de señalización interna, que da comienzo a la infección de los Rhs y en un segundo paso a la organogénesis.

Además, relacionado con la percepción de la señal, se ha registrado que las hormonas vegetales tienen un papel importante, ya que interactúan con los factores Nod y los procesos subsiguientes, tal es el caso de los brasinoesteroides con el gen BRI1 y las estrigolactonas con el gen CCD7, quienes colaboran en la progresión de la colonización por rhizobios, así como citoquininas y auxinas que inician el proceso de organogénesis. Las citoquininas se relacionan directamente con el TF NSP2 y las auxinas con el gen ARF16a, responsable de la regulación positiva en el proceso de colonización (69,70,71,72). Otros genes muy importantes y que se ha comprobado que silenciados reducen la colonización y la cantidad de nódulos, son los relacionados con giberelinas, estos genes codifican para las proteínas DELLA y estas proteínas, a su vez, interactúan con los TF IPD3 y NSP2, necesarios para la transcripción de NIN (iniciación del nódulo) (69).

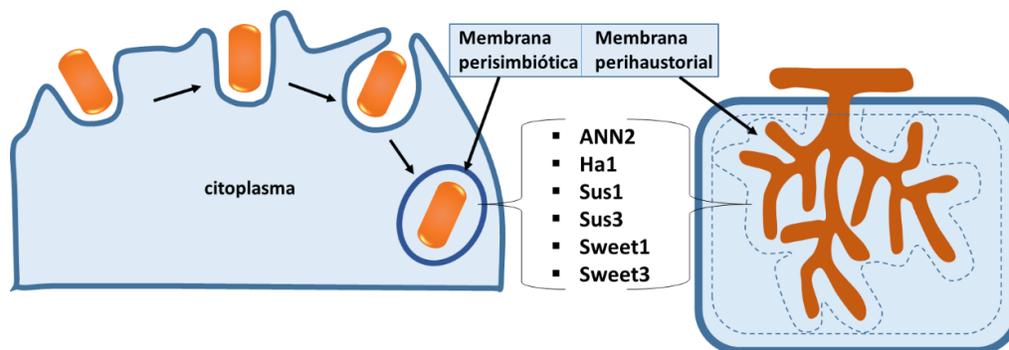
Posterior a la recepción de la señal en la membrana vegetal, se induce un gradiente de calcio en la membrana nuclear, lo cual reduce el potencial de ingreso del catión. Se ha registrado que existe afectación en los canales de calcio (LjCASTOR, LjPOLLUX/MtDMI1), MtCNGC a/b/c y su ortólogo LjBRUSH, así también como en nucleoporinas (LjNUP85 y LjNUP133), esto propicia que la quinasa MtDMI3/CCaMK y los factores de transcripción LjCYCLOPS/MtIPD3 regulen la expresión positiva del gen NIN, en conjunto con otros dos factores de transcripción llamados NSP1 y NSP2, encontrados en *M. truncatula* (22, 73, 74). NIN, en conjunto con los genes NF-YA y NF-YB, son de gran importancia porque son la señal de partida para que comience la organogénesis y la proliferación de los nódulos (38).

La planta tiene mecanismos para aceptar a los simbiositos, pero también emite una leve reacción de defensa intentando rechazar a los mismos (75), esta reacción se ha encontrado que es muy similar a la que se produce ante una afectación patogénica y, en consecuencia, se activan muchos genes comunes. Tal es el caso de *Sinorhizobium meliloti* que tiene la capacidad de inducir genes en el hospedante, similares a los que activa la planta cuando es atacada por *Pseudomonas syringae* (26). Lo que sucede a nivel molecular es que los complejos de receptores quinasas de defensa, tales como LRR-RLKs y LysM-RLKs, reconocen las moléculas de Rhs, al tiempo que producen proteínas de tipo NBS-LRR para neutralizar a las bacterias (76). Algunos genes del grupo NBS-LRR, tales como Rj2, Rfg1 y Rj4 están asociados con la restricción del hospedante a un rango de bacterias, debido a que codifican para la familia cinco de proteínas asociadas con patogénesis (77,78).

En el caso de los Rhs, los nódulos no pueden crecer indefinidamente, es por esta razón, que el hospedante trata de regular la cantidad y el momento de la colonización. Se han logrado identificar al menos cinco factores endógenos y exógenos principales que controlan la nodulación, los cuales, de una manera u otra, se encuentran relacionados. En primera instancia se presenta un mecanismo propio del huésped denominado “sistema de autorregulación (AON)”, mediado por un complejo de señalización inducido por las bacterias, también la cantidad de nitrógeno disponible en el suelo puede influir, la presencia del etileno en la rizosfera, el pH del suelo (principalmente ácido) y varios factores bióticos/abióticos, que pueden ocasionar estrés para la planta huésped y, en consecuencia, producir menos nódulos por un efecto de reducción de las fuentes carbonadas en el sumidero (58). Para el caso del mecanismo AON, los péptidos CLE1 y CLE2 en *M. truncatula*, sus homólogos RIC 1 y RIC 2 en *G. max* y *P. vulgaris* o los CLE-RS1 y CLE-RS2 en *Lotus japonicus*, son los responsables de enviar una señal al tallo de la planta para que se regule la cantidad de nódulos y, en consecuencia, en este órgano vegetal, se forme un complejo de receptores con el péptido para desencadenar una señal que vuelve a ser enviada a las raíces, para frenar el número de nódulos simbióticos (79,80,81,82).

El mecanismo de colonización compartido

Para entender el proceso de colonización, desarrollo y reproducción de los Rhs, inicialmente se trabajó con mutantes que nodulaban poco o no lo hacían. En estos experimentos la idea fue evaluar el comportamiento del huésped vegetal en ausencia o expresión de uno o varios genes (83). En este tipo de experimento se observó una afectación en cuanto a la actividad y capacidad colonizativa de los HMA. Lo anterior llevó a pensar a los investigadores que, de alguna manera, el mecanismo por el cual se abrían paso los microsimbiontes, era más que anatómico-fisiológico y se podría encontrar su origen a nivel molecular (83,84,85). Era de esperar encontrar genes comunes ya que estos microorganismos simbioses comparten un mecanismo de entrada en la planta muy similar en el estado previo a ingresar en su huésped, el cual se encuentra separado por una membrana perisimbótica altamente especializada (86). En los Rhs se forma una estructura llamada simbiosoma (87) y en los HMA se conoce como membrana perihaustral, que es la que rodea los arbúsculos (18). Es a través de esas membranas donde ocurre el intercambio de nutrientes con el huésped (88,89) y se ha encontrado a los genes HA1 y ANN2 en la planta modelo *Medicago truncatula*, como responsables de acidificar la membrana perisimbótica y perihaustral, probablemente para facilitar el transporte cruzado entre huésped-simbionte en el caso de HA1 y ANN2 como un inductor del primordio de nodulación, así como de células que contienen arbúsculos (90) (Figura 1).



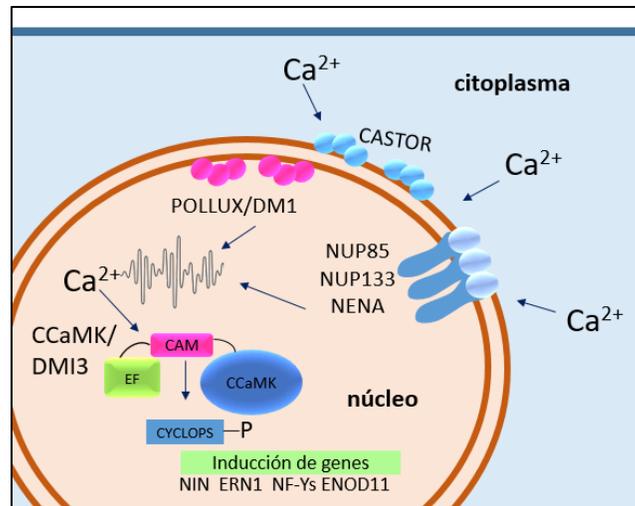
Fuente propia

Figura 1. Genes responsables de acidificar la membrana perisimbótica y perihaustral (ANN2 y Ha1) y genes responsables de transportar glucosa (Sweet1 y Sweet3) e hidrolizar sacarosa (Sus1 y Sus3)

En cuanto al transporte de fuentes de carbono desde el huésped hacia los simbioses se ha encontrado en *Medicago truncatula* que *Sus1* y *Sus3* son genes presentes, tanto en HMA como en Rhs, los cuales codifican para la sacarosa sintasa, cuya responsabilidad es hidrolizar fuentes como sacarosa y almidón (91). En el caso de los HMA se expresa el gen *SWEET1b* que codifica para un transportador de glucosa desde el huésped a la membrana periarbuscular, lo que se convierte en un factor importante para el crecimiento intraradical del micelio, así como la proliferación de bacterias (Figura 1). Los genes *SWEET* incluso han sido identificados en hongos y bacterias patogénicas (92).

Aunque el mecanismo por el cual se desarrollan las estructuras de los HMA y Rhs son distintos, en el proceso inicial de la percepción, colonización y el posterior complejo de traducción de señales que da inicio a la nodulación y la micorrización en leguminosas, son muy similares y se pueden incluso solapar. Los genes que se comparten a nivel del proceso de colonización son denominados genes comunes *SYM* (18), haciendo alusión al proceso de simbiosis. Algunos investigadores han realizado un resumen de al menos siete genes *SYM* (*SYMRK*, *CASTOR*, *POLLUX*, *SYM3*, *SYM6*, *SYM15* y *SYM24*), entre ellos quinasas receptoras, canales putativos de proteínas y nucleoporinas, los cuales son necesarios para la entrada en la epidermis vegetal en ambos simbioses (93,94,95). *NUP85* y *CYCLOPS* también han sido informados (16). En otros cultivos diferentes a las leguminosas, como es el caso de arroz (*Oryza sativa* L.), se ha reportado también genes comunes para Rhs y HMA, tales como *CASTOR*, *POLLUX*, *DMI3/CCaMK* y *CYCLOPS* (96) (Figura 2).

A pesar de que hay genes *SYM* que comparten los Rhs y los HMA, es importante destacar que ambos simbioses desarrollaron formas diferentes para colonizar en su huésped. En el caso de los Rhs, forman un tubo que va penetrando las células y en el caso de los HMA un aparato de pre-penetración o apresorio. Algunos investigadores sugieren que el apresorio está relacionado con factores transcripcionales de los genes *ENOD11* y *ENOD12* que, a su vez, son inducidos por los Rhs (97). Posteriormente otros investigadores encontraron que los *ENOD* son claves para la colonización y la organogénesis en Rhs y son regulados por *ERN1* (Factor de respuesta de etileno requerido para la nodulación 1) (55).

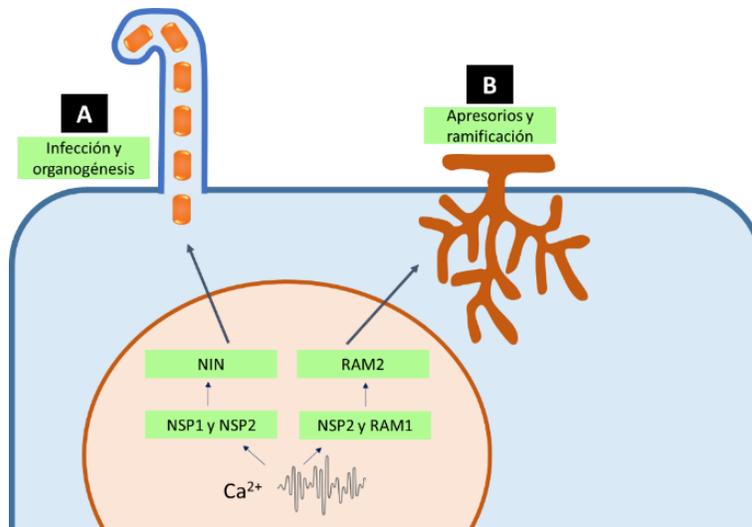


Fuente propia

Ruta compartida por la colonización de Rhs y HMA

Figura 2. Genes que codifican para los transportadores de calcio (CASTOR, POLLUX/DM1, NUP85, NUP133, NENA) dentro del núcleo celular vegetal e inducción de una gradiente del catión

Por otra parte, ambos simbiontes, tal como se mencionó anteriormente, requieren comunicarse con las raíces del huésped para poder desarrollar el proceso simbiótico. En esta comunicación se mencionó que se activan los genes Nod (en Rhs) y Myc (en HMA), los cuales logran producir un LCOs y LCOs+COS, respectivamente. Algunos hongos formadores de micorrizas como *Rhizophagus irregularis* producen LCOs sulfatados muy similares a los LCOs emitidos por los factores Nod de la bacteria *Sinorhizobium meliloti* en la planta *M. truncatula*. Esto provoca, en paralelo, que la planta “crea” que será colonizada por Rhs, cuando en realidad será por un HMA, ocasionando así la curvatura de los pelos radicales y la proliferación de raíces laterales (36). A nivel molecular, este acontecimiento desencadena que la leguminosa active el factor de transcripción NSP1 (Ruta de señalización para la nodulación) requerido para la nodulación y el gen RAM1 (Requerido para la micorrización arbuscular) requerido para la colonización por HMA (98, 99) (Figura 3).



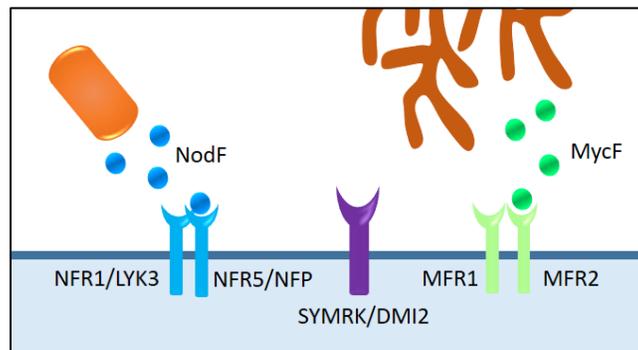
Fuente propia

A: en el primer caso, se dispone la activación de NIN para continuar con la colonización y la organogénesis de los nódulos **B:** en el segundo caso se promueve la ramificación de las hifas

Figura 3. Inducción del mecanismo de aceptación del huésped vegetal al exponerse a Rhs y HMA

Otro mecanismo de percepción de la señal externa y que, además, interactúa con los factores Nod/Myc es llevado a cabo por hormonas, tal es el caso de los brasinoesteroides, con el gen BRI1 y las estrigolactonas con el gen CCD7, los cuales están implicados en la señalización de la simbiosis entre Rhs/HMA (69,70). Las proteínas DELLA, relacionadas con las giberelinas, también participan en la regulación de la expresión negativa de genes inducidos por los factores Nod para Rhs/MA y esto se manifiesta en la relación estrecha que presentan con los TF IPD3 y NSP2 (100).

A nivel de receptores del huésped, los receptores LjNFR1/MtLYK3 y LjNFR5/MtNFP de la membrana vegetal, perciben el estímulo de los factores Nod. Sin embargo, existe un tercer gen que codifica para un tipo de receptor similar llamado LjSYMRK y su ortólogo MtDMI2. Estos últimos cumplen la misma función, puesto que son del tipo SYM, lo que quiere decir que logran percibir el estímulo, tanto de los HMA, como de los Rhs (Figura 4) (101,102). El gen LjSYMRK/MtDMI2 fue el primero encontrado como común para la simbiosis de HMA y Rhs. También los receptores MFR1 y MFR2 son específicos de los HMA.



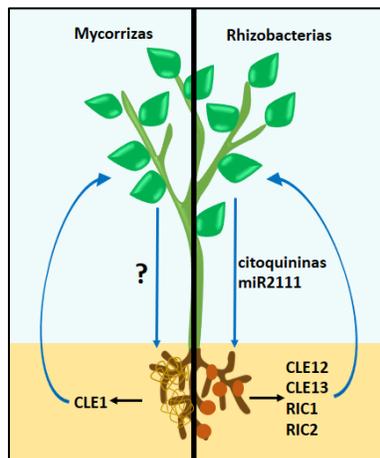
Fuente propia

Figura 4. Genes que codifican para los receptores vegetales involucrados con el reconocimiento de los factores de nodulación y colonización en Rhs y HMA

Una vez percibido el estímulo y dentro del núcleo celular del huésped, se induce una despolarización de la membrana celular y un cambio en el flujo de iones, especialmente de calcio en la membrana nuclear. Este proceso fue descrito anteriormente y, de acuerdo con lo mencionado, quedó demostrada la similitud entre Rhs y HMA, pues el calcio es modulado por los genes DMI1 y NENA, que son compartidos entre Rhs y HMA. DMI1 está relacionado con un canal transportador de Ca^{2+} y NENA con una proteína transportadora por nucleoporinas, ambos afectan en igual medida la infección de los simbiosites (74). Posterior a la despolarización de Ca^{2+} en Rhs, se produce en paralelo una formación de complejos entre proteínas GRAS como factores de transcripción (NSP1, NSP2), en conjunto con los RAM1 y RAM2, los cuales inducen la biosíntesis de monómeros de cutina y están relacionados con la formación de apresorios en HMA (Figura 3).

Otro hecho relevante y que es compartido por los Rhs y HMA es la presencia de hormonas específicas como las proteínas CLE, las cuales actúan como mediadores de la comunicación entre célula-célula en las plantas y están claramente identificadas en *M. truncatula*, así como sus homólogos en otras especies de leguminosas. Específicamente, son las moléculas que le comunican a los brotes para que envíen una señal a las raíces, indicando detener la colonización por bacterias (80,81) (Figura 5). Sin embargo, estos péptidos también son incorporados en las raíces, a través de los HMA, para modular la arquitectura radicular, favoreciendo el crecimiento lateral e inhibiendo el apical (103). Lo anterior, de alguna manera, hace pensar que pueda haber una implicación directa o indirecta en la regulación de la infección por Rhs, mediada por los HMA, ya que, en condiciones de una colonización dual, los péptidos CLE activarán el mecanismo de regulación en las plantas para no permitir más colonización.

Algunos investigadores reportan disminución en la presencia de Rhs por inoculación de HMA (104). En otros estudios, por el contrario, se ha realizado y cuantificado la infección dual por inoculación con Rhs/HMA *versus* inoculación individual y se ha encontrado que, a pesar de que los HMA pueden activar el mecanismo AON por medio de los péptidos CLE, no son suficientes para reducir la infección por Rhs; de hecho, se han visto incluso reducidas en cuanto a la cantidad de hifas en el tejido de su huésped y son más eficientes cuando se inoculan en conjunto con Rhs (23,105,106,107). Lo descrito anteriormente expone cómo no solamente existe una regulación de los simbiontes por parte de la planta; sino que también se da a nivel de los propios microorganismos; sin embargo, no tiene la magnitud suficiente y más bien conviven con su huésped.



Fuente propia

CLEI también es incorporado por HMA, resultando en ramificación de las raíces secundarias

Figura 5. Péptidos CLE enviados desde los nódulos a los brotes y estos, a su vez, activan el mecanismo AON para regular la cantidad de los mismos

Por otra parte, los Rhs tienen un compuesto característico y abundante: las leghemoglobinas, cuya función es proteger a las bacterias de la entrada de oxígeno para que la nitrogenasa pueda realizar la fijación biológica de nitrógeno atmosférico (21). El gen Vflb29 es el responsable de producir las proteínas necesarias para la leghemoglobina. Este gen se expresa de igual manera cuando hay infección por HMA, debido a que la expresión del promotor de un gen que codifica para un transportador de fósforo (StPt3), activa la expresión de Vflb29 (18,108).

Con la llegada de nuevas tecnologías, como los estudios de expresión génica, a través del transcriptoma, se han logrado dilucidar los genes que se activan o silencian cuando una planta es colonizada por HMA, Rhs o ambos. Los primeros estudios en esta temática encontraron 75 genes regulados “corriente arriba” (hacia el extremo 5´) durante el evento de colonización dual (90).

Posteriormente, otros investigadores compararon perfiles diferenciados de expresión de genes (DEGs), y se encontró expresión génica “corriente arriba/corriente abajo” (hacia el extremo 5´/hacia el extremo 3´), siendo 288/233 genes comunes para HMA y Rhs (27). En este estudio se encontraron perfiles de expresión cuantitativa de genes en tres etapas: procesos biológicos (PB), función molecular (FM) y componentes celulares (CC). De acuerdo a lo anterior, en PB se obtuvo alta frecuencia de genes relacionados con procesos metabólicos, rutas energéticas, traducción de señales, transporte y respuesta al estrés; para la etapa FM genes relacionados con enzimas de actividad catalítica como la hidrolasa, oxidoreductasa, proteínas quinasas y actividad transferasa y, finalmente, para la etapa CC, se encontraron genes para la pared celular y la membrana plasmática. En resumen, los genes se agruparon en tres conglomerados de expresión, según los procesos involucrados y se determinó que, tanto los HMA como los Rhs, comparten genes involucrados en los procesos de defensa, la estructura de la pared celular y el metabolismo de N y P (27).

Finalmente, los estudios aquí presentados no necesariamente describen la totalidad de la diversidad de expresión de genes, pues se han realizado en especies modelo y cada huésped vegetal interactúa de forma singular con su(s) simbiote(s). En algunos casos se han inoculado varias especies vegetales con un mismo HMA y se han obtenido respuestas metabólicas similares, a este mecanismo se le conoce como especie-independiente. Por ejemplo, al inocular varias especies vegetales con el hongo *Rhizophagus irregularis* se observó un cambio en el metaboloma de entre 18 - 45 % en todas las especies inoculadas (109,110). También se ha registrado una asociación especie-dependiente, es decir, al inocular con un hongo varias especies vegetales se ha obtenido únicamente un cambio en el metaboloma de una sola especie (111).

El proceso de colonización de los HMA a nivel molecular aún no está esclarecido, por lo cual es necesario profundizar al respecto. En perspectivas futuras, los estudios de expresión de genes y edición de genomas serán clave para dilucidar el mecanismo de la simbiosis dual, a nivel de señalización temprana y colonización temprana, los cuales permitirán a su vez en el caso de los HMA, aclarar cada proceso a nivel molecular.

La ingeniería genética como proa del desarrollo biotecnológico de los hma y los Rhs

Con el advenimiento de nuevas tecnologías y herramientas en el campo de la ingeniería genética, existe una tendencia a desarrollar proyectos en esta línea, debido a que cada vez que un estudio se publica, se abren más interrogantes y posibilidades de realizar modificaciones en numerosos campos. En cuanto a los Rhs es importante destacar el potencial que existe en cuanto a la modificación de la aceptación de una bacteria por parte del huésped vegetal.

Según lo mencionado y de acuerdo a lo descrito durante este documento, se han registraron genes del grupo NBS-LRR, tales como Rj2, Rfg1 y Rj4 que están asociados a la restricción del hospedero a un rango de bacterias, debido a que codifican para la familia 5 de proteínas asociadas con patogénesis (77,78) y esto es motivo de atención para una posible modificación de estos genes. Un grupo de investigadores realizaron las primeras aproximaciones, utilizando CRISPR/Cas9 para aumentar la colonización de cepas incompatibles con soya (*Glycine max*) (78).

Otra investigación (112), en la que se realizó la modificación de los péptidos NCR (nódulo rico en cisteína) fue informada. Estas moléculas tienen un papel importante en la restricción de Rhs y esto le permitió a *M. truncatula* ser colonizada por una cepa de Rhs poco infectiva hasta entonces (103). Finalmente, existe también la posibilidad de modificar los receptores LjNFR1/MtLYK3 y LjNFR5/MtNFP, ya que alteran el grado y la especificidad en que una especie de Rhs logra colonizar al huésped vegetal (113).

Los criterios señalados indican que existe la posibilidad de que diferentes especies vegetales puedan ser colonizadas por más de una cepa de Rhs, aunque puede existir cierta especificidad entre el genoma vegetal y bacteriano, contribuyendo a optimizar la expresión de cada gen. A pesar de lo anterior, también debe asumirse una posición cautelosa para que el balance hacia la planta o el ecosistema sea siempre positivo, sin embargo, constituye una línea de investigación interesante.

Otro aspecto a considerar es el uso de la transformación genética con el propósito de transferir genes de unas especies de Rhs a otras, en la búsqueda de mejorar la eficiencia de la colonización del huésped. Se ha registrado transferencia de genes Nod de unas bacterias a otras; por ejemplo, de *Rhizobium leguminosarum* a *Rhizobium phaseoli* para que estas últimas colonicen arvejas (*Pisum sativum*), además de frijoles (*Phaseolus vulgaris*) (114). Por medio de esta tecnología también se abre la posibilidad de transferir genes Nif (fijación de nitrógeno).

La transformación genética puede llevarse a cabo por métodos directos o indirectos. En este caso utilizar métodos indirectos por medio de *Agrobacterium* sería lo indicado, debido a que comparte mucha similitud con los Rhs de leguminosas.

Además de la transformación genética a nivel de bacteria, podría considerarse la transformación a nivel de huésped. Los genes candidatos para este fin son: Rj2, Rfg1 y Rj4 del grupo de los NBS-LRR y los relacionados con los receptores NFR1/LYK3 y NFR5/NFP (alteran el grado y la especificidad en que una especie de Rh logra colonizar al huésped vegetal).

Siguiendo la línea de los Rhs, existe la posibilidad de modificar la enzima nitrogenasa (NifH, NifD, NifK, NifE y NifN), la cual está constituida de una subunidad larga compuesta por Molibdeno-Hierro y una pequeña compuesta por una proteína férrica o reductasa dinitrogenasa. Esta última, se acopla a un complejo de Mg-ATP que entrega energía y dona electrones para la reducción de nitrógeno (114). Esta enzima se ha identificado en la mayoría de las especies de leguminosas infectadas por Rhs, razón por la cual puede ser de especial atención para su modificación genética. El principal objetivo sería hacerla más eficiente mejorando el acoplamiento con Mg-ATP e incrementando la reducción de nitrógeno. Lo anterior provocaría una mayor entrega de amonio (principalmente) a la planta.

Por otra parte, el molibdeno, así como el hierro y el azufre son importantes para la nitrogenasa. Un grupo de investigadores identificaron que los genes MOT1.2/1.3 están relacionados con transportadores que se encuentran en la membrana plasmática de las células endodermales los cuales encierran las ramificaciones vasculares del nódulo y estas modulan la entrada, así como la distribución de Mo en las células (115). Aún falta por determinar cómo el Mo es transportado al simbiosoma (38), pero esos genes son candidatos para ser estudiados y descifrar la posibilidad de hacer la subunidad Mo-Fe de la nitrogenasa más eficiente.

Los transportadores de calcio (NENA, CASTOR, POLLUX, NUP85, NUP133, DMI3 y DMI1) también son susceptibles de ser modificados, de tal forma que el gradiente de calcio que se produzca en el núcleo sea motivo de una mayor transcripción de respuesta de la colonización. Resulta importante destacar que, independientemente del transportador que se elija modificar, lo que debe buscarse es la optimización del proceso; es decir, no exceder los límites que la planta pueda tolerar para no causar un desequilibrio en términos de balance energético.

En cuanto a los HMA el uso más común es la extracción de sus propágulos del suelo para inocular *ex-situ* y de esta forma incrementar la cantidad de este tipo de hongo en suelos agrícolas, esto se lleva a cabo debido a que los HMA son poco específicos y pueden colonizar varios hospederos, registrándose así muchos estudios al respecto (116). La identificación de especies nuevas a través de la metagenómica puede apoyar la típica inoculación *ex-situ*; recientemente se encontró especies nuevas en ambientes tan inhóspitos como desiertos y podrían ser utilizados en diversos cultivos para incrementar sus rendimientos (117). Además, la secuenciación de los HMA podría brindar nuevos descubrimientos en cuanto a genómica y transcriptómica referentes al mecanismo de infección que comparten con los Rhs.

El uso de la ingeniería genética tiene un gran potencial para la agricultura, pero se necesita la secuenciación de especies para identificar y modificar la expresión de genes de interés. Sin embargo, este aspecto ha sido poco investigado y solamente se ha secuenciado *R. irregularis*, en un estudio, donde se realiza una recopilación de genes de interés que pueden ser modificados en esta especie (109). Por su parte, algunos investigadores sugieren utilizar, inicialmente, la información obtenida en otros hongos como *Aspergillus niger* y *Penicillium chrysogenum* en cuanto a promotores y factores de transcripción (118).

Debido a que la mayoría de HMA no se reproducen sexualmente, convierte a estos organismos en altamente prometedores al utilizar ingeniería genética y biología sintética, ya que los genes que se introduzcan difícilmente se incorporarán de forma cruzada en otras especies (119). Además, este tipo de hongos tiene gran importancia en la fitoremediación de suelos contaminados con metales pesados, puesto que hay registros científicos de la posibilidad de mejorar la expresión de genes que codifican para proteínas quelatantes como fitoquelatinas y metalotioneinas, así como metabolitos como oxalato, los cuales desactivan la toxicidad por metales pesados (109,120).

A pesar de los beneficios brindados por los HMA mencionados en esta revisión, no es suficiente la investigación que se ha realizado en genética molecular para incrementar los efectos benéficos de estos hongos. Primeramente, la investigación futura debe enfocarse en temas básicos como identificación y expresión de genes que puedan afectar el crecimiento y el metabolismo de las plantas. Por otra parte, con estudios de metagenómica, caracterizar la diversidad que existe en el ambiente edáfico, para de esta forma contar con una amplia variedad de opciones en cuanto a futuras aplicaciones que podrían ser provechosas para el ser humano y los diferentes ecosistemas.

CONCLUSIONES

- Los microsimbiontes (Rhs y HMA) se orientan a su huésped por la señal emitida por las raíces del mismo. Al percibir la señal, ambos microsimbiontes comienzan a activar genes que secretan compuestos que se ligan con la membrana de su huésped para, a su vez, activar el mecanismo de aceptación y acoplamiento por parte de la planta.
- La planta configura su anatomía, expresando genes que le permiten a los microsimbiontes colonizar e intercambiar compuestos químicos en un proceso de comunicación continuo, a través de la membrana perisimbótica y periaustorial para el caso de Rhs y HMA, respectivamente.
- Los genes comunes tienen gran potencial para ser candidatos de modificación genética y de esta forma hacer más eficiente la colonización, ya sea por una o varias especies de microsimbiontes. Es importante evaluar cuando la eficiencia máxima se alcanza de forma individual o con un conjunto de especies/cepas.
- A pesar de que la mayoría de los HMA son complejos de secuenciar por su dificultad de cultivo a nivel de laboratorio, es necesario llevar a cabo este tipo de estudios, así como aprovechar tecnologías actuales, como la metagenómica, para identificar especies y los genes relacionados con las vías de colonización, regulación y expresión. Una vez esclarecidos, se podrán identificar nuevos genes comunes a ambos simbiontes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gruber N, Galloway JN. An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature* 2008;451,293-296.
2. Sakamoto K, Ogiwara N, Kaji T. Involvement of autoregulation in the interaction between rhizobial nodulation and AM fungal colonization in soybean roots. *Biol Fertil Soils*. 2013;49:1141-1152
3. Foyer CH, Lam HM, Nguyen HT, Siddique KH, Varshney RK, Colmer TD, et al. Neglecting legumes has compromised human health and sustainable food production. *Nat Plants*. 2016;2(2):16112. doi: 10.1038/nplants.2016.112.
4. Wade MJ. The co-evolutionary genetics of ecological communities. *Nat. Rev. Genet*. 2007;8,185-195. doi: 10.1038/nrg2031.
5. Gilbert SF, Bosch TCG, Ledón-Rettig C. Eco-Evo-Devo: developmental symbiosis and developmental plasticity as evolutionary agents. *Nat. Rev. Genet*. 2015;16,611–622. doi: 10.1038/nrg3982.
6. Kiers ET, West S. Evolving new organisms via symbiosis. *Evolutionary Biology*. 2015;348(6233):392-394.
7. McFall-Ngai M, Hadfield MG, Bosch TCG, Carey HV, Domazet-Lošo T, Douglas AE, et al. Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013;110:3229-3236. doi: 10.1073/pnas.1218525110
8. Simon L, Bousquet J, Lovesque RC, Lalonde M. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature*. 1993;363:67-69.
9. Remy W, Taylor TN, Hass H, Kerp H. Four hundred million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:11841-11843.
10. Doyle J. F. Phylogenetic perspectives on the origins of nodulation. *Mol Plant Microbe Interact*. 2011;24(11):1289-95. doi: 10.1094/MPMI-05-11-0114.
11. Lum MR, Hirsch AM. Roots and their symbiotic microbes: Strategies to obtain nitrogen and phosphorus in a nutrient limiting environment. *J Plant Growth Regul*. 2003;21:368-382.
12. Kennedy AC, de Luna LZ. Rhizosphere: Mycorrhizal Associations. In: *Encyclopedia of soils in the environment*. Elsevier Ed. 2005. p. 399-406

13. Schüßler A, Schwarzott D, Walker C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological research*. 2011;105:1413-1421.
14. Kistner C, Parniske M. Evolution of signal transduction in intracellular symbiosis. *Trends Plant Sci*. 2002;7:511-518.
15. Vessey JK, Pawlowski K, Bergman B. Root-based N₂-fixing symbioses: legumes, actinorhizal plants, *Parasponia* sp. and cycads. In: *Root physiology: from gene to function*. Springer Ed. 2005 p. 51-78.
16. Parniske M. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat. Rev. Microbiol*. 2008;6:763-775. doi: 10.1038/nrmicro1987
17. Solís-Ramos L, Coto-López C, Andrade-Torres A. Role of arbuscular mycorrhizal symbiosis in remediation of anthropogenic soil pollution. *Symbiosis*. 2021. doi: 10.1007/s13199-021-00774-4
18. Manchada G, Garg G. Endomycorrhizal and rhizobial symbiosis: How much do they share? *Journal of Plant Interactions*. 2007;2(2):79-88.
19. Matson PA, Parton WJ, Power AG, Swift MJ. Agricultural intensification and ecosystem properties. *Science*. 1997; 277: 504–509. doi: 10.1126/science.277.5325.504.
20. Bonfante P, Genre A. Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nat. Commun*. 2010;48:1-11 doi: 10.1038/ncomms1046
21. Li X, Feng H, Wen J, Dong J, Wang T. MtCAS31 aids symbiotic nitrogen fixation by protecting the leghemoglobin MtLb120-1 under drought stress in *Medicago truncatula*. *Front. Plant Sci*. 2018;9:633. doi: 10.3389/fpls.2018.00633
22. Kim G-B, Son S-U, Yu H-J, Mun J-H. MtGA2ox10 encoding C20-GA2-oxidase regulates rhizobial infection and nodule development in *Medicago truncatula*. *Sci. Rep*. 2019;9(1):5952. doi: 10.1038/s41598-019-42407-3
23. Sakamoto K, Ogiwara N, Kaji T, Sugimoto Y, Ueno M, Sonoda M, et al. Transcriptome analysis of soybean (*Glycine max*) root genes differentially expressed in rhizobial, arbuscular mycorrhizal, and dual symbiosis. *Journ. Plant. Research*. 2019;132:541-568.
24. Sakamoto K, Nohara Y. Soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) shoots systemically control arbuscule formation in mycorrhizal symbiosis. *Soil Sci Plant Nutr*. 2009;55:252–257.

25. Gill A, Purnell K, Palmer M, Stein J, McGuire K. Microbial composition and functional diversity differ across urban green infrastructure types. *Frontiers in Microbiology*. 2020;11:912. doi: 10.3389/fmicb.2020.00912
26. Bozsó Z, Maunoury N, Szatmari A, Mergaert P, Ott P, et al. Transcriptome analysis of a bacterially induced basal and hypersensitive response of *Medicago truncatula*. *Plant Mol Biol*. 2009;70:627-646. doi: 10.1007/s11103-009-9496-8
27. Nanjareddy K, Manoj-Kumar A, Gómez B-M, Blanco L, Lara M. Differentially expressed genes in mycorrhized and nodulated roots of common bean are associated with defense, cell wall architecture, N metabolism, and P metabolism. *PLoS ONE*. 2017;12(8): e0182328. doi: 10.1371/journal.pone.0182328
28. Mohammadi-Dehcheshmeh M, Niazi A, Ebrahimi M, Tahsili M, Nurollah Z, Ebrahimi R, et al. Unified Transcriptomic Signature of Arbuscular Mycorrhiza Colonization in Roots of *Medicago truncatula* by Integration of Machine Learning, Promoter Analysis, and Direct Merging Meta-Analysis. *Frontiers in Plant Science*. 2018;9:1550. doi: 10.3389/fpls.2018.01550
29. Tromas A, Parizot B, Diagne N, Champion A, Hocher V, Cissoko M, et al. Heart of Endosymbioses: Transcriptomics Reveals a Conserved Genetic Program among Arbuscular Mycorrhizal, Actinorhizal and Legume-Rhizobial Symbioses. *PLoS ONE*. 2012;7(9): e44742. doi: 10.1371/journal.pone.0044742
30. Barea JM, Azcón-Aguilar C, Azcón, R. Interactions between mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms within the context of sustainable soil plant systems. In: Gange AC, Brown C, editors. *Multi trophic interactions in terrestrial systems*. Blackwell Science Press; 1997. p. 65-77.
31. Sprent JI, James EK. Legume evolution: Where do nodules and mycorrhizas fit in? *Plant Physiol*. 2007;144:575-581.
32. Zgadzaj R, Garrido-Oter R, Jensen DB, Koprivova A, Schulze-Lefert P, Radutiou, S. Root nodule symbiosis in *Lotus japonicus* drives the establishment of distinctive rhizosphere, root, and nodule bacterial communities. *PNAs*. 2016;113(49):7996-8005. doi: 10.1073/pnas.1616564113.

33. Ferguson B, Indrasumunar A, Hayashi S, Lin M-H, Lin Y-H, Reid DE, et al. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2010;52:61-76.
34. Sprent JI, Ardley J, James EK. Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. *New Phytologist*. 2017;215,40-56.
35. Dénarié J, Debellé F, Promé J-C. Rhizobium lipo-chitoooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu Rev Biochem*. 1996;65:503-535.
36. Maillet F, Poinot V, André O, Puech-Páges V, Haouy A, Gueunier M, et al. Fungal lipochitoooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature*. 2011;469:58-63. doi: 10.1038/nature09622
37. Persson T, Battenberg K, Demina IV et al (2014) Candidatus Frankia Datiscae Dg1, the actinobacterial microsymbiont of *Datisca glomerata*, expresses the canonical nod genes nodABC in symbiosis with its host plant. *PLoS ONE* 10:e0127630–e0127630
38. Roy S, Liu W, Sekhar R, Crook A, Mysore K, Pislariu C, et al. Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation. *The Plant Cell*. 2020;32:15-41. doi:10.1105/tpc.19.00279
39. Solís-Ramos LY, Andrade-Torres A. Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Tropical Ecosystems Towards its Management? *Agri Res & Tech: Open Access J*. 2020, 24(4): 556279.
40. Croll D, Giovannetti M, Koch AM, Sbrana C, Ehinger M, Lammers PJ, et al. Nonself vegetative fusion and genetic exchange in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytol*. 2009;181,924-937.
41. den Bakker HC, VanKuren NW, Morton JB, Pawlowska TE. Clonality and recombination in the life history of an asexual arbuscular mycorrhizal fungus. *Mol. Biol. Evol*. 2010;27:2474-2486.
42. Paszkowski, U. A journey through signaling in arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytol*. 2006; 172(1):35-46.
43. Harrison, M.J. Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Ann Rev Plant Physiol and Plant Mol Biol*. 1999 50:1:361-389

44. Johnson NC, Rowland DL, Corkidi L, Egerton-Warburton LM, Allen E.B. Nitrogen enrichment alters mycorrhizal allocation at five mesic to semiarid grasslands. *Ecology*. 2003;84: 1895-1908.
45. Johnson N.C. Resource stoichiometry elucidates the structure and function of arbuscular mycorrhizas across scales. *New Phytol*. 2010;185: 631-647.
46. Maherali H, Klironomos JN. Influence of phylogeny on fungal community assembly and ecosystem functioning. *Science*. 2007;316:1746–1748.
47. Ford E, Toby K. Life Histories of Symbiotic Rhizobia and Mycorrhizal Fungi. *Current Biology*. 2011;21, 775-785. doi: 10.1016/j.cub.2011.06.018
48. Garcia-Garrido JM, Ocampo JA. Effect of VA mycorrhizal infection of tomato on damage caused by *Pseudomonas syringae*. *Soil Biol. Biochem*. 1989;21,165-167. doi: 10.1016/0038-0717(89)90027-8
49. de la Peña E, Echeverría SR, van der Putten WH, Freitas H, Moens M. Mechanism of control of root-feeding nematodes by mycorrhizal fungi in the dune grass *Ammophila arenaria*. *New Phytol*. 2006;169, 829-840. doi: 10.1111/j.1469-8137.2005.01602.x
50. Fritz M, Jakobsen I, Lyngkjaer MF, Thordal-Christensen H, Pons- Kühnemann J. Arbuscular mycorrhiza reduces susceptibility of tomato to *Alternaria solani*. *Mycorrhiza*. 2006;16,413-419. doi: 10.1007/s00572-006-0051-z
51. Pozo, MJ, Azcón-Aguilar, C. Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Curr. Opin. Plant Biol*. 2007;10, 393-398. doi: 10.1016/j.pbi.2007.05.004
52. Jung SC, Martinez-Medina A, Lopez-Raez JA, Pozo MJ. Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses. *J. Chem. Ecol*. 2012;38:651-664. doi: 10.1007/s10886-012-0134-6
53. Akiyama K, Matsuoka H, Hayashi H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*- 2005;435:750-751.
54. Genre A, Chabaud M, Balzergue C, Puech-Pagès V, Novero M, Rey T, et al. Short-chain chitin oligomers from arbuscular mycorrhizal fungi trigger nuclear Ca²⁺ spiking in *Medicago truncatula* roots and their production is enhanced by strigolactone. *New Phytol*. 2013;198:179-189.

55. Andriankaja A, Boisson-Dernier A, Frances L, Sauviac L, Jauneau A, Barker DG, et al. AP2-ERF transcription factors mediate Nod factor dependent Mt ENOD11 activation in root hairs via a novel cis-regulatory motif. *Plant Cell*. 2007;19:2866-2885.
56. Heupel S, Roser B, Kuhn H, Lebrun M, Villalba F, Requena N. Erl1, a novel era-like GTPase from *Magnaporthe oryzae*, is required for full root virulence and is conserved in the mutualistic symbiont *Glomus intraradices*. *Mol. Plant-Microbe Interact*. 2010;23:67-81.
57. Lanfranco L, Novero M, Bonfante P. The mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* possesses a CuZn superoxide dismutase that is up-regulated during symbiosis with legume hosts. *Plant Physiol*. 2005;137:1319-1330
58. Ferguson B, Mens C, Hastwell A, Zhang M, Su H, Jones C, et al. Legume nodulation: The host controls the party. *Plant Cell. Environ*. 2018;42:41-51.
59. Wasson AP, Pellerone FI, Mathesius U. Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by rhizobia. *Plant Cell*. 2006;18:1617-1629.
60. Zhang J, Subramanian S, Stacey G, Yu O. Flavones and flavonols play distinct critical roles during nodulation of *Medicago truncatula* by *Sinorhizobium meliloti*. *Plant J*. 2009;57:171-183.
61. Subramanian S, Stacey G, Yu O. Endogenous isoflavones are essential for the establishment of symbiosis between soybean and *Bradyrhizobium japonicum*. *Plant J*. 2006;48:261-273.
62. Bolaños-Vásquez MC, Werner D. Effects of *Rhizobium tropici*, *R. etli*, and *R. leguminosarum* bv. phaseoli on nod gene-inducing flavonoids in root exudates of *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Plant Microbe Interact*. 1997;10:339-346.
63. Xie F, Murray JD, Kim J, Heckmann AB, Edwards A, Oldroyd GE. et al. Legume pectate lyase required for root infection by rhizobia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012;109:633-638.
64. Haney CH, Long SR. Plant flotillins are required for infection by nitrogen-fixing bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010;107:478-483.

65. Lefebvre B, Timmers T, Mbenghe M, Moreau S, Hervé C, Tóth K, et al. A remorin protein interacts with symbiotic receptors and regulates bacterial infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010;107:2343-2348. doi: 10.1073/pnas.0913320107
66. Haney CH, Riely BK, Tricoli DM, Cook DR, Ehrhardt DW, Long SR. Symbiotic rhizobia bacteria trigger a change in localization and dynamics of the *Medicago truncatula* receptor kinase LYK3. *Plant Cell.* 2011; 23:2774-2787.
67. Broghammer A, Krusell L, Blaise M., Sauer J, Sullivan J., Maolanon N, et al. Legume receptors perceive the rhizobial lipochitin oligosaccharide signal molecules by direct binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012;109(34):13859-13864. doi: 10.1073/pnas.1205171109
68. Moling S, Pietraszewska-Bogiel A, Postma M, Fedorova E, Hink MA, Limpens E. Nod factor receptors form heteromeric complexes and are essential for intracellular infection in *Medicago* nodules. *Plant Cell.* 2014;26:4188–4199.
69. Liu H, Zhang C, Yang J, Yu N, Wang E. Hormone modulation of legume-rhizobial symbiosis. *J. Integr. Plant Biol.* 2018;60: 632-648.
70. Cheng X, Gou X, Yin H, Mysore KS, Li J, Wen J. Functional characterisation of brassinosteroid receptor MtBRI1 in *Medicago truncatula*. *Sci. Rep.* 2017;7:9327. doi: :10.1038/s41598-017-09297-9
71. Grunewald W, van Noorden G, Van Isterdael G, Beeckman T, Gheysen G, Mathesius U. Manipulation of auxin transport in plant roots during *Rhizobium* symbiosis and nematode parasitism. *Plant Cell.* 2009;21: 2553-2562.
72. Ariel F, Brault-Hernandez M, Laffont C, Huault E, Brault M, et al. Two direct targets of cytokinin signaling regulate symbiotic nodulation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell.* 2012;24:3838–3852.
73. Charpentier M, Bredemeier R, Wanner G, Takeda N, Schleiff E, Parniske M. *Lotus japonicus* CASTOR and POLLUX are ion channels essential for perinuclear calcium spiking in legume root endosymbiosis. *Plant Cell* 2008;20:3467-3479.
74. Groth M, Takeda N, Perry J, Uchida H, Dräxl S, Brachmann A, et al. NENA, a *Lotus japonicus* homolog of Sec13, is required for rhizodermal infection by arbuscular mycorrhiza fungi and rhizobia but dispensable for cortical endosymbiotic development. *Plant Cell.* 2010;22:2509-2526.

75. Bapaume L, Reinhardt D. How membranes shape plant symbioses: signaling and transport in nodulation and arbuscular mycorrhiza. *Front Plant Sci.* 2012;3:223. doi: 10.3389/fpls.2012.00223
76. Cao Y, Halane MK, Gassmann W, Stacey G. The role of plant innate immunity in the legume-rhizobium symbiosis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2017;68:535-561.
77. Yang S, Tang F, Gao M, Krishnan HB, Zhu H. R gene-controlled host specificity in the legume-rhizobia symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010;107:18735-18740.
78. Tang F, Yang S, Liu J, Zhu H. Rj4, a gene controlling nodulation specificity in soybeans, encodes a thaumatin-like protein but not the one previously reported. *Plant Physiol.* 2016;170: 26-32.
79. Ferguson B, Li D, Hastwell AH, Reid DE, Li Y, Jackson SA, et al. The soybean (*Glycine max*) nodulationsuppressive CLE peptide, GmRIC1, functions interspecifically in common white bean (*Phaseolus vulgaris*), but not in a supernodulating line mutated in the receptor PvNARK. *Plant Biotechnology Journal.* 2014;12, 1085-1097.
80. Mortier V, Den Herder G, Whitford R, Van de Velde W, Rombauts S, D'haeseleer K, et al. CLE peptides control *Medicago truncatula* nodulation locally and systemically. *Plant Physiology.* 2010;153:222-237.
81. Okamoto S, Ohnishi E, Sato S, Takahashi H, Nakazono M, Tabata S, et al. Nod factor/nitrate-induced CLE genes that drive HAR1-mediated systemic regulation of nodulation. *Plant Cell Physiology.* 2009;50:67-77.
82. Reid DE, Ferguson BJ, Gresshoff, PM. Inoculation- and nitrate-induced CLE peptides of soybean control NARK-dependent nodule formation. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* 2011;24,606-618.
83. Harrison MJ. Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Ann Rev Microbiol.* 2005;59:19-42.
84. Catoira R, Galera C, De Billy F, Penmetsa RV, Journet EP, Maillet F, et al. Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a Nod factor transduction pathway. *Plant Cell.* 2000;12(9):1647-1666.

85. Senoo K, Solaiman MZ, Kawaguchi M, Imaizumi-Anraku H, Akao S, Tanaka A, et al. Isolation of two different phenotypes of mycorrhizal mutants in the model legume plant *Lotus japonicus* after EMS-treatment. *Plant Cell Physiol.* 2000;41:726-732
86. Provorov NA, Borisov AY, Tikhonovich IA. Developmental genetics and evolution of symbiotic structures in nitrogenfixing nodules and arbuscular mycorrhiza. *J Theor Biol.* 2002;214:215-232.
87. Roth LE, Stacey G. Bacterium release into host cells of nitrogen-fixing soybean nodules: The symbiosome membrane comes from three sources. *Eur. J. Cell Biol.* 1989;49:13-23.
88. Day DA, Kaiser BN, Thomson R, Udvardi MK, Moreau S, Puppo A. Nutrient transport across symbiotic membranes from legume nodules. *Austr J Plant Physiol.* 2001;28:667-674.
89. Parniske M. Intracellular accommodation of microbes by plants: A common developmental program for symbiosis and disease? *Curr Opin Plant Biol.* 2000;3:320-328.
90. Manthey K, Krajinski F, Hohnjec N, Firnhaber C, Pühler A, Perlick AM, et al. Transcriptome profiling in root nodules and arbuscular mycorrhiza identifies a collection of novel genes induced during *Medicago truncatula* root endosymbiosis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2004;10:1063-1077.
91. Hohnjec N, Perlick AM, Puhler A, Kuster H. The *Medicago truncatula* sucrose synthase gene MtSucS1 is activated both in the infected region of root nodules and in the cortex of roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2003;16:903-915.
92. Chen LQ, Hou BH, Lalonde S, Takanaga H, Hartung ML, Qu XQ, et al. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature.* 2010;468:527-532.
93. Imaizumi-Anraku H, Takeda N, Charpentier M, Perry J, Miwa H, Umehara Y, et al. Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots. *Nature.* 2005;433:527-531.

94. Kistner C, Winzer T, Pitzschke A, Mulder L, Sato S, Kaneko T, et al. Seven *Lotus japonicus* genes required for transcriptional reprogramming of the root during fungal and bacterial symbiosis. *Plant Cell*. 2005;17:2217-2229.
95. Kanamori, N., et al. A nucleoporin is required for induction of Ca²⁺ spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006;103:359-364.
96. Gutjahr C, Banba M, Croset V, An K, Miyao A, An G, et al. Arbuscular mycorrhiza-specific signaling in rice transcends the common symbiosis signaling pathway. *Plant Cell*. 2008;20:2989-3005
97. Genre A, Bonfante P. Building a mycorrhizal cell: How to reach compatibility between plants and arbuscular mycorrhizal fungi. *J Plant Interact*. 2005;1:3-13.
98. Gobbato E, Marsh JF, Vernié T, Wang E, Maillet F, Kim J, Benjamin J, et al. A GRAS-type transcription factor with a specific function in mycorrhizal signaling. *Curr. Biol*. 2012;22:2236-2241.
99. Charpentier M, Sun J, Vaz Martins T, Radhakrishnan GV, Findlay K, Soumpourou E, et al. Nuclear-localized cyclic nucleotide-gated channels mediate symbiotic calcium oscillations. *Science*. 2016;352: 1102-1105.
100. Jin Y, Liu H, Luo D, Yu N, Dong W, Wang C, et al. DELLA proteins are common components of symbiotic rhizobial and mycorrhizal signaling pathways. *Nat. Commun*. 2016;7:12433. doi: 10.1038/ncomms12433
101. Endre G, Kereszt A, Kevei Z, Mihacea S, Kaló P, Kiss GB. A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* 2002;417: 962-966.
102. Stracke S, Kistner C, Yoshida S, Mulde, L., Sato S, Kaneko T. A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature*. 2002;417:959-962.
103. Wang G, Zhang G, Wu M. CLE peptide signaling and crosstalk with phytohormones and environmental stimuli. *Frontiers in Plant Sciences*. 2016;6:1211. doi: 10.3389/fpls.2015.01211.
104. Almanza-Ballesteros L, Altamirano-Hernandez J, Peña-Cabriales JJ, Santoyo G, Sanchez-Yañez JM, Valencia-Cantero E, et al. Effect of Co-Inoculation with Mycorrhiza and Rhizobia on the Nodule Trehalose Content of Different Bean Genotypes. *Open Microbiol. J*. 2010;4:83-92.

105. Liriano R, Núñez D, Barceló R. Effect of the application of Rhizobium and Mycorrhiza in the growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L), dark CC-25-9 variety. *Centro Agrícola*. 2012;39(4):17-20.
106. Ojeda LJ, Herrera R, Furrázola E, Hernandez C. Effect of combined inoculations of Rhizobium-Arbuscular Mycorrhiza in *Leucaena leucocephala* CV: Perú. *Centro Agrícola*. 2014;41(3):17-21.
107. Tajini R, Trabelsi M, Drevon JJ. Combined inoculation with *Glomus intraradices* and *Rhizobium tropici* CIAT899 increases phosphorus use efficiency for symbiotic nitrogen fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2012;19(2):157-163. doi: 10.1016/j.sjbs.2011.11.003
108. Fehlberg V, Vieweg MF, Dohmann EMN, Hohnjec N, Puhler A, Perlick AM, et al. The promoter of the leghaemoglobin gene VfLb29: Functional analysis and identification of modules necessary for its activation in the infected cells of root nodules and in the arbuscule-containing cells of mycorrhizal roots. *J Exp Bot*. 2005;56:799-806.
109. Fench K. Engineering Mycorrhizal Symbioses to Alter Plant Metabolism and Improve Crop Health. *Front. Microbiol*. 2017;8:1403. doi: 10.3389/fmicb.2017.01403
110. Schweiger R, Baier MC, Persicke M, Müller C. High specificity in plant leaf metabolic responses to arbuscular mycorrhiza. *Nat. Commun*. 2014;5:3886.
111. Rivero J, Gamir J, Aroca R, Pozo MJ, Flors V. Metabolic transition in mycorrhizal tomato roots. *Front. Microbiol*. 2015;6:598. doi: 10.3389/fmicb.2015.00598
112. Wang Q, Yang S, Liu J, Tercskei K, Abraham E, Gombár A, Domonkos A, et al. Host-secreted antimicrobial peptide enforces symbiotic selectivity in *Medicago truncatula*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017;114:6854-6859.
113. Radutoiu S, Madsen LH, Madsen EB, Felle HH, Umehara Y, Gronlund M, et al. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature*. 2003;425:585-592.
114. Moniish SA, Prasanth R, Vivek P, Saravanan D. Role of Nitrogen Fixers as Biofertilizers in Future Perspective: A Review. *Research J. Pharm. and Tech*. 2020;13(5):2459-2467.

115. Gil-Díez P, Tejada-Jiménez M, León-Mediavilla J, Wen J, Mysore KS, Imperial J, et al. MtMOT1.2 is responsible for molybdate supply to *Medicago truncatula* nodules. *Plant Cell Environ.* 2019;42:310–320.
116. Torrez V, Ceulemans T, Mergeay J, de Meester L, Honnay O. Effects of adding an arbuscular mycorrhizal fungi inoculum and of distance to donor sites on plant species recolonization following topsoil removal. *Appl. Veg. Sci.* 2016;9:7-19. doi: 10.1111/avsc.12193
117. Symanczik S, Błaszczowski J, Chwat G, Boller T, Wiemken A, Al-Yahya'ei, MN. Three new species of arbuscular mycorrhizal fungi discovered at one location in a desert of Oman: *Diversispora omaniana*, *Septoglomus nakheelum* and *Rhizophagus arabicus*. *Mycologia.* 2014;106,243-259. doi: 10.3852/106.2.243
118. Polli F, Meijrink B, Bovenberg RAL, Driessen AJM. New promoters for strain engineering of *Penicillium chrysogenum*. *Fungal Genet. Biol.* 2016;89:62-71. doi: 10.1016/j.fgb.2015.12.003
119. Pawlowska TE. Genetic processes in arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 2005;251:185-192. doi: 10.1016/j.femsle.2005.08.007
120. Sayer JA, Gadd GM. Solubilization and transformation of insoluble inorganic metal compounds to insoluble metal oxalates by *Aspergillus niger*. *Mycol. Res.* 1997;101:653-661. doi: 10.1017/S0953756296003140

Artículo 2: Resumen Ejecutivo

Caracterización de diversidad y efecto de inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno en especies de leguminosas forestales de Costa Rica

Estado: revisado por los autores y se encuentra en traducción al inglés

Revista: Forestry Systems (España)

Recibido: -----

Aceptado: -----

Resumen Ejecutivo: en este artículo se exponen los resultados más importantes del estudio. Primeramente, se describe como fueron extraídos los nódulos y bacterias de los árboles forestales leguminosos para seguidamente hacer el crecimiento bacteriano en medio de cultivo. Posteriormente se describe como se hizo la extracción de ADN y secuenciación del gen 16S rARN, así como el procesamiento de la información para la identificación de las bacterias presentes. A su vez se describe como se midió cada variable.

Una vez que se tuvo claro la identificación de las especies bacterianas, se procedió a inocular embriones de los huéspedes originales para cuantificar el efecto del inoculado bacteriano sobre el crecimiento vegetal, respiración microbiana y actividad de la enzima nitrogenasa.

Dentro de los más importante mostrado en el estudio es que todas las especies forestales presentaron mejoría en las variables cuantificadas en al menos una de ellas. Una subfamilia de Fabaceae reaccionó de mejor forma al inoculado. El contenido de nutrientes tanto a nivel foliar como radicular presentó diferencias significativas en algunos nutrimentos dependiendo de la especie.

Este estudio permitió hacer por primera vez una identificación molecular de bacterias simbióticas relacionadas con árboles forestales leguminosos en Costa Rica y esto permitirá el desarrollo de inoculantes para la agricultura y reforestación con especies leguminosas.

Artículo 2: Caracterización de diversidad y efecto de inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno en especies de leguminosas forestales de Costa Rica

Andres Zuñiga¹, Laura Yesenia Solis-Ramos², Lorena Hernández³, Keilor Rojas⁴

1. Estudiante de posgrado de la escuela de Biología. Universidad de Costa Rica. Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-8214-4435>

2. Investigadora. Escuela de Biología y Centro de Investigación en Biodiversidad y Ecología Tropical (CIBET), Universidad de Costa Rica. Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-8935-5507>

3. Investigadora. Centro de Investigación en Productos Naturales (CIPRONA), Universidad de Costa Rica. Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-9455-0083>

4. Investigador. Escuela de Biología y Laboratorio de Genética y Ecología de Microorganismos (LEGMi), Universidad de Costa Rica. Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-8935-5507>

Contacto para correspondencia: keilor.rojas@ucr.ac.cr

Resumen

La diversidad de bacterias fijadoras de nitrógeno asociada con especies forestales tropicales ha sido relativamente poco estudiada. En este estudio se aislaron bacterias simbiotes en nódulos de ocho especies forestales pertenecientes a dos subfamilias de Fabaceae (cuatro Caesalpiniaceae y cuatro Papilionaceae), se caracterizaron molecularmente mediante el marcador 16S rARN y se evaluó la respuesta a la inoculación en plántulas de sus respectivos hospederos. Los aislamientos bacterianos se identificaron como *Rhizobium miluonense*, *Rhizobium multihospitium*, *Bradyrhizobium japonicum* y *Bradyrhizobium* sp. El experimento incluyó la evaluación de 10 plántulas inoculadas respecto a 10 sin inocular por cada hospedero. Luego de aproximadamente cinco meses de crecimiento, se evaluaron las siguientes variables: altura, grosor de tallo, número de hojas, vigor, longitud de raíz, peso raíz, número de nódulos, área foliar, respiración microbiana y actividad nitrogenasa. Adicionalmente se midió el estado de los nutrientes foliares y radiculares. Los valores de todas las variables fueron mayores al aplicar el inoculante bacteriano, excepto para respiración microbiana y la longitud de raíz ($p < 0.05$). La subfamilia Caesalpiniaceae tuvo mayor respuesta al inoculante que Papilionaceae ($p < 0.05$). Algunas especies de plantas fueron más sensibles a la inoculación que otras, por ejemplo, *Enterolobium cyclocarpum*, *Cojoba arborea* y *Dalbergia retusa* presentaron mayores niveles de nutrientes a nivel foliar y radicular al ser inoculados. El contenido de nutrientes varía entre especies, pero se detectó al Cu, B y Fe en mayor cantidad tanto a nivel foliar como radicular. Las bacterias identificadas no han sido reportadas previamente en las especies estudiadas por lo que posiblemente son nuevos registros. El presente estudio brinda una perspectiva del potencial que tiene el desarrollo de inoculantes basados en bacterias fijadoras de nitrógeno para la agricultura y reforestación con especies leguminosas.

Palabras clave: Árboles leguminosos tropicales, Fijación de nitrógeno, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, Biofertilizantes, Inoculantes bacterianos, Nitrogenasa

Characterization of diversity and effect of inoculation of nitrogen-fixing bacteria in species of forest legumes from Costa Rica

Abstract

The diversity of nitrogen-fixing bacteria associated with tropical forest species has been relatively little studied. In this study, symbiont bacteria were isolated in nodules of eight forest species belonging to two subfamilies of Fabaceae (four Caesalpiniaceae and four Papilionaceae), they were molecularly characterized using the 16S rRNA marker, and the response to inoculation in seedlings of their respective hosts was evaluated. The bacterial isolates were identified as *Rhizobium miluonense*, *Rhizobium multihospitium*, *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium* sp. The experiment included the evaluation of 10 inoculated seedlings compared to 10 without inoculation for each host. After approximately five months of growth, the following variables were evaluated: height, stem thickness, number of leaves, vigor, root length, root weight, number of nodules, leaf area, microbial respiration, and nitrogenase activity. Additionally, the state of foliar and root nutrients was measured. The values of all the variables were higher when applying the bacterial inoculant, except for microbial respiration and root length ($p < 0.05$). The Caesalpiniaceae subfamily had a greater response to the inoculant than Papilionaceae ($p < 0.05$). Some plant species were more sensitive to inoculation than others, for example, *Enterolobium cyclocarpum*, *Cojoba arborea* and *Dalbergia retusa* presented higher levels of nutrients at the foliar and root level when inoculated. The nutrient content varies between species, but Cu, B and Fe were detected in greater quantities both at the foliar and root levels. The identified bacteria have not been previously reported in the species studied, so they are possibly new records. This study provides a perspective of the potential of the development of inoculants based on nitrogen-fixing bacteria for agriculture and reforestation with leguminous species.

Keywords: Tropical leguminous trees, Nitrogen fixation, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, Biofertilizers, Bacterial inoculants, Nitrogenase

Introducción

En el suelo existe una diversidad aún no estimada de organismos interactuando de diversas formas y con diferentes grupos de organismos. Entre las relaciones sinérgicas se encuentran las bacterias simbióticas que infectan raíces de plantas leguminosas (Fabaceae), estas bacterias interactúan tomando nutrientes directamente de la planta, pero a cambio le brindan a la misma, una mejora en absorción de elementos esenciales, especialmente nitrógeno. Incorporar nitrógeno al suelo por medio de leguminosas tiene consecuencias económicas positivas para la agricultura, estudios reportan aportes de entre 60-300 Kg/ha/N (Céspedes *et al.* 2019, Castro-Rincón *et al.* 2018).

Investigadores reportan una gran cantidad de especies leguminosas que son usadas para consumo humano, como cultivos de cobertura y forestales (Kaye y Quemada 2017, Blanco-Canqui *et al.* 2015, Cabral 2010, Chen y Weil 2009, USDA 2012, Castro-Rincón *et al.* 2018, Cherr, Scholberg y McSorley 2006, Gomez-Gomez y Gonzalez-Lutz 2017). En el área forestal existen especies que pertenecen a la familia Fabaceae y son de interés maderable, regeneradoras de sitios degradados, protectoras de fuentes de agua, sombra para cultivos como café o sombra para ganado (Cordero y Boshier, 2003; Cabral, 2010).

Con el desarrollo de la biología y genética molecular, los investigadores han profundizado en los genes asociados a la infección y la asociación simbiótica (Wang *et al.* 2019; Burke *et al.* 2011; Roy *et al.* 2020). El proceso de infección bacteria-planta de los rizobios se ha descrito por Bulgarelli *et al.* (2013), Roy *et al.* (2020) y Ferguson *et al.* (2018).

Hay evidencia de que dependiendo de la bacteria simbiótica que esté presente en determinado momento, esta puede actuar como un organismo generalista o específico, según la especie de planta y esto puede producir diferencias en el crecimiento y productividad del hospedero (Sánchez y Gómez 2001, Ribó 2004, Labrador 2009, Acuña y Uribe 1996).

En Costa Rica se identificaron especies de bacterias simbióticas en relación con leguminosas a nivel taxonómico clásico (Acuña ,1996; Acuña *et al.*, 1987; Acuña y Uribe, 1996; León, Acuña y Ramírez 1986(a); León, Acuña y Ramírez 1986(b); Morales, 1987; Uribe, Acuña y Hernández, 1990), sin embargo, comparativamente se conoce menos sobre la diversidad de especies en el sector agroforestal (de Bedout *et al.* 2022). Para una mejor caracterización de los simbioses fijadores de nitrógeno es necesario utilizar técnicas microbiológicas y moleculares como es la secuenciación del gen 16s rARN.

En estudios de diversidad microbiana también es usual cuantificar la respuesta a la inoculación y con ello la actividad de las bacterias al ser inoculadas por medio de la actividad de la enzima nitrogenasa por cromatografía de gases. Esta técnica se basa en la capacidad que tiene la nitrogenasa para reducir acetileno (C_2H_2) en etileno (C_2H_4) (Hasekett *et al.*, 2021; Senthilkumar, Amaresan y Sankaranarayanan 2021; Smercina *et al.* 2019; Lamel y Cruz, 2013; Bünger *et al.*, 2021; Bonaldi *et al.*, 2011; Ladestam *et al.*, 2020; Ma *et al.*, 2022).

Estudios de inoculación bacteriana con rizobios han sido reportados mejorando variables morfológicas y/o actividad nitrogenasa en diferentes especies vegetales (Acuña *et al.*, 1987; Acuña y Uribe, 1996; Lamel y Cruz, 2013; Bünger *et al.*, 2021; Bonaldi *et al.*, 2011; Ladestam *et al.*, 2020, Ma *et al.*, 2022; Wyse, Saggin y Miana, 2021; Nguyen *et al.*, 2022; de Castilho *et al.*, 2021; Simbine *et al.*, 2021).

Si bien es cierto se conocen bacterias simbiotes relacionadas con raíces de leguminosas a nivel mundial y local, el objetivo de este trabajo es realizar una caracterización a nivel molecular de los simbiotes de ocho especies forestales comúnmente utilizadas en Costa Rica, así como evaluar el efecto de la inoculación en cuanto a crecimiento y fijación de nitrógeno en las plantas. Con lo anterior se busca identificar bacterias con potencial de uso como biofertilizantes para el sector agroforestal.

Materiales y Métodos

Aislamiento de bacterias a partir de nódulos

En este estudio se utilizaron plantas de vivero de 30-70 cm de altura, la mayoría con edad de 1-3 años, provenientes de un vivero forestal de CODEFORSA (Asociación Comisión de Desarrollo Forestal de San Carlos) y el vivero de la Escuela de Ciencias Ambientales de la Universidad Nacional en Costa Rica. Se seleccionaron las siguientes ocho especies de importancia forestal, todas pertenecientes a dos subfamilias de Fabaceae. Las siguientes especies pertenecen a la subfamilia Caesalpiniaceae: *Cojoba arboreum*, *Enterolobium cyclocarpum*, *Samanea saman*. Las siguientes pertenecen a la subfamilia Pailioniaceae *Erythrina poeppigiana*, *Erythrina fusca*, *Platymiscium pinnatum* y *Dalbergia retusa*. Este trabajo contó con el permiso de acceso VI-4056-2020 de la Comisión de Biodiversidad de la Universidad de Costa Rica.

Se examinaron manualmente las raíces de las plantas en busca de nódulos. Una vez identificados se extrajeron considerando tomar también una parte de la raíz adjunta. Estas se lavaron con agua, se colocaron en servilletas de papel y se llevaron inmediatamente al laboratorio en hielera. Una vez en laboratorio, los nódulos se colocaron en tubos eppendorf de 2 mL, donde se lavaron dos veces con agua destilada autoclavada, se desinfectaron superficialmente con etanol al 70% por 1 minuto, se lavaron con agua destilada dos veces, se

volvieron a desinfectar con hipoclorito de sodio al 2% por cinco minutos y se volvieron a lavar siete veces con agua destilada.

Los nódulos desinfectados se pasaron a nuevos tubos eppendorf donde se les agregó 500 uL de medio PY (5 g/L peptona, 1 g/L dextrosa anhidro, 0.5 g/L fosfato dipotásico, 0.2 g/L sulfato de magnesio, 0.1 g/L de cloruro de sodio). Los nódulos se maceraron con pistilos plásticos autoclavados. Posteriormente se hicieron diluciones seriadas del sobrenadante en concentraciones 10^{-1} y 10^{-2} , a partir de las cuales se tomaron 50 uL y se plaquearon en placas Petri de medio PY-AGAR con antifúngico (5 g/L peptona, 1 g/L dextrosa anhidro, 0.5 g/L fosfato dipotásico, 0.2 g/L sulfato de magnesio, 0.1 g/L de cloruro de sodio, 15 g/L agar, Ciclohexamida 40 mg/L). Las placas se incubaron hasta por 30 días. Una vez que aparecieron colonias, estas se repicaron en nuevas placas del mismo medio. Las cepas aisladas se preservaron en medio PY+Glicerol 20% y se almacenaron a -80°C en la colección del Laboratorio de Genética y Ecología de Microorganismos (LEGMi) de la Escuela de Biología de la UCR.

Extracción de ADN y caracterización molecular

El ADN genómico de las cepas de rizobios se aisló utilizando el kit DNEasy Power soil kit® de QIAGEN (Carlsbad, CA, Estados Unidos), siguiendo las instrucciones dadas por el fabricante. El gen 16S rARN se amplificó por PCR en un termociclador T100 (BioRad ®) a partir de los extractos de ADN total utilizando los cebadores 27F y 1492R (Lane 1991). Las reacciones se realizaron con el siguiente programa de temperatura: 98°C durante 2 min seguido de 35 ciclos de 96°C durante 30s, 52°C durante 30s y 72°C durante 30s y 10 min de extensión a 72°C . La amplificación de los productos se verificó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% por 30 min a 90v y 200 mA. La secuenciación tipo Sanger se realizó por medio de la empresa Macrogen (Corea del Sur). Las secuencias se ensamblaron y editaron usando el programa BioEdit (Hall, 1999). La asignación taxonómica se realizó mediante comparaciones de las secuencias en las siguientes bases de datos SILVA, NCBI, BacDive, GBIF y PANGAEA. Una vez identificadas las cepas se procedió a generar un árbol filogenético. Para esto, las secuencias se alinearon utilizando la herramienta MAFFT v7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) y se generó un árbol filogenético de máxima

verosimilitud utilizando el programa Archaeopteryx con 1000 réplicas de Bootstrap y bajo un modelo de evolución GTR+G+I.

Selección e inoculación de bacterias

Posterior a la secuenciación e identificación molecular, se eligió la bacteria identificada por especie forestal para ser inoculada y cuantificar la respuesta.

Antes de inocular se sembraron las semillas de cada especie forestal en los meses de febrero a marzo de 2022, las cuales fueron tratadas previamente con hipoclorito de sodio al 1% por 1 minuto y seguidamente con 5 lavados de agua destilada. Posteriormente se sumergieron en agua durante 8 horas, excepto las semillas de *Cojoba arborea* de acuerdo con lo recomendado por Rodríguez-Sosa, Valdés-Roblejo y Rodríguez (2012) y Pérez *et al.* (2016). Luego se pusieron a germinar en la oscuridad en recipientes plásticos semi-herméticos y con papel filtro humedecido. Se revisó cada 3 días la humedad.

Transcurridos 15 días de sembradas las semillas se realizó un conteo de germinación y se colocaron en un suelo estéril previamente autoclavado, del tipo andisol, en potes con estilo bolsa plástica negra perforadas de 0.5 L. En estos potes se puso a crecer 10 embriones para cada especie forestal para ser inoculados con la bacteria y 10 embriones sin inocular. Las condiciones agroclimáticas promedio del sitio experimental (Dulce Nombre de Cartago, Costa Rica), según la estación meteorológica más cercana para febrero-septiembre de 2022 fueron: 19.3°C (18.1-20.5°C), precipitación acumulada 959 mm (36.7-211.7 mm) y humedad relativa 87.5% (86-90%).

Siete días antes de inocular, cada bacteria se cultivó en 0.2 L del medio PY descrito previamente (sin agar) en Erlenmeyer de 0.5 L. Las bacterias se pusieron a crecer por 3-7 días en agitación a 100 rpm. A los 3 días se midió la OD (Optical Density) para verificar la concentración hasta alcanzar 1 OD a 600 nm según Osei *et al.* (2018).

Al momento de inocular los embriones se sembraron en bolsas plásticas negras de 10'' x 10'' en una casa sombra con sarán de 70% color verde de doble capa. Una vez obtenida la suspensión de bacterias se aplicó 1 mL de cultivo bacteriano en drench con una jeringa a cada embrión sembrado. A medida que las plantas fueron creciendo se redujo el porcentaje de sombra hasta poner a plena luz solar.

Los tratamientos realizados fueron los siguientes:

Tabla 1. Descripción de tratamientos a utilizar en la inoculación de bacterias nitrificantes sobre diferentes cultivos utilizados en el experimento.

Tratamiento	Especie forestal	Bacteria	Repeticiones
1	<i>Erythrina poeppigiana</i>	Con cepa 163b	10
2	<i>Erythrina poeppigiana</i>	Sin cepa (control)	10
3	<i>Erythrina fusca</i>	Con cepa 163b	10
4	<i>Erythrina fusca</i>	Sin cepa (control)	10
5	<i>Cojoba arboreum</i>	Con cepa 12c	10
6	<i>Cojoba arboreum</i>	Sin cepa (control)	10
7	<i>Platymiscium pinnatum</i>	Con cepa 119d	10
8	<i>Platymiscium pinnatum</i>	Sin cepa (control)	10
9	<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	Con cepa 20j	10
10	<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	Sin cepa (control)	10
11	<i>Samanea saman</i>	Con cepa 24b	10
12	<i>Samanea saman</i>	Sin cepa (control)	10
13	<i>Dyphisa americana</i>	Con cepa 118c	10
14	<i>Dyphisa americana</i>	Sin cepa (control)	10
15	<i>Dalbergia retusa</i>	Con cepa 115a	10
16	<i>Dalbergia retusa</i>	Sin cepa (control)	10

Variables morfométricas

Una vez que las plantas comenzaron a crecer se midió el porcentaje de germinación contando la cantidad de plántulas emergidas versus plántulas sembradas. A los cinco meses de edad se cuantificó las siguientes variables morfométricas: altura (cm), grosor de tallo (mm), número de hojas (unidades), vigor (escala de 1-5: 1 el menor y 5 el mayor), longitud de raíz (cm), peso raíz (g), número de nódulos (unidades) y área foliar (cm²). El área foliar se tomó analizando imágenes fotográficas con los programas Bioleaf® y LeafArea®.

Análisis de nutrimentos foliares

En cada especie y tratamiento se tomaron 3 repeticiones de la parte foliar y 3 repeticiones de la parte radicular para determinar los contenidos de elementos químicos en su composición por medio de absorción atómica. Las muestras fueron enviadas en tejido fresco al laboratorio análisis del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) de la Universidad de Costa Rica.

Respiración microbiana

Se registró la respiración microbiana a los cuatro meses después de la siembra por medio de la cuantificación de CO₂, para ello se utilizó una cámara portátil analizadora de gases por infrarojo (IRGA) con rango entre 0-10000 ppm (IRGA, LI-COR® Biosciences). Se cuantificó cada 4 segundos la concentración de CO₂ por un periodo de 15 minutos para obtener un dato promedio por planta. Las mediciones se realizaron entre las 9:00 am y 12:00 pm a un promedio de 20°C y utilizando sombra sobre la cámara para que la luz no interfiriera en la medición.

Medición de actividad nitrogenasa

Cada raíz se lavó, pesó e ingresó en viales de 60 mL. Se utilizó tapa roscas tipo septum para sellar y permitir el ingreso de una jeringa de 20 mL de calibre 22-24 y se reemplazó el 10% de aire con acetileno según el método de Hardy *et al.* (1973) y Senthilkumar, Amaresan y Sankaranarayanan (2020) en el que se basa la medición de la reducción de acetileno a etileno por medio de la enzima nitrogenasa. Se utilizó un cromatógrafo de gases (GC) acoplado a un espectrómetro de masas (Shimadzu GC-2014). Para identificar el tiempo de respuesta al etileno y realizar una curva de calibración se utilizaron plantas de *Lupinus costarricensis* D.B Bunn de una edad aproximada de 3 meses noduladas en campo. Se tomaron nueve plantas con diferente grado de nodulación y se cuantificó tres repeticiones a 1, 24, 48, 72 y 96 hrs después de inyección. De lo anterior se determinó que el momento para la medición fue a las 72 hrs.

Análisis estadísticos

El experimento de evaluación de la inoculación se realizó en un diseño irrestricto al azar con 10 repeticiones por tratamiento. Previo al análisis de los datos se realizó una prueba de Shapiro-Wilk para determinar la normalidad de los datos y se determinó usar la prueba de

Wilcoxon-Man-Whitney con $\alpha = 0.05$ (95% confiabilidad) para las variables morfológicas, respiración microbiana por CO₂ (ppm) y actividad nitrogenasa (umol/N/h). Se utilizó el software Rstudio versión 4.2.2 e Infostat versión 2020. Finalmente se realizó una prueba de correlaciones de Pearson para determinar si hubo correlación entre variables.

Resultados

Identificación de cepas bacterianas

Se registraron tres especies y dos géneros de bacterias del filo Pseudomonata, clase Alfa-protobacteria, orden Hyphomicrobiales, familia Rhizobiaceae. No fue posible identificar a nivel de especie tres cepas bacterianas, sin embargo, se logró constatar que pertenecen al género *Bradyrhizobium*. A continuación, los resultados de acuerdo con su relación filogenética.

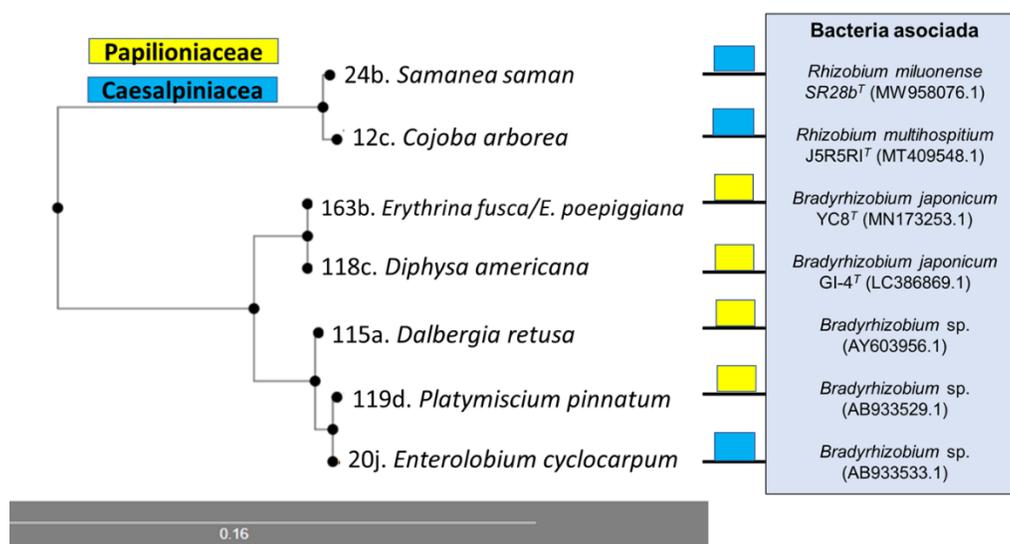


Figura 1. Relación filogenética de las cepas bacterianas aisladas de diferentes especies vegetales forestales leguminosas e identificadas con el gen marcador 16S rRNA.

R. miluonense

Se aisló de *S. saman*. Obtuvo un porcentaje de similitud de 99.57% con *R. miluonense* Sr28b^T (MW958076.1). El tamaño de su genoma es aproximadamente 6.81 Mbp (Hördt *et al.*, 2020).

R. multihospitium

Se aisló de *C. arborea*. Obtuvo un porcentaje de similitud de 99.89% con *R. multihospitium* J5R5RI^T (MT409548.1). El tamaño de su genoma es aproximadamente 7.32 Mbp (Hördt *et al.*, 2020).

B. japonicum

Se aisló de *E. fusca*, *E. poepiggiana* y *D. americana*. El aislamiento proveniente de *E. fusca*/*E. poepiggiana* obtuvo un porcentaje de similitud de 100% con *B. japonicum* YC8^T (MN173253.1) y con el proveniente de *D. americana* 99.91% con *B. japonicum* GI-4^T (LC386869.1). El tamaño de su genoma es aproximadamente 9.21 Mbp (Hördt *et al.*, 2020).

***Bradyrhizobium* sp.**

Se aisló de *E. cyclocarpum*, *D. retusa* y *P. pinnatum*. Obtuvo entre 99.78-100% de similitud con *Bradyrhizobium* sp. (accesiones AB933533.1, AY603956.1 y AB933529.1).

Respuesta a la inoculación

En las mediciones morfométricas se obtuvo diferencias significativas en todas las variables ($p < 0.05$) excepto para la longitud de raíz. Por su parte la respiración microbiana no registró diferencias significativas ($p > 0.05$) (Figura 2).

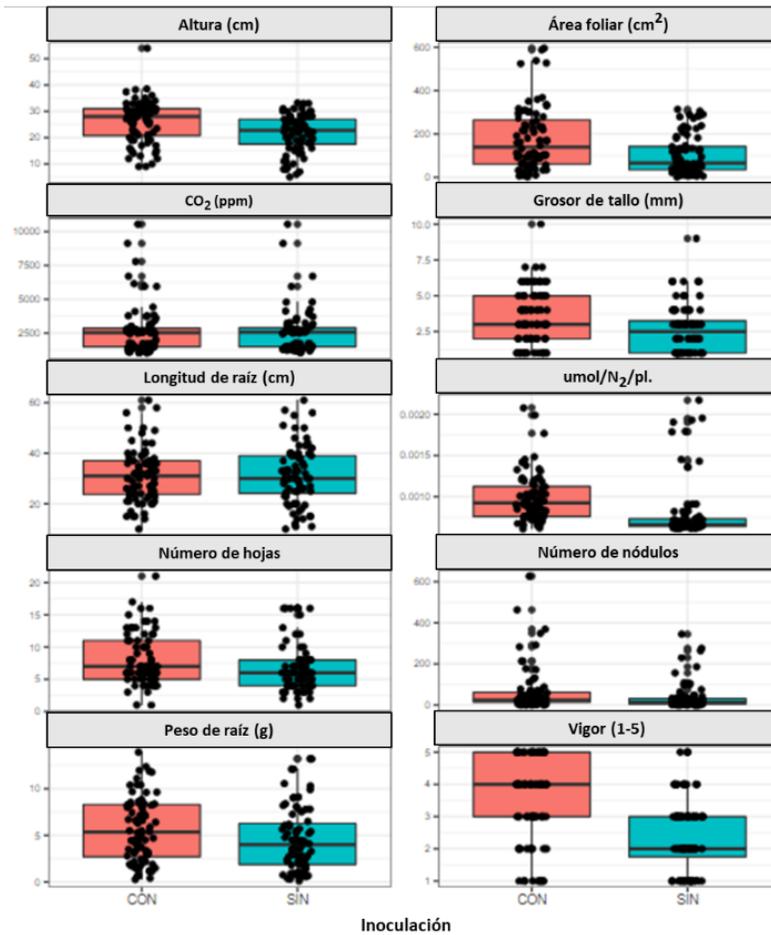


Figura 2. Medias de mediciones morfométricas, respiración microbiana por CO₂ y actividad nitrogenasa (umol de N/hr/planta) efectuadas en las ocho especies forestales leguminosas aplicadas y no aplicadas con inoculante bacteriano.

En la Tabla 2 se observan las mediciones morfométricas, respiración microbiana y actividad nitrogenasa agrupadas por especie. Cada especie mostró un comportamiento distinto a la respuesta de inoculación.

E. cyclocarpum, *S. saman* y *E. fusca* obtuvieron valores superiores cuando fueron inoculadas y se reflejó en 6 variables significativas respectivamente ($p < 0.05$). *C. arborea* y *D. retusa* presentaron 4 variables con valores superiores cuando se aplicó el inoculante bacteriano. Finalmente, *E. poeppigiana*, *D. americana* y *P. pinnatum* obtuvieron 3, 2 y 1 variables significativas respectivamente al aplicar el inoculante bacteriano.

Tabla 2. Medias de mediciones morfométricas, actividad nitrogenasa y respiración microbiana en las especies forestales leguminosas estudiadas.

Especie	Tratam.	% germ.	% sobreviv.	Altura (cm)	Grosor (mm)	# hojas	Vigor (1-5)	# nódulos	CO ₂ (ppm)	Long. Raíz (cm)	Peso Raíz (g)	Área foliar (cm ²)	Nitrogenasa (umol/N/hr/pl)
<i>Erythrina fusca</i>	CON	100	100	32,47 a	6,2 a	5,1 a	4,5 a	19,4 a	2329 a	25,9 a	9,8 a	267,48 a	0,97 a
	SIN	100	100	25,27 b	5,4 b	3,7 b	2,7 b	4,7 b	2221 a	23,0 a	9,7 a	209 a	0,81 b
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	CON	100	100	35,45 a	3,5 a	8,8 a	3,6 a	82,0 a	2300 a	25,6 a	6,6 a	66,6 a	1,31 a
	SIN	100	100	25,51 b	3,0 a	6,6 b	2,2 b	21,3 b	2286 a	22,3 a	3,9 b	41,5 a	0,7 b
<i>Cojoba arborea</i>	CON	100	100	29,7 a	3,1 a	5,7 a	3,8 a	307,8 a	2373 a	37,7 a	6,1 a	381,9 a	1,17 b
	SIN	96	100	26,5 a	2,6 a	4,7 a	2,5 b	177,0 b	2318 a	35,5 a	4,9 a	171,6 b	1,58 a
<i>Erythrina poeppigiana</i>	CON	98	100	25,5 a	5,9 a	4,9 a	3,7 a	24,5 a	2676 a	39,8 a	7,7 a	193,5 a	0,86 a
	SIN	98	100	23,2 a	3,7 b	4,1 a	2,9 a	18,0 a	2569 a	35,6 a	7,14 a	121,8 b	0,68 b
<i>Diphysa americana</i>	CON	95	100	28,0 a	1,9 a	14,7 a	3,2 a	25,6 a	2365 a	37,6 a	2,32 a	81,1 a	0,83 a
	SIN	95	100	25,1 a	1,6 a	14,3 a	2,8 a	20,8 a	2326 a	35,0 a	1,69 a	46,6 b	0,69 a
<i>Dalbergia retusa</i>	CON	100	100	18,8 a	1,7 a	7,8 a	3,1 a	48,8 a	4187 a	40,2 a	2,6 a	114,4 a	0,93 a
	SIN	96	100	13,4 b	1,4 a	6,1 b	2,2 a	25,0 b	2429 a	32,5 a	1,78 a	72,9 a	0,64 b
<i>Samanea saman</i>	CON	100	100	26,4 a	3,8 a	12,1 a	3,8 a	15,2 a	3346 a	31,3 a	7,2 a	256,2 a	0,98 a
	SIN	100	90	20,9 b	2,4 b	8,3 b	2,3 b	13,3 a	4187 a	34,6 a	5,0 a	120,2 b	0,67 b
<i>Platymiscium pinnatum</i>	CON	65	70	12,9 a	1,7 a	4,9 a	2,4 a	1,4 a	2212 a	19,6 a	1,2 a	28,2 a	0,77 a
	SIN	55	60	7,2 b	1,0 a	4,0 a	1,3 a	0,0 b	2588 a	14,8 a	0,5 a	7,4 a	0,62 b
			Error estándar	0,6	0,1	0,3	0,1	7,6	139,4	0,03	0,9	0,3	10,2

Al agrupar las especies por subfamilias se observa que ambas respondieron al inoculado bacteriano, no obstante, la subfamilia Caesalpiniacea presentó mejor respuesta a la inoculación en la mayoría de las variables en comparación con la subfamilia Papilionaceae ($p < 0.05$).

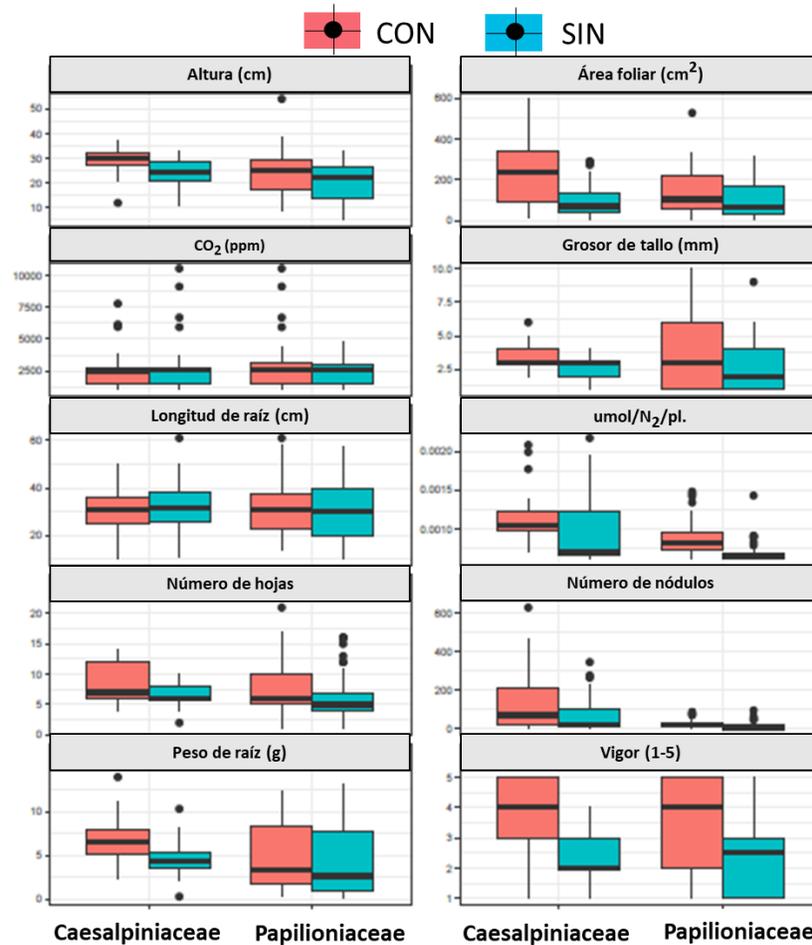


Figura 3. Medias de las variables morfométricas, respiración microbiana por CO₂ y actividad nitrogenasa (umol de N/hr/planta) cuantificadas en las ocho especies forestales leguminosas y agrupadas por subfamilia.

En cuanto a los resultados de los análisis químicos de los tejidos (foliar y radicular) se observó que los elementos presentaron diferencias estadísticas significativas en algunas especies cuando fueron inoculadas respecto a las no inoculadas, y, esto se presentó tanto en hojas como en raíces (Wilcoxon-Mann-Whitney, $p=0.05$).

C. arborea presentó mayor contenido de B en hoja y de P, K, Mg, S, B, Cu y Fe en raíz. *E. cyclocarpum* obtuvo mayor cantidad de N y S en hoja, así como de N, S, Mn, Zn, B, Cu y Fe en raíz. *D. retusa* obtuvo mayor cantidad de Mg en hoja, mientras en raíz se presentó mayormente B, Cu y Fe.

Cuatro especies (*S. saman*, *E. fusca*, *D. americana* y *E. poeppigiana*) no presentaron diferencias significativas en cuanto a contenido de nutrientes, tanto en hoja como en follaje, cuando fueron inoculadas. En *P. pinnatum* no se pudo analizar estadísticamente por la escasa cantidad de tejido que se obtuvo, esto por cuanto su crecimiento es muy lento. No obstante, se observó tanto en hoja como en raíz, mayor contenido de N, P, K, Mg, Ca, S, B, Zn y Mn en las plantas inoculadas que en las que no lo fueron. En la raíz de plantas inoculadas se encontró adicionalmente altos niveles de Fe. Los resultados se pueden observar a continuación en la figura 4.

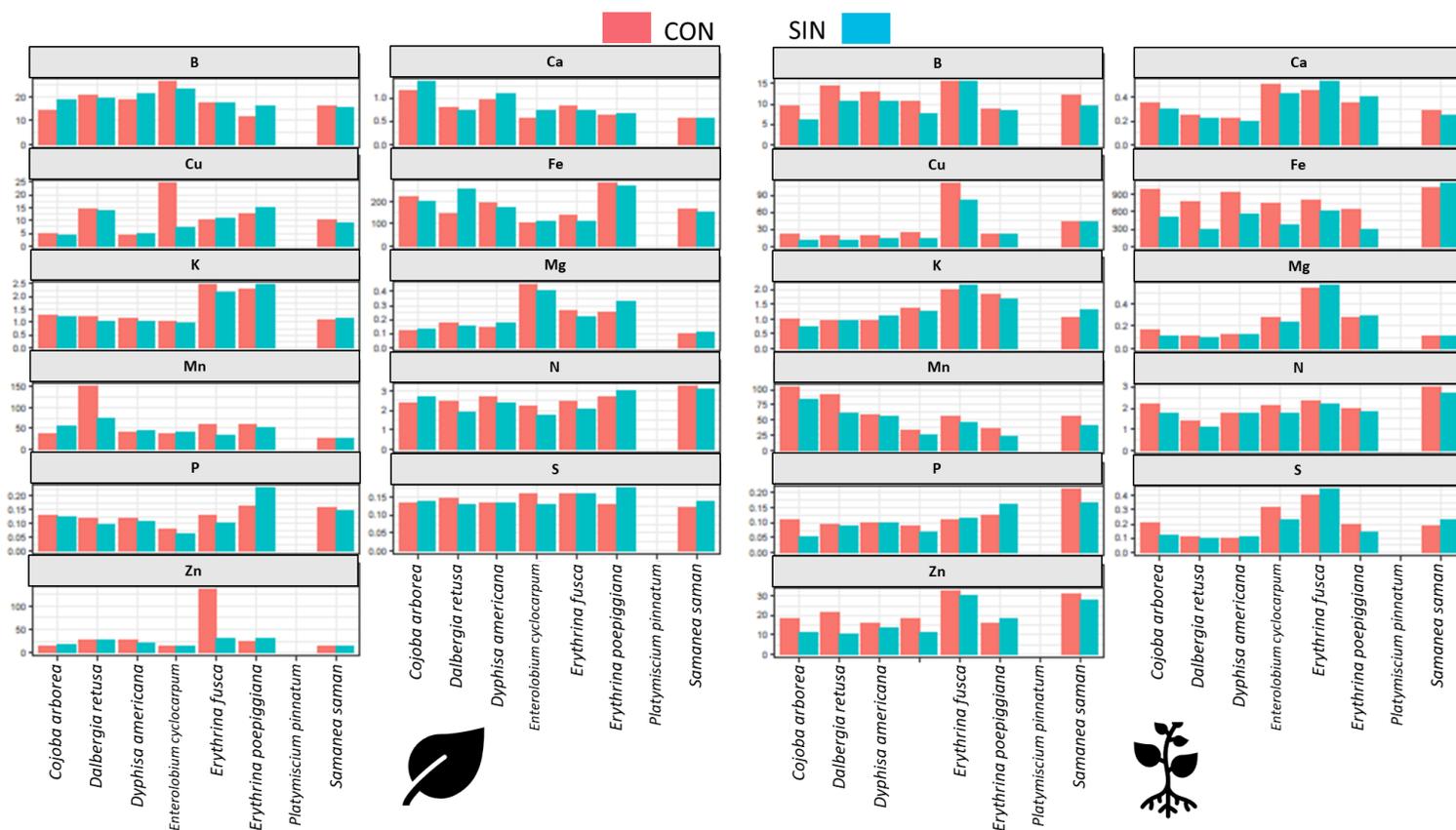


Figura 4. Contenido de nutrientes en hoja (izquierda) y raíz (derecha) para las especies forestales leguminosas estudiadas.

Al agrupar las especies por subfamilia se observó a Caesalpiaceae con mayor contenido de nutrientes, tanto en hoja como en raíz, en comparación a Papilionaceae. Se obtuvo mayor cantidad de P, S y Fe en hoja, así como N, S, Mg, B, Zn, Fe y Mn en raíz. En la subfamilia Papilionaceae solamente se presentó más alto el Mg que en la Caesalpiaceae.

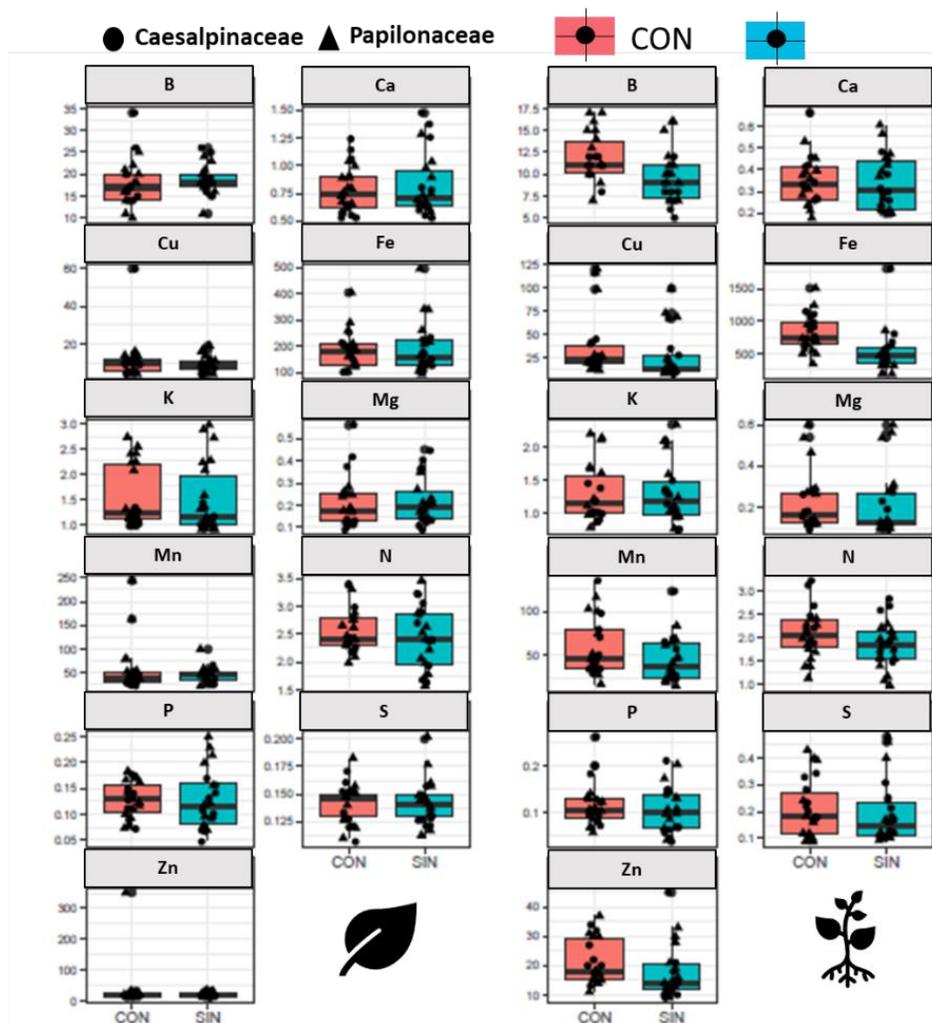


Figura 5. Contenido de nutrientes en hoja (izquierda) y raíz (derecha) agrupados por subfamilia en las especies leguminosas forestales en estudio.

Se logró identificar algunas correlaciones entre las variables (tabla 3). Entre las de mayor magnitud (>0.6) fueron altura con vigor, así como el peso de raíz con área foliar, grosor de tallo y altura. Entre las de magnitud intermedia ($0.4-0.6$) fueron área foliar con altura, grosor de tallo, vigor y número de nódulos. También se encontró relacionado al peso de raíz con vigor, número de nódulos y actividad nitrogenasa. Finalmente, grosor de tallo con vigor y altura. Las restantes fueron menores (<0.4).

Tabla 3. Correlaciones entre variables utilizadas para evaluar la eficacia de inoculación con bacterias simbióticas provenientes de leguminosas forestales.

	Altura (cm)	Grosor (mm)	# Hojas	Vigor (1-5)	# Nódulos	CO2 (ppm)	mmol N2/hr/pl	Long. Raíz (cm)	Peso Raíz (g)	Area foliar (cm ²)
Altura (cm)	1									
Grosor (mm)	0,58	1								
# hojas	0,29	-0,22	1							
Vigor (1-5)	0,71	0,50	0,26	1						
# nódulos	0,32	-0,01	-0,08	0,22	1					
CO2 (ppm)	-0,15	-0,11	-0,03	-0,13	-0,05	1				
mmol N2/hr/pl.	0,39	0,17	0,02	0,26	0,47	-0,07	1			
Long. Raíz (cm)	0,14	-0,07	0,23	0,18	0,21	0,00	0,11	1		
Peso Raíz (g)	0,63	0,80	-0,17	0,57	0,12	-0,09	0,24	0,05	1	
Area foliar (cm ²)	0,52	0,48	-0,07	0,57	0,45	-0,05	0,32	0,20	0,64	1

Discusión

Las bacterias que fueron identificadas tienen características que las hacen candidatas para un potencial biofertilizante. Estas especies han sido reportadas en otros hospederos diferentes a los usados en este estudio, por lo cual se amplía el espectro en el cual están presentes y generan efectos benéficos en el crecimiento de especies forestales comúnmente utilizadas en Costa Rica.

R. miluonense registra asocio con especies de *Lespedeza* spp. (Gu *et al.*, 2018), *Inga laurina* (Salles *et al.*, 2015), *Phaseolus vulgaris* (Oliveira *et al.*, 2017), *Milletia pinnata* (Arpiwi *et al.*, 2012) y *Arachis hypogaea* (Nguyen *et al.*, 2022). Taktek *et al.* (2017) mencionan que *R. miluonense* puede producir biofilm y movilizar fósforo en asocio con micorrizas (*Rhizogloium irregulare*). La bacteria parece ser del tipo generalista y no ha sido reportada en *S. saman*.

R. multihospitium se registra en una gran cantidad de hospederos vegetales (Han *et al.*, 2008; Mir *et al.*, 2021; Soto-Valenzuela, *et al.*, 2021; Nguyen *et al.*, 2022) por lo que se considera que es generalista y además no ha sido reportada en *C. arborea*.

B. japonicum es ampliamente utilizada para la producción de soya y se ha secuenciado su genoma completo (Kaneko *et al.*, 2002). Es una especie que se encuentra en hospederos como *Glycine max*, *Glycine soja*, *Vigna radiata*, *Macroptilium atropurpureum* (Chun *et al.*, 1994), *Vigna unguiculata* (Göttferd *et al.*, 1990) y *Acacia albida* (Dupuy *et al.*, 1994). No ha sido reportada en *E. fusca*, *E. poepiggiana* y *D. americana*.

Bradyrhizobium sp. es un género de bacterias que se ha registrado en especies herbáceas y leñosas, en ambientes templados y tropicales, así como en diversos nichos ecológicos (Vinuesa *et al.*, 2003). Tienen un metabolismo diverso en el cual pueden realizar procesos de desnitrificación, ser endófitos o de vida libre, degradar xenobióticos o alobenzoatos, ser promotoras de crecimiento en leguminosas y no leguminosas como es el caso de arroz e incluso algunas pueden fotosintetizar (Chaintreuil *et al.*, 2000; Kitagawa *et al.*, 2002; Kurz y LaRue, 1975; Mesa *et al.*, 2002; Bedmar *et al.*, 2005)

Las especies bacterianas identificadas posiblemente sean los primeros registros de presencia en las especies vegetales en estudio. Para las especies no identificadas de *Bradyrhizobium* se recomienda utilizar otros marcadores moleculares como son *recA*, *atpD*, *rpoB*, *glnII*, *nifH* y *nodC* para determinar su identidad (Vinuesa *et al.*, 2005; Rivas *et al.*, 2009).

En cuanto a la actividad de la nitrogenasa se determinó que hay una correlación entre el número de nódulos y la actividad de la enzima, siendo los tratamientos inoculados los que generalmente tuvieron mayor actividad. Lo anterior evidencia una relación causa-efecto en donde la inoculación aumenta número de nódulos, y esto a su vez, la magnitud de fijación de nitrógeno.

En este estudio se encontró una actividad de la enzima de 0.62-1.58 $\mu\text{mol/N/hr/pl}$, mientras Lamel y Cruz (2013), Bünger *et al.* (2021) y Bonaldi *et al.* (2011) reportan una menor actividad con 0.1-0.4 (*Phaseolus vulgaris*), 0.02-0.18 (*Mimosa scabrella* y *P. vulgaris*), 0.36-0.64 (*Aeschynomene afraspera* y *A. indica*) $\mu\text{mol/N/hr/pl}$ respectivamente. Ladestam *et al.* (2020) y Ma *et al.* (2022) reportan una mayor actividad con 0.4-8.7 (*Medicago sativa*, *Pisum sativum*, *P. vulgaris*, *Glycine max*, *Arachis hypogea* y *M. atropurpureum*) y 2.9-9 (*G. max*) $\mu\text{mol/N/hr/pl}$ respectivamente. Lo anterior evidencia la variabilidad de fijación entre simbio-variedades.

Las leguminosas utilizan la fijación de nitrógeno para colonizar rápidamente nichos ecológicos como sucede en los bosques neotropicales (Gei *et al.*, 2018) y al estimular la actividad nitrogenasa por medio de inoculantes bacterianos se potencializa este efecto, tanto en las especies estudiadas, como en la gran mayoría de especies en la familia Fabaceae. De acuerdo Guo *et al.* (2012), la aplicación de rizobios puede reducir los fertilizantes nitrogenados y la contaminación ambiental, así como incrementar el rendimiento y calidad de las plantas.

En relación con las variables morfométricas se observó que si hubo respuesta al aplicar el inoculante bacteriano en las ocho especies forestales leguminosas cuando se observan de manera general y por subfamilia. Cuando se observan los valores por especie la respuesta depende de las particularidades de cada una de ellas, no obstante, siempre se manifestó una respuesta positiva al inoculado bacteriano.

R. miluonense: no aumentó significativamente los niveles de nutrimentos en *S. saman*, no obstante, se mejoraron seis de diez variables cuantificadas. Por tanto, se considera que la bacteria si tuvo un efecto en el crecimiento. Wyse, Saggin y Miana (2021) aplicaron *Bradyrhizobium elkanii* BR 6205 y *B. elkanii* BR 6212 en *S. saman* aumentando en 70% la nodulación y variables morfométricas; en el presente estudio se aumentó en 13% la nodulación con *R. miluonense*. De acuerdo con lo anterior, *S. saman* podría también ser una especie que acepte varias especies de bacterias simbióticas.

R. multihospitium: produjo un incremento en los niveles de algunos nutrimentos en *C. arborea*, tanto a nivel foliar como radicular, y, a su vez logró mejorar cuatro variables del crecimiento. Por tanto, se considera que la bacteria tuvo un efecto positivo en *C. arborea* donde se obtuvo un 43% más de nodulación en comparación al testigo sin inocular. Nguyen *et al.* (2022) aislaron esta especie, junto con otras como *R. miluonense*, de *A. hypogaea*; posteriormente se inocularon en maní y arroz obteniendo mejora en la germinación. En este estudio se menciona que *R. multihospitium* y *R. miluonense* crecen a temperaturas de 15-44 °C y toleran hasta 2% de NaCl por lo que son candidatas para estudios en plantaciones de zonas secas y salinas.

B. japonicum: en las tres especies vegetales donde fue aplicada no mejoró los niveles de nutrimentos en los tejidos, sin embargo, en las variables morfométricas mejoró en *E. fusca* seis variables, en *E. poepiggiana* tres y en *D. americana* una. De acuerdo con lo anterior se considera que la bacteria no fue tan buen inoculante para *E. poepiggiana* y *D. americana*, pero si para *E. fusca*. Además del efecto ampliamente documentado de *B. japonicum* sobre soya también se ha comprobado que puede asociarse con otras especies vegetales como arroz, maíz, trigo y sorgo. En *Avena sativa* y *Lolium multiflorum* mejoran el volumen radicular (de Castillo *et al.*, 2021) en comparación a plantas no inoculadas.

Bradyrhizobium sp.: en las tres especies vegetales donde fue aplicada incrementó valores de nutrimentos. En *D. retusa* y *E. cyclocarpum* se incrementó valores de N, Mg y S en follaje y de N, P, K, Mg, S, Fe, Mn, Cu, B y Zn en raíz. En *P. pinnatum*, aunque solo fue posible obtener una réplica por ser una especie de lento crecimiento, se incrementó prácticamente todos los nutrimentos tanto a nivel foliar como radicular. Además, mejoró seis, cuatro y dos variables para *E. cyclocarpum*, *D. retusa* y *P. pinnatum* respectivamente. Simbine *et al.* (2021) evaluaron diferentes especies de *Bradyrhizobium* sobre *V. radiata* encontrando una efectividad relativa mayor a 80% en 72-83% de las cepas colectadas en varias zonas agroecológicas.

En general, la mejoría registrada en este estudio en cuanto a las variables morfométricas concuerda con lo reportado por Acuña *et al.* (1987), Acuña y Uribe (1996), Wyse, Saggin y Miana (2021) y de Castilho *et al.*, (2021) donde se mejora al menos una variable. Bajo las condiciones de este experimento fueron mejoradas de una a seis, dependiendo de la especie vegetal. Lo anterior es importante dado que, la calidad de las plántulas forestales es un factor de gran importancia, especialmente en los primeros meses después de la plantación, cuando están sometidas a condiciones ambientales más adversas (Grossnickle, 2012). Con inoculantes bacterianos se puede obtener mayor sobrevivencia y crecimiento de plántulas (Salles *et al.*, 2015) por supresión de enfermedades, promoción de crecimiento y fijación de nitrógeno (Bulgarelli *et al.*, 2013).

Al analizar la respuesta de crecimiento por especie hubo algunas que se mostraron más sensibles a la inoculación que otras, las razones para que esto suceda pueden enmarcarse entre varias, una de ellas es la relación planta-bacteria. En las especies con mejor desarrollo es posible que haya existido una relación entre simbio-variedad muy específica. Lo anterior ha sido propuesto y reportado por Rogel *et al.*, (2011). Un ejemplo de lo anterior es el caso de *E. fusca* y *E. poepiggiana*, de ambas se aisló *B. japonicum* pero la respuesta a la inoculación fue mejor en una especie que en la otra. Lo anterior se debe a que posiblemente la cepa aislada tiene una mayor adaptación y evolución simbiótica con *E. fusca*.

Otro factor que pudo haber estado inmerso en el experimento a pesar de que se obtuvo respuesta positiva a la inoculación en la mayoría de las especies es, la competencia. Lo anterior se menciona dado que, el experimento fue llevado en condiciones ambientales abiertas y la medición de respiración microbiana fue igual tanto en tratamientos inoculados como en los que no lo fueron. La competencia entre bacterias ha sido reportada por Denton *et al.* (2002). Dicho lo anterior, debe considerarse la reinoculación y frecuencia para mantener a la bacteria de interés en contacto con las raíces y, de esta forma, colonizar sitios de infección antes que otras especies y/o cepas. Esto es particularmente importante, dado que Zanetti *et al.* (2010) reportan que los huéspedes suelen escoger cepas de mayor calidad infectiva.

Otro aspecto por considerar es el comportamiento de las llamadas leguminosas “promiscuas”. Esto supondría una ventaja para ser inoculada con varias especies bacterianas, pero también abre la posibilidad a la competencia entre ellas. Lo anterior ha sido reportado ampliamente en frijol. Talbi *et al.* (2010) mencionan cinco especies de rizobios con capacidad para nodular frijol y además reportan a *Burkholderia phymatum*. En el presente estudio se ejemplifica con *S. saman*, donde fue inoculada con *R. miluonense*, no obstante, también está reportado que mejora su crecimiento con inoculados de *B. elkanii* cepas BR 6205 y BR 6212 (Wyse, Saggin y Miana, 2021).

Por tanto, tomando en cuenta la posibilidad de competencia, la promiscuidad de algunas leguminosas, especificidad de simbiovariedades y el potencial que tienen las bacterias fijadoras de nitrógeno para reducir la aplicación de fertilizantes sintéticos, se recomienda que un posible biofertilizante se formule tanto a nivel específico para un cultivo forestal como también valorar la posibilidad de formular un consorcio bacteriano para especies vegetales promiscuas. Se debe valorar la calidad de cada bacteria para infectar en presencia de otras especies bacterianas.

Las especies bacterianas aquí identificadas podrían también tener potencial para ser aplicadas en otras especies vegetales, dado que, se ha comprobado bioestimulación en otros cultivos no leguminosos como maíz (Pessoa *et al.*, 2020). Además, es posible que sean nuevos registros en hospederos que no han sido reportados a la fecha.

Considerando los aspectos mencionados, algunos factores que no intervienen en pequeños experimentos localizados bajo condiciones controladas en laboratorios y ambientes protegidos es posible que hayan intervenido bajo condiciones de campo. Dicho lo anterior, un estudio de esta naturaleza brinda una perspectiva de la respuesta que se puede obtener en una dinámica multifactorial similar a las condiciones que se presentan en una plantación forestal.

Agradecimientos

Este estudio fue financiado por el Proyecto C0-524 y B9-204 y ejecutado en el LEGMI (Laboratorio de Ecología y Genética de Microorganismos) de la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica. Se agradece al Centro de Investigaciones en Productos Naturales (CIPRONA) de la Universidad de Costa Rica por facilitar las instalaciones y acompañamiento del personal especializado.

Referencias

- Acuña, O, Ramirez, C., Montero, R., Mata, E. (1987). Respuesta de la soya a la inoculación con diversas cepas de *Rhizobium japonicum* en Liberia, Guanacaste. *Agronomía Costarricense*, 11(1): 33-37
- Acuña, O. (1996). Manejo y tecnología de la fijación biológica de nitrógeno en leguminosas de importancia agrícola. Ponencia en el X Congreso Nacional Agronómico. 6 p.
- Acuña, O., Uribe, L. (1996). Inoculación del frijol común con tres cepas seleccionadas de *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli. *Agronomía Mesoamericana* 7(1): 35-40
- Arpiwi, N.L., Yan, G., Barbour, E.L., Plummer, J.A., Watkin, E. (2012). Phenotypic and genotypic characterisation of root nodule bacteria nodulating *Millettia pinnata* (L.) Panigrahi, a biodiesel tree. *Plant Soil*, 367: 363-377. doi: <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1472-4>
- Bedmar, E.J., Robles, E.F., Delgado, M.J. (2005). The complete denitrification pathway of the symbiotic nitrogen-fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochem. Soc. Trans.*, 33(1):141-144. doi: <https://doi.org/10.1042/BST0330141>
- Blanco-Canqui, H., Shaver, T.M., Lindquist, J.L., Shapiro, C., Elmore, R., Francis, C. y Hergert, G. (2015). Cover crops and ecosystem services: insights from studies in temperate soils. *Agronomy Journal*, 107: 2449-2474. doi: <https://doi.org/10.2134/agronj15.0086>

Bonaldi, K., Gargani, D., Prin, Y., Fardoux, J., Gully, D., Nouwen, N., Goormachtig, S., Giraud, E. (2011). Nodulation of *Aeschynomene afraspera* and *A. indica* by Photosynthetic *Bradyrhizobium* sp. strain ORS285: The Nod-Dependent Versus the Nod-Independent Symbiotic Interaction. *MPMI*, 24(11): 1359-1371. doi: <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-11-0093>

Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen S., van Themaat, E., Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual Review of Plant Biology*, 64: 807-838.

Bünger, W., Sarkar, A., Grönemeyer, J., Zielinski, J., Revermann, R., Hurek, T., Reinhold-Hurek, B. (2021). Root nodule rhizobia from undomesticated shrubs of the dry woodlands of Southern Africa can nodulate Angolan teak *Pterocarpus angolensis*, an important source of timber. *Front. Microb.*, 12. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.611704>

Burke C., Steinberg P., Rusch D., Kjelleberg S., Thomas T. (2011). Bacterial community assembly based on functional genes rather than species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 108 (34): 14288-14293

Cabral, E. (2010). Core Eucotiledoneas Clado Rosides: Biotaxonomía de Spermatófitas y Diversidad Vegetal. Editorial, FACENA, Universidad Nacional del Nordeste. Buenos Aires, Argentina. Disponible en: <https://exa.unne.edu.ar/carreras/docs/8-%20Rosideas.pdf>

Castro-Rincón, E., Mojica-Rodriguez, J., Carulla-Fornaguera, J.E. y Lascano-Aguilar, C.E. (2018). Abonos verdes de leguminosas: integración en sistemas agrícolas y ganaderas del trópico. *Agronomía Mesoamericana*, 29(3): 711-729.

Céspedes, S., Zuñiga, A., Mendoza, A., Montero, K. y Chaves, A. (2019). Evaluación de la incorporación de *Mucuna pruriens* L. (Fabaceae) y *Crotalaria spectabilis* Roth (Fabaceae), sobre el aporte y absorción de nutrientes en el cultivo de arroz. *Repertorio Científico*, 22(1): 29-37.

Chaintreuil, C., Giraud, E., Prin, Y., Lorquin, Y., Ba, A., Gillis, M., de Lajudie, P., Dreyfus, B. (2000). Photosynthetic Bradyrhizobia are natural endophytes of the african wild rice *Oryza breviligulata*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12): 5437-5447. doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.66.12.5437-5447.2000>

Chen, G. y Weil, R.R. (2009). Penetration of cover crops roots through compacted soils. *Plant and Soil*, 331: 31-43.

- Cherr, C.M., Scholberg, J.M.S. y McSorley, R. (2006). Green manure approaches to crop production: A synthesis. *Agron. J.*, 98: 302-319. doi: <https://doi.org/10.2134/agronj2005.0035>
- Chun, J-Y., Sexton, G., Evans, R., Stacey, G. (1994). Identification and Characterization of a Novel *Bradyrhizobium japonicum* Gene Involved in Host-Specific Nitrogen Fixation. *Jrnl. Bacteriol.*, 176(21): 6717-6729.
- Cordero, J., Boshier, D.H. (2003). Árboles de Centroamérica: un manual para extensionistas. Editorial, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Cartago, Costa Rica. Consultado el día 20 de febrero de 2022. Disponible en: <https://orton.catie.ac.cr/repdoc/a11445e/a11445e.pdf>
- de Castilho, C.L., Volpiano, C.G., Ambrosini, A., Zulpo, L., Passaglia, L., Beneduzi, A., de Sá, E.L.S. (2021). Growth-promoting effects of *Bradyrhizobium* soybean symbionts in black oats, white oats, and ryegrass. *Braz. J. Microbiol.*, 52(3): 1451-1460. doi: <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00523-1>
- de Bedout, M, Solis-Ramos, L., Valverde-Barrantes, O., Rojas-Jiménez, K. (2022). Capacidad de nodulación en especies forestales leguminosas (Fabaceae) según su filogenia y características morfológicas. *Rev. For. Mesoam. Kurú*, 19(45). doi: <https://doi.org/0.18845/rfmk.v19i45.6315>
- Denton, M.D., Coventry, D.R., Murphy, P.J., Howieson, J.G., Bellotti, W.D. (2002). Competition between inoculant and naturalised *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii for nodulation of annual clovers in alkaline soils. *Aust. J. Agric. Res.*, 53: 1019-1026. doi: <https://doi.org/10.1071/AR01138>
- Doetsch, R.N. (1981). Determinative methods of light microscopy. In: *Manual of methods for general bacteriology*. Washington, U.S.A.: Am Soc Microb.
- Dupuy, N., Willems, A., Pot, B., Dewettinck, D., Vandenbruaene, I., Maestrojuan, G., Dreyfus, B., Kersters, K., Collins, M.D., Gillins, M. (1994). Phenotypic and Genotypic Characterization of Bradyrhizobia Nodulating the Leguminous Tree *Acacia albida*. *Int. Jrnl. System. Evol. Microb.*, 44(3): 461-473. doi: <https://doi.org/10.1099/00207713-44-3-461>
- Gei, M., Rozendaal, D.M.A., Poorter, L., Bongers, F., Sprent, J.I., et al. (2018). Legume abundance along successional and rainfall gradients in Neotropical forests. *Nat Ecol Evol*, 2: 1104-1111. doi: <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0559-6>

Gomez-Gomez R., Gonzalez-Lutz M.I. (2018). Response of five legumes cover crops to phosphoric fertilization. *Agronomía Mesoamericana* 29(2): 293-303.

Göttferd, M., Grob, P., Hennecke, G. (1990). Proposed regulatory pathway encoded by the nodV and nodW genes, determinants of host specificity in *Bradyrhizobium japonicum*. *Proc.Nad.Acad.Sci.USA*, 87: 2680-2684.

Grossnickle, S.C. (2012). Why seedlings survive: influence of plant attributes. *New Forests*, 43 (5/6): 711-738. doi: <https://doi.org/10.1007/s11056-012-9336-6>

Gu, C.T., Wang, E.T., Tian, C.F., Han, T.X., Chen, W.F., Sui, X.H., Chen, W.X. (2008). *Rhizobium miluonense* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from *Lespedeza* root nodules. *Int J Syst Evol Microbiol.* 58 (6): 1364-1368. doi: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65661-0>

Guo, L.Z., Zhang, H.T., He, Y.H., Cai, Q., Huang, G.B. (2012). Effect of rhizobium on crop growth and nitrogen nutrition of a pea/maize intercropping system. *Acta Pratac. Sin.*, 21: 46–47. doi: <https://doi.org/10.18805/ijare.v51i03.7908>

Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*, 41(41): 95-98.

Han, T.X., Wang, E.T., Wu, L.J., Chen, W.F., Gu, J.G., Gu, C.T., Tian, C.F., Chen, W.X. (2008). *Rhizobium multihospitium* sp. nov., isolated from multiple legume species native of Xinjiang, China. *Int. J. Syst. Evol. Microb.*, 58: 1693-1699. doi: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65568-0>

Hardy, R.W.F., Burns, R.C., Holsten, R.D. (1973). Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biol. Biochem.*, 5:47-81. doi: [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(73\)90093-X](https://doi.org/10.1016/0038-0717(73)90093-X)

Hasekett, T., Knights, H.E., Jorin, B., Mendes, M.M., Poole, P.S (2021). A Simple in situ Assay to Assess Plant-Associative Bacterial Nitrogenase Activity. *Front. Microbiol.*, 12. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.690439>

Hördt, A., García, M., Meier-Kolthoff, J., Schleuning, M., Weinhold, L-M., Tindall, B., Gronow, S., Kyrpides, N., Woyke, T., Göker, M. (2020). Analysis of 1,000+ Type-Strain Genomes Substantially Improves Taxonomic Classification of Alphaproteobacteria. *Front. Microbiol.*, 11: 468. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00468>

- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Minamisawa, K., Uchiumi, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Iriguchi, M., Kawashima, K., Kohara, M., Matsumoto, M., Shimpo, S., Tsuruoka, H., Wada, T., Yamada, M., Tabata, S. (2002). Complete Genomic Sequence of Nitrogen-fixing Symbiotic Bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Research*, 9 (6): 189-197. doi: <https://doi.org/10.1093/dnares/9.6.189>
- Kaye, J.P. y Quemada, M. (2017). Using cover crops to mitigate and adapt to climate change. *Agron. Sustain. Dev.*, 37(4): 1-17. doi: <https://doi.org/10.1007/s13593-016-0410-x>
- Kitawaga, W., Takami, S., Miyauchi, K., Masai, E., Kamagata, Y., Tiedje, J., Fukuda, M. (2002). Novel 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid degradation genes from oligotrophic *Bradyrhizobium* sp. Strain HW13 isolated from a pristine environment. *Journal of Bacteriology*, 184(2): 509-518. doi: <https://doi.org/10.1128/JB.184.2.509-518.2002>
- Kurz, W.G.W., Larue, T.A. (1975). Nitrogenase activity in rhizobia in absence of plant host. *Nature*, 256: 407-409.
- Labrador, J. (2009). Manejo del suelo en los sistemas agrícolas de producción ecológica. I edición, Junta de Andalucía y la Sociedad Española de Agricultura Ecológica. Andalucía, España. 52 p.
- Ladestam, Z., Retnaningrum, E., Dwidya, I. (2020). Symbiotic Performance of Several Leguminous Plants with Legume Nodule Bacteria Isolated from Siratro (*Macroptilium atropurpureum*) at Mount Merapi Eruption, Indonesia. *AIP Conference Proceedings* 2260, 020019. doi: <https://doi.org/10.1063/5.0015969>
- Lamel, D., Cruz, L. (2013). Diversity and symbiotic effectiveness of beta-rhizobia isolated from sub-tropical legumes of a Brazilian Araucaria Forest. *World J Microbiol Biotechnol.* 29: 2335-2342. doi: <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1400-7>
- Lane, D.J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E.; Goodfellow, M., (Eds.). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. New York: John Wiley and Sons, pp. 115-175.
- Leon, E., Acuña, O., Ramirez, C. (1986) (a). Evaluación de la reproducción y sobrevivencia de bacterias del género *Rhizobium* en suelos de turba de la zona de Medio Queso, Los Chiles. *Agronomía Costarricense*, 10(1-2): 33-41
- Leon, E., Acuña, O., Ramirez, C. (1986) (b). Reproducción y sobrevivencia de *Rhizobium japonicum* en inoculantes a base de turba de Costa Rica. *Ceiba*, 27(1): 139-145.

- Ma, J., Zhou, Y., Li, J., Song, Z. (2022). Novel approach to enhance *Bradyrhizobium diazoefficiens* nodulation through continuous induction of ROS by manganese ferrite nanomaterials in soybean. *J. Nanobiotech.*, 20: 168. doi: <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01372-2>
- Mesa, S., Velasco, L., Manzanera, M.E., Delgado, M.A.J., Bedmar, E.J. (2002) Characterization of the norCBQD genes, encoding nitric oxide reductase, in the nitrogen fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Microbiology (Reading)*, 148(11): 3553-3560. doi: <https://doi.org/10.1099/00221287-148-11-3553>
- Mir, M.I., Kumar, B.K., Gopalakrishnan, S., Vadlamudi, S., Hameeda, B. (2021). Characterization of rhizobia isolated from leguminous plants and their impact on the growth of ICCV 2 variety of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Heliyon*, 7(11): e08321. doi: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08321>
- Morales, M. (1987). Selección y evaluación de cepas *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli tolerantes al suministro restringido de fósforo. Tesis MSc. CATIE Turrialba, Costa Rica. 97 p.
- Nguyen, T.H., Vo, T.M., Nguyen, M.K., Pham, C.D., Phum, T.T., Doan, T.M., Le, T.P., Nguyen, N.A., Ta, N.M., Tran, T.K., Nguyen, M.Q., Nguyen, T.D. (2022). Isolation and characterization of *Rhizobium* spp. and *Bradyrhizobium* spp. from legume nodules. *HCMCOUJS-Eng. and Technol.*, 12(2): 70-98. doi: <https://doi.org/10.46223/HCMCOUJS.tech.en.12.2.2116.2022>
- Oliveira, D.P., Figueiredo, M.A. de, Soares, B.L., Teixeira, O.H.S., Martins, F.A.D., Rufini, M., Chain, C.P., Reis, R.P., Morais, A.R. de, Moreira, F.M. de S., Andrade, M.J.B. de (2017). Acid tolerant *Rhizobium* strains contribute to increasing the yield and profitability of common bean in tropical soils. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 17 (4): 922-934.
- Perez C., Carrillo G., Vidal E., Ortiz, E. (2016). Imbibition effects in the physiological quality of tomato seeds. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 7(7): 1765-1773.
- Pessoa, M.I, de Carvalho, R., Ribeiro, D., Costa, I.E., Resende, A.C., Pereira, A., Santiago de Freitas, A.D., Simão, R., Fernandes-Júnior, P-I. (2020). Maize growth and yield promoting endophytes isolated into a legume root nodule by a cross-over approach. *Rhizosphere*, 15: 100211. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100211>

Ribó, M. (2004). Balance de macronutrientes y materia orgánica en el suelo de agrosistemas hortícolas con manejo integrado ecológico. Universidad de Valencia. Valencia, España. 175 p.

Rodríguez-Sosa J.L, Valdés-Roblejo, J; Rodríguez R. (2012). Tratamientos a semillas para mejorar la germinación de *Colubrina ferrugosa* Brong. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente, 18(1): 27-31.

Rogel, M.A., Ormeño-Orrillo, E., Martínez-Romero, E. (2011). Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. System. Appl. Microbiol., 34: 96-104. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2010.11.015>

Rstudio (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA. Disponible en: <http://www.rstudio.com/>

Roy, S., Liu, W., Nandety, R.S., Crook, A., Mysore, K.S., et al. (2020). Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation. The Plant Cell, 32 (1): 15-41. doi: <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00279>

Rivas, R., Martens, M., De Lajudie, P., Willems, A. (2009). Multilocus sequence analysis of the genus *Bradyrhizobium*. Syst. Appl. Microbiol. 32: 101-110. doi: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.12.005>

Salles, G., Gross, E., Brito-Rocha, E., Schramm, M. (2015). Efeitos da inoculação com bactérias diazotróficas e da adubação nitrogenada no crescimento e na qualidade de mudas de *Inga laurina* (sw.) willd. (fabaceae). Rev. Árbore, 39(6): 1031-1038. doi: <https://doi.org/10.1590/0100-67622015000600005>

Sánchez de Prager, M, Gomes López, E.D. (2001). La fruticultura orgánica en el Cauca, Colombia - Un manual para el campesinado: Manejo de recursos biológicos como activadores de la fertilidad del suelo en frutales. Ed. J Pohlan. ECOSUR. Tapachula, México. 314 p.

Senthilkumar, M., Amaresan, N. y Sankaranarayanan, A. (2021). Plant-Microbe interactions: Laboratory Techniques. Chapter 5: Quantitative Estimation of Nitrogenase Activity: Acetylene Reduction Assay. Ed. Springer Protocols Handbook. New York, USA.

Simbine, M.G., Mohammed, M., Jaiswal, S.K., Dakora, F. (2021). Functional and genetic diversity of native rhizobial isolates nodulating cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) in Mozambican soils. Sci. Rep., 11: 12747. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91889-7>

- Smercina, D.N., Evans, S.E., Friesen, M.L. et al. (2019). Optimization of the $^{15}\text{N}_2$ incorporation and acetylene reduction methods for free-living nitrogen fixation. *Plant Soil*, 445: 595-611. doi: <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04307-3>
- Soto-Valenzuela, J., Ormeño-Orrillo, E., Zúñiga-Dávila, D. (2021). Diversity and biological nitrogen fixation of rhizobia isolated from *Clitoria brachystegia*, in tropical dry forest remnants of Ecuador and Peru. *Rev. Mex. Biod.* 92: e923426. doi: <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2021.92.3426>
- Taktek, S., St-Arnaud, M., Piché, Y., Fortin, J.A., Antoun, H. (2017). Igneous phosphate rock solubilization by biofilm-forming mycorrhizobacteria and hyphobacteria associated with *Rhizoglyphus irregulare* DAOM 197198. *Mycorrhiza*, 27: 13-22. doi: <https://doi.org/10.1007/s00572-016-0726-z>
- Truscott, S., Lewis, R.S, Watt, G.D. (2021). Positive cooperativity during *Azotobacter vinelandii* nitrogenase-catalyzed acetylene reduction. *Biophysical Chemistry*. 277, 106650. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2021.106650>
- Uribe, L., Acuña, O., Hernández, G. (1990). Respuesta de *Phaseolus vulgaris* var. Negro Huasteco a la inoculación con tres cepas de *Rhizobium* bajo condiciones de mínima labranza en tres localidades de Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 14(2): 93-98.
- USDA (2012). United States Department of Agriculture: Sustainable Agriculture Research and Education (SARE). Types of cover crops. Disponible en: <https://www.sare.org/Learning-Center/Books/Building-Soils-for-Better-Crops-3rd-Edition/Text-Version/Cover-Crops/Types-of-Cover-Crops>
- Vinuesa, P., Silva, C., Werner, D., Romero-Martínez, E. (2003). Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 34(1): 29-54. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.08.020>
- Vinuesa, P., Silva, C., Lorite, M.J., Izaguirre-Mayoral, M.L., Bedmar, E.J., Martínez-Romero, E. (2005). Molecular systematics of rhizobia based on maximum likelihood and Bayesian phylogenies inferred from rrs, atpD, recA and nifH sequences, and their use in the classification of *Sesbania* microsymbionts from Venezuelan wetlands. *Systematic and Applied Microbiology*, 28: 702-716. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2005.05.007>.

Wang, L., Sun, Z., Chao, S., Yongliang W., Qiqi Y., Jiahuan C., Thomas O., Xia L. (2019). A GmNINA-miR172c-NNC1 Regulatory Network coordinates the nodulation and autoregulation of nodulation pathways in soybean. *Molecular Plant*, 12: 1211-1226.

Wyse, G., Saggin, O.J., Miana, S. (2021). Interaction of Substrates and Inoculants for *Samanea Saman* (Jacq.) Merr Seedling Production. *Floresta e Ambiente*, 28(4): e20210046. doi: <https://doi.org/10.1590/2179-8087-FLORAM-2021-0046>

Zanetti, M.E., Blanco, F.A., Beker, M.P., Battaglia, M., Aguilar, O.M. (2010). A C subunit of the plant nuclear factor NF-Y required for rhizobial infection and nodule development affects partner selection in the common bean-*Rhizobium etli* symbiosis. *Plant Cell*, 22(12): 4142-4157. doi: <https://doi.org/10.1105/tpc.110.079137>

Conclusiones

- ➔ Se publicó un artículo con base en la revisión de literatura efectuada como base para el desarrollo experimental. Se enfocó en presentar el proceso común de pre-colonización e infección que tienen las bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno con las micorrizas arbusculares, así como hacer un recuento de genes candidatos para ingeniería genética y edición genómica.
- ➔ Se aislaron tres especies de bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno, así como un género donde no hay registros de especie a la fecha. Es posible que con análisis posteriores se llegue a determinar una nueva especie asociada con forestales leguminosos tropicales en el género *Bradyrhizobium*.
- ➔ No se encontró registro de las bacterias identificadas presentes en los árboles forestales leguminosos, por lo cual, es posible que sean nuevos registros para los bosques forestales tropicales.
- ➔ Al efectuar la inoculación bacteriana en sus respectivos hospederos se obtuvo mejoría en el crecimiento en todas las especies. La magnitud dependió de la especie y la asociación con la bacteria.
- ➔ La subfamilia Caesalpiaceae presentó mejor respuesta al inoculante bacteriano que la subfamilia Papilionaceae.
- ➔ Algunos elementos químicos son absorbidos por las plantas en mayor medida al inocularse bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. La magnitud dependió de la especie, el tejido y la asociación bacteriana.
- ➔ La utilización de las bacterias para realizar inoculantes bacterianos evidenció una mejoría en los árboles forestales leguminosos y con ello se comprobó el potencial que tienen para el desarrollo como biofertilizantes.