


Capacidad de nodulación en especies forestales leguminosas (Fabaceae) según su filogenia y características morfológicas

Nodulation capacity in legume forest species (Fabaceae) according to their phylogeny and morphological characteristics

Marianne de Bedout-Mora¹  • Laura Yesenia Solis-Ramos¹  • Oscar Valverde-Barrantes² 
• Keilor Rojas-Jiménez¹ 

Recibido: 24/8/2021

Aceptado: 5/4/2022

Abstract

A large part of the success of legume plants (Fabaceae) in the different ecosystems of Costa Rica could be due to their ability to establish symbiotic relationships with microorganisms of the Rhizobiaceae family and to the fixed nitrogen that these bacteria can provide them. In this work, we evaluated the presence of nodules, the tissue where nitrogen fixation is carried out, in 24 forest species of legumes belonging to four subfamilies of Fabaceae, and several morphological characteristics of the roots were determined. The presence of nodules was detected in 14 of the 24 species (58.3 %); however, there were large differences between the subfamilies. In the two subfamilies considered the most basal (Detarioideae and Cercidoideae), no nodules were detected. In the Caesalpinioideae subfamily, nodules were reported in 58.3 % of the species, mostly restricted to the clade Mimosoideae. In the Papilionoideae family, considered the most derived, the presence of nodules was observed in 87.5 % of the evaluated species. Most species with nodules had a light coloration on their roots, and species without nodules had a darker coloration, with some exceptions. These trends are related to the phylogenetic history of the subfamilies and the origins of nodulation. However, they could also respond to different infection mechanisms and could even be related to physiological characteristics of plants, such as the production of secondary inhibitory compounds of the nodulation. In this way, this study constitutes the first step to understand better the interactions between nitrogen-fixing microorganisms with their hosts.

Keywords: Nitrogen fixation, trees, rhizobia, symbiosis, roots, Costa Rica.

1. Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, 11501 San José, Costa Rica; marianne.debedout@ucr.ac.cr, laura.solisramos@ucr.ac.cr, keilor.rojas@ucr.ac.cr

2. International Center of Tropical Biology, Institute of Environment, Florida International University, Miami, Florida, USA; ovalverd@fiu.edu

Resumen

Gran parte del éxito de las plantas leguminosas (Familia Fabaceae) en los diferentes ecosistemas de Costa Rica podría deberse a su capacidad de establecer relaciones simbióticas con microorganismos de la familia Rhizobiaceae y al nitrógeno fijado que estas bacterias les pueden proveer. En este trabajo, evaluamos la presencia de nódulos, tejido donde se realiza la fijación de nitrógeno, en 24 especies forestales de leguminosas pertenecientes a cuatro subfamilias de Fabaceae y se anotaron varias características morfológicas de las raíces. Se detectó la presencia de nódulos en 14 de las 24 especies (58.3 %), sin embargo, hubo grandes diferencias entre las subfamilias. En las dos subfamilias consideradas las más basales (Detarioideae y Cercidoideae) no se detectaron nódulos. En la subfamilia Caesalpinioideae, se reportaron nódulos en el 58.3% de las especies, restringidas mayoritariamente al clado Mimosoideae. En la familia Papilionoideae, considerada la más derivada, se observó la presencia de nódulos en el 87.5 % de las especies evaluadas. La mayoría de especies con nódulos presentaron una coloración clara en sus raíces y las especies sin nódulos una coloración más oscura, con algunas excepciones. Estas tendencias están relacionadas con la historia filogenética de las subfamilias y los orígenes de la nodulación. Sin embargo, también podrían responder a diferentes mecanismos de infección e incluso podrían relacionarse con características fisiológicas de las plantas, como la producción de compuestos secundarios inhibitorios de la nodulación. De esta forma, este estudio establece un primer paso para entender mejor las interacciones entre los microorganismos fijadores de nitrógeno con sus hospederos.

Palabras clave: Fijación de nitrógeno, árboles, rizobios, simbiosis, raíces, Costa Rica.

Introducción

Aunque cerca de un 78 % de la atmósfera está constituida por nitrógeno, este elemento no es fácilmente accesible a las plantas por estar en su forma gaseosa como dinitrógeno (N_2). Sin embargo, existen microorganismos que tienen la capacidad de convertir el dinitrógeno en amonio, una sal que puede ser asimilada por prácticamente todos los organismos. El nitrógeno es un nutriente esencial, ya que es el componente principal de las proteínas y ácidos nucleicos. Algunos grupos de plantas como las leguminosas resuelven gran parte de sus requerimientos de nitrógeno a través del establecimiento de relaciones simbióticas con ciertas bacterias, llamadas rizobios, que pueden proveer hasta

un 65 % del nitrógeno disponible y que por consiguiente tienen gran importancia agrícola y ecológica [1]–[3].

La relación simbiótica establecida entre los rizobios y sus hospederos leguminosos es el resultado de una compleja señalización entre el huésped y el simbionte, resultando en la formación de nódulos, donde se encuentran las formas bacterianas de fijación de nitrógeno llamadas bacterioides. La infección de leguminosas por rizobios involucra la quimiotaxis de la bacteria con ácidos orgánicos, aminoácidos, azúcares y flavonoides excretados por las raíces hospederas [3]–[6]. El proceso biológico resultante, comúnmente conocido como fijación biológica de nitrógeno, es particularmente importante ya que tiene el potencial de reducir los costos de producción y aumentar la agricultura sostenible en suelos tropicales [7].

Aunque la fijación biológica de nitrógeno es un sello distintivo de la familia Fabaceae, los nódulos rizobianos también se encuentran en el género *Parasponia* (Cannabaceae) y dentro de otras ocho familias de angiospermas hay especies que forman nódulos con bacterias del género *Frankia* (Rosaceae, Betulaceae, Casuarinaceae, Myricaceae, Rhamnaceae, Elaeagnaceae, Datisceae, Coriariaceae). Todas estas familias que forman nódulos radiculares para fijar nitrógeno pertenecen a un mismo clado, Eurosidas I (Orden Rosales + Cucurbitales + Fagales), dentro del cual también hay muchas especies que no forman estas simbiosis [5], [8], [9]. En el caso de Fabaceae, estudios comparativos con otras familias revelan que las leguminosas tienen sistemas radicales con mayor nitrógeno, menor largo específico de raíz y mayor diámetro que lo reportado en promedio para plantas con semillas [10], lo que sugiere una especialización particular de este grupo. Sin embargo, no está claro de donde proviene esta predisposición a formar nódulos, por qué no siempre se expresa, ni por qué existen diferencias morfológicas tan extensivas en los nódulos, pero muchas de estas respuestas pueden estar relacionadas con la historia evolutiva de estas plantas en conjunto con su historia biogeográfica y genética [9], [11]–[14].

En Costa Rica, a pesar de que se han realizado varios estudios sobre la nodulación, muchas especies nativas, sobre todo forestales, no se han caracterizado o han sido estudiadas solo de manera superficial. En este estudio se evaluó la presencia de nódulos en 24 especies forestales leguminosas, agrupadas en cuatro subfamilias de Fabaceae, con la finalidad de establecer conexiones entre la capacidad de fijar nitrógeno, la filogenia y la morfología de las raíces. El establecimiento de estas relaciones provee información valiosa sobre los procesos de nodulación para determinar la influencia de los factores evolutivos, características funcionales

o procesos químicos sobre la simbiosis. Siendo las leguminosas una familia con tanta importancia económica y ecológica, esta investigación proporcionará conocimientos fundamentales para la conservación y utilización de aquellas especies que se adaptan a vivir en condiciones ambientales adversas.

Materiales y métodos

En este estudio se evaluó la presencia de nódulos en 95 individuos de 24 especies de árboles leguminosos agrupadas en cuatro de las cinco subfamilias de Fabaceae, según la nueva clasificación APGII. Se utilizaron plantas de vivero entre los 30-70 cm de altura, la mayoría entre 0 y 2 años de edad, provenientes de un vivero forestal en San Carlos, el vivero de la Escuela de Ciencias Ambientales de la Universidad Nacional y otras creciendo como regeneración natural en jardines de la Sede Rodrigo Facio de la Universidad de Costa Rica. Se generó un árbol filogenético de las especies analizadas a partir de las secuencias del marcador TrnL y el espaciador intergénico TrnL-TrnF. Para la realización de la filogenia se bajaron las secuencias disponibles en Genbank del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide), luego se alinearon con el programa Mafft (mafft.cbrc.jp/alignment/server/), se editaron con el programa BioEdit [15]. El árbol filogenético de máxima verosimilitud se generó con un modelo GTR+G+I implementado en el programa FastTree [16]. Posteriormente el árbol fue visualizado con el programa MEGAX [17]. Para cada individuo, además de la presencia o ausencia de nódulos, se tomaron en cuenta características morfológicas como la coloración y el grosor de sus raíces.

Resultados y discusión

Se detectó la presencia de nódulos en 14 de las 24 especies (58.3 %), sin embargo, hubo grandes diferencias entre las subfamilias. En Detarioideae y Cercidoideae, consideradas como las más basales, no se detectaron nódulos. En la subfamilia Caesalpinioideae se encontraron nódulos en el 58.3 % de las especies analizadas, todas en el clado que antes se clasificaba como Mimosaceae. En la subfamilia Papilionoideae, considerada como la más derivada, se observó la presencia de nódulos en el 87.5 % de las especies evaluadas. En la Figura 1 se presenta un árbol filogenético de las especies estudiadas basado en el marcador molecular TrnL y el espaciador intergénico TrnL-TrnF, donde se marca la presencia o ausencia de nódulos, así como la coloración de la raíz. En general se distingue que las especies más derivadas de Fabaceae parecieran favorecer el establecimiento de relaciones simbióticas con bacterias rhizobiaceas y,

por tanto, la formación de nódulos que les permiten fijar nitrógeno atmosférico.

En las subfamilias de leguminosas pareciera existir un patrón que asocia la capacidad de formar nódulos según el orden en que estas subfamilias evolucionaron [18]. A partir de datos moleculares y fósiles de leguminosas, el origen de las leguminosas ha sido datado hace aproximadamente 59 millones de años, en un área semiárida al norte de la vía marítima de Tetis, con sus subfamilias reconocibles poco después [19], [20]. Como nuestros resultados sugieren, la nodulación está ausente en los primeros linajes divergentes de la familia y por lo tanto la formación de nódulos evolucionó en las leguminosas en algún momento cercano después del origen de la familia [21]. Esto concuerda con varias líneas de evidencia que sugieren que hace alrededor de 55 millones de años hubo un pico importante en el dióxido de carbono atmosférico, la temperatura y la humedad [22], [23]. Como el proceso de fijación biológica de nitrógeno utiliza una cantidad significativa del carbono total fijado por la planta huésped, el exceso de dióxido de carbono junto con un déficit de nitrógeno pudo haber sido una fuerza impulsora para el origen de la nodulación.

Además de las condiciones climáticas, hay otros componentes y requisitos que debieron ser necesarios para el origen de la nodulación. Uno de estos tuvo que haber sido la capacidad de los dos organismos que participan en la simbiosis para reconocerse entre sí [24]. En general, se acepta que esto se desarrolló a partir de la antigua simbiosis entre hongos y plantas terrestres para formar micorrizas arbusculares [25], [26]. Actualmente se hipotetiza que cuando las leguminosas se encontraban en evolución reciente, los rizobios explotaron esta vía de señalización micorrícica, imitando las señales fúngicas simbióticas [27]. También se ha sugerido que esta capacidad de señalización, y correspondientemente la nodulación en Fabaceae, ha surgido en eventos separados y se ha perdido en algunos linajes [9], [28]. Esta podría ser la razón del porqué diferentes mecanismos de infección se observan dentro de las subfamilias de leguminosas y del porqué diferentes linajes de plantas se asocian con diferentes linajes de bacterias [9], [28]. Por eso, las filogenias moleculares y los diferentes procesos de infección observados han revolucionado nuestra comprensión de las relaciones en las leguminosas y han llevado a una reorganización de los géneros y tribus tradicionales, aunque todavía exista una resolución incompleta en los clados más basales.

Estos análisis, por ejemplo, han confirmado que la nodulación ocurre en menor proporción en la subfamilia Caesalpinioideae, que ahora incluye lo que antes se consideraba la subfamilia Mimosoideae y en mayor proporción en la subfamilia monofilética Papilionoideae, aunque no sea universal en ninguno de los clados [20],

Cuadro 1. Lista de especies evaluadas en este estudio.**Table 1.** List of species evaluated in this study.

Especie	Subfamilia	Nombre común
<i>Bauhinia unguolata</i>	Cercidoideae	Casco Venado
<i>Caesalpinia pulcherrima</i>	Caesalpinioideae	Malinche enano
<i>Cassia fistula</i>	Caesalpinioideae	Cassia fistula
<i>Cojoba arborea</i>	Caesalpinioideae	Lorito
<i>Dalbergia retusa</i>	Papilionoideae	Cocobolo
<i>Delonix regia</i>	Caesalpinioideae	Malinche
<i>Diphysa americana</i>	Papilionoideae	Guachipelín
<i>Dipteryx panamensis</i>	Papilionoideae	Almendro
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	Caesalpinioideae	Guanacaste
<i>Erythrina poeppigiana</i>	Papilionoideae	Poro gigante
<i>Gliricidia sepium</i>	Papilionoideae	Madero negro
<i>Hymenaea courbaril</i>	Detarioideae	Guapinol
<i>Inga spectabilis</i>	Caesalpinioideae	Guaba candela
<i>Inga edulis</i>	Caesalpinioideae	Guaba
<i>Myroxylon balsamum</i>	Papilionoideae	Bálsamo
<i>Peltogyne purpurea</i>	Detarioideae	Nazareno
<i>Pentaclethra macroloba</i>	Caesalpinioideae	Gavilán
<i>Platymiscium parviflorum</i>	Papilionoideae	Cachimbo
<i>Platymiscium pinnatum</i>	Papilionoideae	Cristobal
<i>Samanea saman</i>	Caesalpinioideae	Cenizaro
<i>Schizolobium parahyba</i>	Caesalpinioideae	Gallinazo
<i>Senna papillosa</i>	Caesalpinioideae	Candelillo
<i>Tamarindus indica</i>	Detarioideae	Tamarindo
<i>Zygia longifolia</i>	Caesalpinioideae	Sotacaballo

[21]. En Caesalpinioideae se han encontrado raíces invadidas por rizobios, con hilos de infección transcelular, pero sin la formación de nódulos [29]. Esto apoya el razonamiento que, inicialmente, la formación de hilos de infección transcelular era una respuesta de defensa a un organismo invasor, ahora considerado simbiote, que evolucionó para desarrollar la infección del pelo radicular en los nódulos [30]. Por otro lado, en Papilionoideae, donde algunos de los linajes divergentes más tempranos parecen ser incapaces de nodular, se liga el origen de la nodulación después de un evento de poliploidía desde el cual se reclutan los genes necesarios. Se ha sugerido que los principales donantes de genes duplicados fueron los genes asociados a las simbiosis de micorrizas arbusculares, los genes de formación del tubo polínico y

los genes de hemoglobina [30]–[32]. La falta de resolución en la filogenia y la ausencia de datos de nodulación para varios géneros hace imposible determinar si dentro de esta subfamilia ha habido más de un origen de nodulación [33]. Mas aún, no se han establecido cuales son los mecanismos inhibitorios ligados a la ausencia de nodulación entre clados cercanamente emparentados, sean estos la ausencia de genes específicos ligados con las bacterias u otras adaptaciones a nivel radical que inhiben la nodulación.

En los resultados de esta investigación se observó que la mayoría de las raíces con nódulos presentaron una coloración clara, y las especies sin nódulos una coloración más oscura. La formación de nódulos requiere una secuencia de eventos altamente regulados y coordinados, iniciados por la generación de señales de flavonoides secretados por las raíces de la planta huésped. Se ha demostrado que los isoflavonoides y flavonoides presentes en los exudados de las raíces de una variedad de leguminosas inducen la transcripción de un conjunto importante de los genes nod de *Rhizobium*, responsables del proceso de nodulación [34].

Ejemplos de flavonoides que se liberan naturalmente de las plantas leguminosas para inducir la expresión de estos genes nod son la luteolina, algunas flavanonas (como el eriodictiol, la naringenina y la hesperetina), algunas flavonas (como la apigenina), algunos chalcones y algunos isoflavonoides (como la daidzeína y la genisteína) [35], [36]. Las variaciones en los patrones de hidroxilación de estos flavonoides comunes en las raíces producen estructuras que dan colores claros, normalmente blancos o amarillentos, en estos tejidos subterráneos [5]. Por ende, la coloración de las raíces y la química secundaria de las plantas podría ser un factor determinante en la capacidad de nodulación de una especie. Adicionalmente, la variación considerable entre los perfiles de flavonoides secretados en diferentes especies de leguminosas podría ser el factor que le permite a las bacterias distinguir a sus huéspedes y podría explicar la variación en la morfología de los nódulos y rutas de infección al afectar la expresión de proteínas y la actividad catalítica de una amplia variedad de enzimas [37].

Una coloración más oscura podría ser un indicador de la producción de sustancias tipo fenoles que son utilizadas por las plantas como un mecanismo de protección contra patógenos. Esto implicaría una posible contraposición entre el invertir en defensa a costa de simbiosis, o en el caso de las que realizan simbiosis, utilizar otros mecanismos alternativos para defenderse [38]. Sin embargo, también hubo excepciones a lo anotado anteriormente. Por ejemplo, *Bauhinia unguolata* (Cercidoideae) no presentó nódulos a pesar de tener raíces claras [39] y esto podría deberse a su alta capacidad de formar simbiosis micorrízicas [40].

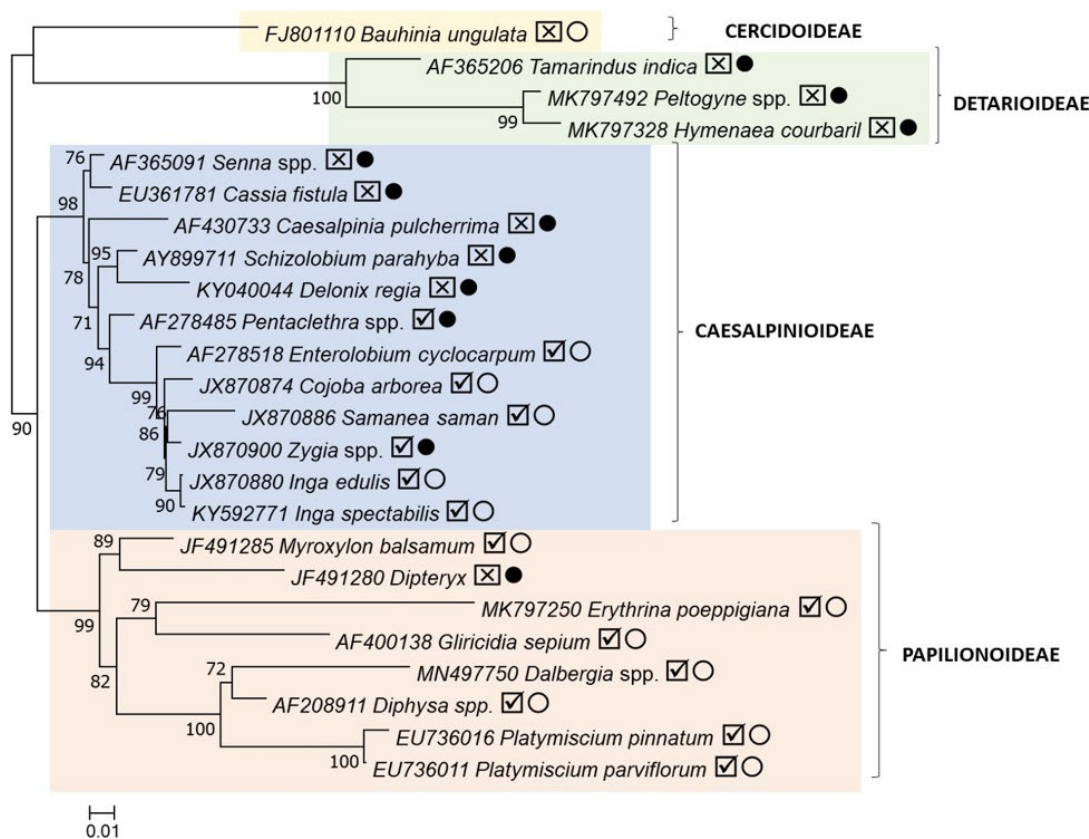


Figura 1. Relaciones filogenéticas de 24 especies de árboles pertenecientes a familia Fabaceae, agrupadas en cuatro subfamilias. El árbol filogenético de máxima verosimilitud se calculó a partir de las secuencias del marcador TrnL y el espaciador intergénico TrnL-TrnF, usando un modelo GTR+G+I implementado en el programa FastTree. Para cada especie se indica el número de acceso de las secuencias disponibles en el GenBank. Además, se indica si la especie presentó nódulos y si la coloración de las raíces fue clara u oscura.

Figure 1. Phylogenetic relationships of 24 tree species belonging to the Fabaceae family, grouped into four subfamilies. The maximum likelihood phylogenetic tree was calculated from the sequences of the TrnL marker and the TrnL-TrnF intergenic spacer, using a GTR+G+I model implemented in the FastTree program. For each species, the accession number of the sequences available in GenBank is indicated. In addition, it is indicated if the species presented nodules and if the coloration of the roots was light or dark.

Por otro lado, *Pentaclethra macroloba* y *Zygia longifolia* (Caesalpinioideae) si presentaron nódulos a pesar de tener raíces con tonalidades oscuras. Estas especies podrían tener algún mecanismo de señalización e infección particular o algunas formas distintas de leghemoglobina por la cual tengan una coloración oscura en sus raíces a pesar de ser capaces de formar nódulos [41], [42]. En este sentido, es necesario profundizar sobre el cómo los rasgos anatómicos, e incluso arquitecturales, de las raíces podrían tener relación con el establecimiento de relaciones simbióticas con bacterias fijadoras de nitrógeno.

La capacidad de algunas especies de fijar nitrógeno también podría llegar a ser un factor determinante para explicar la distribución de las especies y subfamilias y su preponderancia en distintos hábitats. La evidencia indica que las leguminosas se han movido desde tiempos muy cercanos a su origen a través de grandes

distancias de agua, posiblemente saltando entre islas o por eventos climáticos extremos [43], [44]. De esta forma, un posible evento único de pérdida de la nodulación en algunas especies podría resultar en especies no nodulantes estrechamente relacionadas que se encuentran en distintos continentes [23]. También es crucial considerar que esta expansión en el territorio de las leguminosas no se da de forma aleatoria [45], [46]. En años recientes se ha estudiado que el movimiento de las leguminosas fijadoras de nitrógeno se da hacia zonas más áridas por su capacidad de maximizar los recursos disponibles, como el agua [47], [48]. Sin embargo, es probable que zonas anteriormente glaciadas tengan mayores cantidades de nitrógeno en el suelo y que la aptitud evolutiva se haya centrado en leguminosas no fijadoras de nitrógeno que gastan menos energía [49]. Al respecto, es necesario realizar más investigación sobre este tema para explicar la composición de leguminosas noduladoras y no noduladoras en los trópicos y en zonas

templadas y revelar la razón de la dominancia de ciertas subfamilias en distintos hábitats.

Una coloración blanca en los nódulos caracteriza a las estructuras cuando estas son jóvenes y aún no fijan nitrógeno. A medida que los nódulos aumentan de tamaño se vuelven color rosa a causa de la leghemoglobina, que controla el flujo de oxígeno a las bacterias [50]. Durante el proceso de senescencia en los nódulos, que puede ocurrir por diferentes factores climáticos o fenológicos, los tejidos cambian de este color rosa a una coloración verde o negruzca debido a la degradación de la leghemoglobina y de los bacterioides [51]. Se ha determinado que la actividad de los nódulos está estrechamente relacionada con el tamaño de las estructuras, siendo más productivas y conteniendo una mayor concentración de leghemoglobina cuando poseen un tamaño mediano. Por ende, si bien la coloración de las raíces podría ser una indicación de la capacidad de nodular de una fabácea, el tamaño de sus nódulos podría proveer un modelo simple y rápido para evaluar la actividad y fijación de nitrógeno de sus nódulos radiculares [52].

Se ha propuesto que algunas otras características morfológicas de las raíces tienen un efecto sobre la nodulación y viceversa. Al aumentar la densidad las raíces laterales de una planta, por ejemplo, se genera una fuerte competencia entre estas que disminuye la absorción de nitrógeno por unidad de longitud de la raíz [53]. Por otro lado, el número y la distribución espacial de los nódulos afectan el crecimiento y la arquitectura del sistema radicular ya que tanto la disponibilidad como la distribución del nitrógeno influyen en el crecimiento lateral de las raíces [54]. Por esto, la ubicación de los nódulos a lo largo del sistema radicular no se da de forma aleatoria. A nivel de una sola raíz, la región pequeña encima de la punta de la raíz donde los pelos radiculares han empezado a diferenciarse es más susceptible a la infección y es donde posteriormente se forman la mayoría de los nódulos. En esta ubicación, las paredes de los pelos radiculares permiten la deformación y así los rizobios penetran dentro del hilo de infección hasta la corteza de la raíz [55].

Sin embargo, observando el panorama del sistema radicular completo, no todas las raíces tienen nódulos y, muy a menudo, estos se encuentran en lo alto del sistema radicular. En sistemas de producción agrícola, esto se ha asociado con la aplicación de los inoculantes en la superficie del sustrato y la poca capacidad de migrar en el suelo de los rizobios [55]. Otra posible explicación implica un mecanismo de regulación sistémico, donde los primeros nódulos que se forman envían una señal a la plántula y su interpretación lleva a la producción de una señal inhibitoria que desciende a la raíz, lo que evitaría que se desarrollen nuevos nódulos

en las raíces más jóvenes que ahora se encuentran más profundas en el sustrato [56]. Finalmente, otro nivel de control que afecta la distribución de los nódulos ocurre a nivel de genotipo, como se ha observado en la soja que diferentes variedades presentan diferentes perfiles de nodulación [54].

Hasta cierto punto parece que la morfología de la raíz y la filogenia de una especie son características indicativas de la capacidad de nodular de una leguminosa. Sin embargo, no todas las especies estudiadas responden al mismo patrón. Un caso notable dentro de las Papilionoideae evaluadas fue *Dipteryx panamensis*, la única dentro de este grupo que no presentó nódulos. Las raíces de esta especie se caracterizan por ser oscuras, gruesas, tener altos contenidos de nitrógeno, y elevadas tasas de crecimiento en las condiciones del bosque tropical húmedo [57], [58]. Habría que determinar si esta especie es capaz de establecer algún otro tipo de relaciones endosimbióticas por ejemplo con bacterias no rhizobiaceas (que no forman nódulos) o con micorrizas, que le permite tener ventajas adaptativas semejantes a la capacidad de formar nódulos y fijar nitrógeno. Los contenidos de nitrógeno deberían ser evaluados en demás especies de leguminosas que no formen nódulos, pues de manera similar podrían tener otros mecanismos para realizar la fijación del nitrógeno.

Conclusiones

En síntesis, este trabajo permitió demostrar que un alto porcentaje de las especies de árboles leguminosos tienen capacidad de formar nódulos y establecer relaciones simbióticas con bacterias fijadoras de nitrógeno, sin embargo, las variaciones observadas pueden estar relacionadas con la posición filogenética de la subfamilia de Fabaceae, rasgos morfológicos y anatómicos de las raíces, o con el establecimiento de relaciones simbióticas con otros grupos de bacterias y hongos. En futuros estudios sería importante evaluar con más detalle estas propuestas considerando un mayor número de especies, realizando caracterizaciones anatómicas y morfológicas de las raíces, caracterizando aislamientos de rizobios, e incluyendo el estudio de las poblaciones de endófitos de las raíces (bacterias y hongos) utilizando técnicas independientes de cultivo.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica (Proyecto B9-204) y del Micitt-Conicit (Proyecto FI-036B-19).

Referencias

- [1] M. M. M. Kuypers, H. K. Marchant, and B. Kartal, "The microbial nitrogen-cycling network," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 16, Feb., p. 263, 2018.
- [2] S. Rahimlou, M. Bahram, and L. Tedersoo, "Phylogenomics reveals the evolution of root nodulating alpha- and beta-Proteobacteria (rhizobia)," *Microbiol. Res.*, vol. 250, Sep., p. 126788, 2021.
- [3] F. J. de Bruijn, "Biological Nitrogen Fixation," in *Principles of Plant-Microbe Interactions*, Cham: Springer International Publishing, 2015, pp. 215–224.
- [4] W. D'haeze and M. Holsters, "Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development," *Glycobiology*, vol. 12, no. 6, pp. 79R-105R, 2002.
- [5] J. J. Doyle, "Phylogenetic Perspectives on the Origins of Nodulation," *Mol. Plant-Microbe Interact.*, vol. 24, no. 11, Nov., pp. 1289–1295, 2011.
- [6] R. Garrido-Oter, R. T. Nakano, N. Dombrowski, K.-W. Ma, A. C. McHardy, and P. Schulze-Lefert, "Modular Traits of the Rhizobiales Root Microbiota and Their Evolutionary Relationship with Symbiotic Rhizobia," *Cell Host Microbe*, vol. 24, no. 1, Jul., pp. 155-167.e5, 2018.
- [7] C. Franche, K. Lindström, and C. Elmerich, "Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants," *Plant Soil*, vol. 321, no. 1–2, pp. 35–59, 2009.
- [8] D. Soltis, "Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, rbcL, and atpB sequences," *Bot. J. Linn. Soc.*, vol. 133, no. 4, Aug., pp. 381–461, 2000.
- [9] M. Griesmann et al., "Phylogenomics reveals multiple losses of nitrogen-fixing root nodule symbiosis," *Science*, vol. 361, no. 6398, May., p. eaat1743, 2018.
- [10] J. Bergmann et al., "The fungal collaboration gradient dominates the root economics space in plants," *Sci. Adv.*, vol. 6, no. 27, Jul., p. eaba3756, 2020.
- [11] M. F. Wojciechowski, M. Lavin, and M. J. Sanderson, "A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid mat K gene resolves many well-supported subclades within the family," *Am. J. Bot.*, vol. 91, no. 11, Nov., pp. 1846–1862, 2004.
- [12] J. J. Doyle, "Chasing unicorns: Nodulation origins and the paradox of novelty," *Am. J. Bot.*, vol. 103, no. 11, Nov., pp. 1865–1868, 2016.
- [13] J. J. Doyle, "Phylogeny of the Legume Family: An Approach to Understanding the Origins of Nodulation," *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, vol. 25, no. 1, Nov., pp. 325–349, 1994.
- [14] K. Markmann and M. Parniske, "Evolution of root endosymbiosis with bacteria: how novel are nodules?," *Trends Plant Sci.*, vol. 14, no. 2, Feb., pp. 77–86, 2009.
- [15] T. A. Hall, "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT," *Nucleic acids symposium series*, vol. 41, no. 41, pp. 95–98, 1999.
- [16] M. N. Price, P. S. Dehal, and A. P. Arkin, "FastTree 2--approximately maximum-likelihood trees for large alignments," *PLoS One*, vol. 5, no. 3, p. e9490, 2010.
- [17] S. Kumar, G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, and K. Tamura, "MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms," *Mol. Biol. Evol.*, vol. 35, no. 6, Jun., pp. 1547–1549, 2018.
- [18] R. S. Cowan, O. N. Allen, and E. K. Allen, "The Leguminosae: A Source Book of Characteristics, Uses, and Nodulation," *Taxon*, vol. 31, no. 1, Feb., p. 133, 1982.
- [19] M. Lavin, P. S. Herendeen, and M. F. Wojciechowski, "Evolutionary Rates Analysis of Leguminosae Implicates a Rapid Diversification of Lineages during the Tertiary," *Syst. Biol.*, vol. 54, no. 4, Aug., pp. 575–594, 2005.
- [20] R. Schmid, G. Lewis, B. Schrire, B. Mackinder, and M. Lock, "Legumes of the World," *Taxon*, vol. 55, no. 1, Feb., p. 251, 2006.
- [21] A. Bruneau, M. Mercure, G. P. Lewis, and P. S. Herendeen, "Phylogenetic patterns and diversification in the caesalpinoid legumes This paper is one of a selection of papers published in the Special Issue on Systematics Research.," *Botany*, vol. 86, no. 7, Jul., pp. 697–718, 2008.
- [22] G. J. Bowen, D. J. Beerling, P. L. Koch, J. C. Zachos, and T. Quattlebaum, "A humid climate state during the Palaeocene/Eocene thermal maximum," *Nature*, vol. 432, no. 7016, Nov., pp. 495–499, 2004.
- [23] J. I. Sprent, "Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation," *New Phytol.*, vol. 174, no. 1, Apr., pp. 11–25, 2007.
- [24] M. A. Parker, "The Spread of Bradyrhizobium Lineages Across Host Legume Clades: from Abarema to Zygia," *Microb. Ecol.*, vol. 69, no. 3, Apr., pp. 630–640, 2015.
- [25] K. Szczyglowski and L. Amyot, "Symbiosis, Inventiveness by Recruitment?," *Plant Physiol.*, vol. 131, no. 3, Mar., pp. 935–940, 2003.
- [26] D. VanInsberghe, K. R. Maas, E. Cardenas, C. R. Strachan, S. J. Hallam, and W. W. Mohn, "Non-symbiotic Bradyrhizobium ecotypes dominate North American forest soils," *ISME J.*, vol. 9, no. 11, Nov., pp. 2435–2441, 2015.
- [27] A. Genre et al., "Short-chain chitin oligomers from arbuscular mycorrhizal fungi trigger nuclear Ca^{2+} spiking in *Medicago truncatula* roots and their production is enhanced by strigolactone," *New Phytol.*, vol. 198, no. 1, Apr., pp. 190–202, 2013.
- [28] J. J. Doyle and M. A. Luckow, "The Rest of the Iceberg. Legume Diversity and Evolution in a Phylogenetic Context," *Plant Physiol.*, vol. 131, no. 3, Mar., pp. 900–910, 2003.
- [29] J. A. Bryan, G. P. Berlyn, and J. C. Gordon, "Toward a new concept of the evolution of symbiotic nitrogen fixation in the Leguminosae," *Plant Soil*, vol. 186, no. 1, Sep., pp. 151–159, 1996.
- [30] J. I. Sprent and E. K. James, "Legume Evolution: Where Do Nodules and Mycorrhizas Fit In?," *Plant Physiol.*, vol. 144, no. 2, Jun., pp. 575–581, 2007.
- [31] J. A. Downie, "Legume nodulation," *Curr. Biol.*, vol. 24, no. 5, Mar., pp. R184–R190, 2014.
- [32] J. I. Sprent, "60Ma of legume nodulation. What's new?"

- What's changing?," *J. Exp. Bot.*, vol. 59, no. 5, Feb., pp. 1081–1084, 2008.
- [33] J. I. Sprent, J. K. Ardley, and E. K. James, "From North to South: A latitudinal look at legume nodulation processes," *South African J. Bot.*, vol. 89, Nov., pp. 31–41, 2013.
- [34] M. T. López Luengo, "Flavonoides," *Offarm*, vol. 21, no. 4, pp. 108–113, 2002.
- [35] S. Caretto, V. Linsalata, G. Colella, G. Mita, and V. Lattanzio, "Carbon Fluxes between Primary Metabolism and Phenolic Pathway in Plant Tissues under Stress," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, no. 11, Nov., pp. 26378–26394, 2015.
- [36] V. Lattanzio, P. A. Kroon, S. Quideau, and D. Treutter, "Plant Phenolics– Secondary Metabolites with Diverse Functions," in *Recent Advances in Polyphenol Research*, vol. 1, Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2009, pp. 1–35.
- [37] V. Cheyrier, G. Comte, K. M. Davies, V. Lattanzio, and S. Martens, "Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology," *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 72, no. May, pp. 1–20, 2013.
- [38] M. Xia, O. J. Valverde-Barrantes, V. Suseela, C. B. Blackwood, and N. Tharayil, "Coordination between compound-specific chemistry and morphology in plant roots aligns with ancestral mycorrhizal association in woody angiosperms," *New Phytol.*, vol. 232, no. 3, Jul., p. nph.17561, 2021.
- [39] J. I. Sprent, J. Ardley, and E. K. James, "Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts," *New Phytol.*, vol. 215, no. 1, Jul., pp. 40–56, 2017.
- [40] J. M. L. Nascimento, T. A. L. Moraes, E. M. Silva, N. F. Melo, and A. M. Y. Melo, "Crescimento de plantas de *Bauhinia cheilanta* micorrizadas em dois tipos de solo do bioma Caatinga," *Rev. Bras. Ciências Agrárias - Brazilian J. Agric. Sci.*, vol. 9, no. 4, Dec., pp. 570–576, 2014.
- [41] J. A. Downie, "Legume Haemoglobins: Symbiotic Nitrogen Fixation Needs Bloody Nodules," *Curr. Biol.*, vol. 15, no. 6, Mar., pp. R196–R198, 2005.
- [42] T. Ott et al., "Symbiotic Leghemoglobins Are Crucial for Nitrogen Fixation in Legume Root Nodules but Not for General Plant Growth and Development," *Curr. Biol.*, vol. 15, no. 6, Mar., pp. 531–535, 2005.
- [43] R. T. Pennington, J. E. Richardson, and M. Lavin, "Insights into the historical construction of species-rich biomes from dated plant phylogenies, neutral ecological theory and phylogenetic community structure," *New Phytol.*, vol. 172, no. 4, Dec., pp. 605–616, 2006.
- [44] R. Nathan, "Long-Distance Dispersal of Plants," *Science*, vol. 313, no. 5788, Aug., pp. 786–788, 2006.
- [45] C.-H. Goh, A. B. Nicotra, and U. Mathesius, "The presence of nodules on legume root systems can alter phenotypic plasticity in response to internal nitrogen independent of nitrogen fixation," *Plant. Cell Environ.*, vol. 39, no. 4, Apr., pp. 883–896, 2016.
- [46] A. F. A. Pellegrini, A. C. Staver, L. O. Hedin, T. Charles-Dominique, and A. Tourgee, "Aridity, not fire, favors nitrogen-fixing plants across tropical savanna and forest biomes," *Ecology*, vol. 97, no. 9, Sep., pp. 2177–2183, 2016.
- [47] M. A. Adams, T. L. Turnbull, J. I. Sprent, and N. Buchmann, "Legumes are different: Leaf nitrogen, photosynthesis, and water use efficiency," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 113, no. 15, Apr., pp. 4098–4103, 2016.
- [48] M. Crisp, L. Cook, and D. Steane, "Radiation of the Australian flora: what can comparisons of molecular phylogenies across multiple taxa tell us about the evolution of diversity in present-day communities?," *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci.*, vol. 359, no. 1450, Oct., pp. 1551–1571, 2004.
- [49] P. M. Vitousek and C. B. Field, "Ecosystem constraints to symbiotic nitrogen fixers: A simple model and its implications," *Biogeochemistry*, vol. 46, no. 1–3, Jul., pp. 179–202, 1999.
- [50] Y. Yang et al., "Characterization of Genetic Basis on Synergistic Interactions between Root Architecture and Biological Nitrogen Fixation in Soybean," *Front. Plant Sci.*, vol. 8, Aug., 2017.
- [51] P. Lehtovaara and U. Perttälä, "Bile-pigment formation from different leghaemoglobins. Methine-bridge specificity of coupled oxidation," *Biochem. J.*, vol. 176, no. 2, Nov., pp. 359–364, 1978.
- [52] R. Tajima, O. N. Lee, J. Abe, A. Lux, and S. Morita, "Nitrogen-Fixing Activity of Root Nodules in Relation to Their Size in Peanut (*Arachis hypogaea* L.)," *Plant Prod. Sci.*, vol. 10, no. 4, Jan., pp. 423–429, 2007.
- [53] J. A. Postma, A. Dathe, and J. P. Lynch, "The Optimal Lateral Root Branching Density for Maize Depends on Nitrogen and Phosphorus Availability," *Plant Physiol.*, vol. 166, no. 2, Oct., pp. 590–602, 2014.
- [54] B. J. Ferguson et al., "Molecular Analysis of Legume Nodule Development and Autoregulation," *J. Integr. Plant Biol.*, vol. 52, no. 1, Jan., pp. 61–76, 2010.
- [55] J. D. Cardoso et al., "Relationship between total nodulation and nodulation at the root crown of peanut, soybean and common bean plants," *Soil Biol. Biochem.*, vol. 41, no. 8, Aug., pp. 1760–1763, 2009.
- [56] L. Remmler, L. Clairmont, A. Rolland-Lagan, and F. C. Guinel, "Standardized mapping of nodulation patterns in legume roots," *New Phytol.*, vol. 202, no. 3, May., pp. 1083–1094, 2014.
- [57] D. B. Clark and D. A. Clark, "Population Ecology and Microhabitat Distribution of *Dipteryx panamensis*, a Neotropical Rain Forest Emergent Tree," *Biotropica*, vol. 19, no. 3, Sep., p. 236, 1987.
- [58] J. Gaitán-Alvarez, L. Tencio, R. Moya, and D. Arias-Aguilar, "Changes in yield and chemical composition of three-year-old short-rotation plantations of *Dipteryx panamensis* in Costa Rica," *Rev. Árvore*, vol. 44, pp. 1–10, 2020.