



Más allá del nódulo: potencial agro-biotecnológico del microbioma endofítico en nódulos simbióticos de leguminosas

Beyond the nodule: agro-biotechnological potential of the endophytic microbiota in symbiotic nodules of legumes

Renzo Alfredo Valdez-Nuñez^{1*} ; Winston Franz Ríos-Ruiz² ; Eulogio J. Bedmar³ 

¹Universidad Nacional de Barranca, Lima, Perú

²Universidad Nacional de San Martín, Tarapoto, Perú

³Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada, España

RESUMEN

La fijación biológica de nitrógeno mediante la simbiosis leguminosa-rizobio es uno de los procesos de mayor importancia en el planeta Tierra (o al menos en nuestro planeta). Desde su descubrimiento, la simbiosis fue pragmatizada de modo estricto a los rizobios; sin embargo, aislamientos procedentes de nódulos desinfectados superficialmente esterilizados y que fallaban al nodular la planta huésped, eran considerados “contaminantes”. Estos no rizobios se denominan Bacterias Endófitas No Nodulantes (BENN), que constituyen un grupo polifásico de bacterias del suelo capaces de compartir el nódulo con los rizobios. Existen reportes sobre la diversidad filogenética de las BENN, incluso la co-inoculación con rizobios efectivos mejoran los parámetros simbióticos, por la diversidad de características promotoras de crecimiento y de biocontrol que ejercen durante el proceso de infección y colonización del interior del nódulo simbiótico. El potencial biotecnológico de estos microorganismos es todavía un campo por explorar, el cual puede ir desde la biotecnología agropecuaria hasta la biomédica. Esta revisión se centra en actualizar los conceptos sobre las BENN, su papel en el nódulo simbiótico, la diversidad filogenética, así como las principales técnicas de estudio y su potencial en la industria biotecnológica peruana.

Palabras clave: bacterias endófitas de nódulos; bioprospección; co-inoculación; rizobios

ABSTRACT

Nitrogen fixation through the legume-rhizobium symbiosis is one of the most important processes on the planet Earth. Since its discovery, the symbiosis was strictly pragmatized to rhizobia, and isolates from nodules that failed to nodulate the host plant was considered “contaminants”. These non-rhizobia are called Non-Nodulating Endophytic Bacteria (NNEB) and constitute a polyphasic group of soil bacteria capable of sharing the nodule interior with rhizobia. Additionally, co-inoculation of NNEB and rhizobia has been shown to improve symbiotic parameters. This synergy is explained by the diversity of growth-promoting and biocontrol characteristics that they exert during the infection and colonization process inside the symbiotic nodule. The biotechnological potential of these microorganisms is still a field to be explored, ranging from agricultural to biomedical biotechnology. This review focuses on updating the concept of NNBE, their role within the nodule, and their phylogenetic diversity. Main techniques for the study of the NNEB and their potential in the Peruvian biotechnology industry are also looked for.

Keywords: nodule endophytic bacteria; bioprospection; co-inoculation; rhizobia

Cómo citar / Citation: Valdez-Nuñez, R. A., Ríos-Ruiz, W. F. & Bedmar, E. J. (2022). Más allá del nódulo: potencial agro-biotecnológico del microbioma endofítico en nódulos simbióticos de leguminosas. *QuantUNAB*, 1(1), e11. <https://doi.org/10.52807/qunab.v1i1.11>

1. INTRODUCCIÓN

Las leguminosas (*Leguminosae* o *Fabaceae*) constituyen una abundante familia de plantas, herbáceas, arbustivas y leñosas, que aparecieron sobre el planeta hace 60 millones de años (Sprenst et al., 2017). El empleo del gen plastidial *matK* como marcador filogenético ha permitido establecer recientemente que ésta familia se divide en 6 subfamilias: Caesalpinioideae, Cercidoideae, Detarioideae, Dialioideae, Duparquetioideae y Papilionoideae que, a su vez, incluyen cerca de 770 géneros y 19 500 especies (Azani et al., 2017). Las leguminosas son, después de las Poaceae, las plantas más abundantes y siguen a los cereales como la segunda familia en importancia en la nutrición humana y animal. Estas plantas no solo aportan proteínas de alto valor nutritivo e interés nutracéutico, sino que también se emplean como forraje y abono verde, por lo que representan un componente fundamental para la sostenibilidad de la agricultura (Foyer et al., 2019).

Las leguminosas establecen simbiosis fijadoras de nitrógeno (N_2) atmosférico con un grupo polifásico de bacterias del suelo denominadas rizobios, brindándole a la planta hospedera ventajas ecológicas importantes al momento de colonizar un suelo. Como consecuencia de la interacción planta-bacteria, se forma en las raíces, a veces en los tallos, un órgano específico de la simbiosis, el nódulo, donde ocurre la fijación (reducción) de N_2 a amonio (NH_4^+) (Lace & Ott, 2018). El nódulo constituye un “hotspot” de biodiversidad donde la presencia de compuestos carbonados procedentes de la fotosíntesis de la planta y nitrogenados, derivados de la formación de NH_4^+ , permite el crecimiento de las bacterias que se encuentran en su interior. Por otra parte, el nódulo constituye un nicho ecológico de protección frente a otras especies microbianas y se ha informado que es el lugar donde ocurre con mayor frecuencia la transferencia horizontal de genes entre bacterias (Kan et al., 2007).

Los rizobios son un grupo polifilético distribuido principalmente en la subclase Alfa-proteobacteria que incluye los géneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer*, *Bradyrhizobium*, *Phyllobacterium*, *Microvirga*, *Azorhizobium*, *Ochrobactrum*, *Methylobacterium*, *Devosia*, *Shinella*; *Aminobacter*, *Allorhizobium* y *Neorhizobium* pertenecientes a las familias Rhizobiaceae, Phyllobacteriaceae, Brucellaceae, Methylobacteriaceae, Bradyrhizobiaceae, Xanthobacteraceae e Hyphomicrobiaceae. Otros tres géneros fijadores de N_2 , *Paraburkholderia*, *Cupriavidus* y *Trinickia*, pertenecen a la familia Burkholderiaceae de la subclase Beta-proteobacteria (de Lajudie et al., 2019).

En los últimos años se han incrementado los estudios conducentes a investigar y descifrar las poblaciones endofíticas, distintas a los rizobios, radicando en el interior de nódulos sanos de leguminosas (Martínez-Hidalgo & Hirsch, 2017; Velázquez et al., 2017; Ríos-Ruiz et al., 2019). El objetivo de esta revisión es dar a conocer un nicho adicional de estudio para los biotecnólogos agrícolas ya que los nódulos permiten estudiar no solo la mirada a lo que constituye una nueva fuente de recursos microbianos de interés biotecnológico, las Bacterias Endofíticas No Nodulantes (BENN) (Etesami, 2022).

2. BACTERIAS ENDÓFITAS NO NODULANTES (BENN)

Técnicamente, las BENN son todas aquellas bacterias que, habiendo sido aisladas de nódulos cuidadosamente desinfectados en su superficie son incapaces de formar nódulos en las leguminosas de las que se aislaron. Durante mucho tiempo el estudio de los BENN pasó desapercibido ya que, al no ser rizobios, se consideraron como bacterias “contaminantes” sin participación alguna en la simbiosis leguminosa-rizobio (Somasegaran & Hoben, 1994). Posteriormente, se comprobó que muchos de ellos poseen características propias de las denominadas bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Plant Growth Promoter Rhizobacteria, PGPR), lo que renovó el interés por su estudio (Martínez-Hidalgo & Hirsch, 2017; Velázquez et al., 2017; Ríos-Ruiz et al., 2019).

3. TÉCNICAS DE ESTUDIO

En el estudio de las BENN, lo primero que se debe comprobar es la eficiencia de esterilización de la superficie de los nódulos para que las bacterias que aparezcan proceden del interior y no de la superficie del nódulo. Para ello, se pueden emplear tres técnicas:

- Incubación de los nódulos en placas Petri conteniendo el medio denominado Agar-Extracto de Levadura Manitol (AELM).
- Plaquear la última agua del enjuague de los nódulos esterilizados (Valdez-Nuñez et al., 2019).
- Rodar los nódulos esterilizados en placas Petri con medios de cultivo apropiados para el crecimiento bacteriano (De Meyer et al., 2015).

Aquellas bacterias aisladas de nódulos que no presenten contaminación superficial, podrían ser consideradas como posibles BENN. La inoculación de estas bacterias en la planta huésped y la ausencia de nodulación confirmaría, de manera parcial, la naturaleza endofítica de las BENN. Ensayos de co-inoculación empleando posibles BENN y rizobios verdaderos, y su posterior re-aislamiento a partir de nódulos formados bajo condiciones gnotobióticas, confirmarían su identidad como verdaderos BENN. Técnicas como la Microscopía Láser Confocal permiten el seguimiento de los procesos de infección e identificar el lugar específico de colonización en el interior del nódulo (Pandya et al., 2013).

4. DIVERSIDAD DE ENDÓFITOS EN NÓDULOS DE LEGUMINOSAS

Hasta el momento se han descrito BENN en una ínfima cantidad de nódulos de leguminosas, entre ellas las de grano (Zhao et al., 2018), forrajeras (Wigley et al., 2017), recuperadoras de suelos (Zineb et al., 2016), y de algunos endemismos en peligro de extinción (Safronova et al., 2015). Los géneros bacterianos conocidos como BENN y las leguminosas de interés económico de las que se aislaron se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1.

Diversidad de BENN aisladas de nódulos de leguminosas de importancia económica

Género Leguminosa	Género de BENN
<i>Acacia</i>	<i>Acinetobacter, Arthrobacter, Bacillus, Brevibacillus, Herbaspirillum, Ochrobactrum, Paenibacillus, Pseudomonas, Rhizobium</i>
<i>Mimosa</i>	<i>Pantoea</i>
<i>Prosopis</i>	<i>Paenibacillus</i>
<i>Arachis</i>	<i>Enterobacter, Klebsiella, Pseudomonas</i>
<i>Cicer</i>	<i>Ochrobactrum, Agrobacterium, Paenibacillus</i>
<i>Crotalaria</i>	<i>Agrobacterium, Bacillus, Burkholderia, Enterobacter, Pantoea, Rhizobium</i>
<i>Glycine</i>	<i>Bacillus, Burkholderia, Serratia, Enterobacter, Ochrobactrum, Proteus</i>
<i>Indigofera</i>	<i>Enterobacter, Paenibacillus, Rhizobium</i>
<i>Medicago</i>	<i>Endobacter, Micromonospora, Paenibacillus, Bacillus, Shinella</i>
<i>Phaseolus</i>	<i>Agrobacterium, Achromobacter, Enterobacter, Serratia, Pseudomonas, Pantoea, Herbaspirillum, Phyllobacterium, Rhizobium</i>
<i>Pisum</i>	<i>Micromonospora, Ochrobactrum, Enterobacter</i>
<i>Vicia</i>	<i>Agrobacterium, Shinella, Bacillus, Methylobacterium, Phyllobacterium, Rhizobium, Pseudomonas</i>
<i>Vigna</i>	<i>Bacillus, Brevibacillus, Paenibacillus, Enterobacter, Herbaspirillum, Chryseobacterium</i>

5. ¿CÓMO INGRESAN LAS BENN AL INTERIOR DEL NÓDULO?

Se han postulado diferentes mecanismos de infección. Según Pandya et al. (2013) las BENN invaden el canal de infección producido por los rizobios a los que acompañan hasta colonizar el interior del nódulo. Benito et al. (2017) sugirieron una interacción tripartita entre la leguminosa, la BENN *Micromonospora* y los rizobios específicos de las leguminosas empleadas en el estudio, ya que solo se encontró *Micromonospora* cuando se llevó a cabo su co-inoculación con el rizobio correspondiente a cada planta huésped.

También se ha reportado que una mezcla de la BENN *Agrobacterium* y el rizobio *Sinorhizobium meliloti* dio lugar a una nodulación inespecífica de las leguminosas *Trifolium* (trébol) y *Medicago* (alfalfa) (Liu et al., 2010). La investigación realizada no ha permitido definir con exactitud, la manera en que las BENN penetran en el interior de los nódulos.

6. ¿QUÉ BENEFICIOS APORTAN LAS BENN A LA SIMBIOSIS?

Hasta hace unos años la función de las BENN era desconocida. Uno de los primeros estudios realizados para definir su papel en el nódulo se debe a Sturz et al. (1997), quienes demostraron que *Bacillus megaterium*, *Bordetella avium* y *Curtobacterium luteum* promovían de manera consistente el crecimiento de *Trifolium pratense* cuando se inoculaban individualmente o en combinación con *R. leguminosarum* biovar trifolii.

La investigación realizada ha permitido demostrar que las BENN poseen y expresan actividades promotoras del crecimiento de las plantas tales como la fijación de N₂, actividad

ACC desaminasa, producción de sideróforos (Zhao et al., 2018), solubilización de fosfato inorgánico (Li et al., 2008), producción de fitohormonas y de amonio (Saini et al., 2015), etc., además de incrementar la formación de biopelículas en la superficie radicular. Así mismo, se ha descrito su capacidad para producir enzimas hidrolíticas extracelulares (Egamberdieva et al., 2017) y poseer actividad antifúngica y nematicida (Zhao et al., 2018).

El estudio pionero que relacionó la simbiosis tripartita entre las BENN, las leguminosas y los rizobios con la mejora del crecimiento de las plantas fue publicado por Li et al. (2008) quienes demostraron que la co-inoculación de *Bacillus* sp. CCBAU 15518, aislada de nódulos de soya (*Glycine max*), con *Bradyrhizobium japonicum* B15 incrementó la altura, el peso fresco y el número de nódulos un 11%, 18,3% y 15,2% respectivamente en comparación con las plantas inoculadas.

Como integrantes del microbioma del nódulo, cabe considerar que las BENN desempeñan un papel específico en su funcionamiento, ya que proporcionan a la leguminosa diversas ventajas. Así, las BENN podrían aumentar, de alguna manera, la actividad de la enzima nitrogenasa, responsable de la reducción de N_2 a NH_4^+ , la actividad solubilizadora de fosfato inorgánico lo que resultaría en un mejor abastecimiento de fósforo (P) disponible para la producción de ATP, o la adquisición de hierro (Fe) y otros elementos esenciales para el funcionamiento del nódulo (Magadlela et al., 2016).

7. POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LAS BENN

El potencial de las BENN no solo se limita al sector agropecuario, sino que se puede extender a otros como la biomedicina, dada la posibilidad de aprovechar los metabolitos producidos por las BENN. Estas bacterias podrían emplearse en:

Inoculantes para leguminosas: Probablemente este sea el campo, donde podrían tener un mejor desempeño. Diversos autores han descrito los beneficios de la co-inoculación de BENN y rizobios específicos de la leguminosa en cultivo (Brígido et al., 2019; Mehrasa et al., 2022). Las bacterias mencionadas podrían emplearse en la misma formulación del inoculante biológico para mejorar el rendimiento tanto de leguminosas de grano como de cobertura (abonos verdes), así como en promover una mayor adaptabilidad y tolerancia a estreses por factores ambientales. Existen reportes que informan que el uso de las BENN alivia el estrés ocasionado por factores abióticos como la salinidad, temperatura, pH, entre otros (Etesami & Adl, 2020; Mehrasa et al., 2022). La salinidad es uno de los problemas más importantes en la agricultura costera ya que limita el empleo de los suelos afectados y la producción de los cultivos, especialmente, el de las leguminosas de grano. El empleo de las BENN como inoculantes mixtos junto con los rizobios lograría una mejor tolerancia a suelos salinos para obtener mejores rendimientos. Aunque no existen antecedentes, es probable que también puedan ayudar a tolerar otros factores como el pH y la temperatura.

Recuperación de suelos degradados: Las leguminosas son plantas colonizadoras en la sucesión vegetal. Estas plantas tienen la ventaja de crecer en suelos áridos, de escasa fertilidad ya que son capaces de establecer simbiosis fijadoras de N_2 con los rizobios y de captar fósforo

(P), mediante la simbiosis con hongos micorrícicos arbusculares. El empleo de las BENN en co-inoculación con rizobios efectivos puede, por tanto, ayudar en la recuperación de suelos degradados al permitir un mejor desarrollo y adaptación de las leguminosas nativas o introducidas, y por consiguiente mejorar sus propiedades biológicas y físico-químicas de manera indirecta (Ríos-Ruiz et al., 2019).

Biorremediación: El empleo de las BENN también mejora la tolerancia de las leguminosas que se cultivan en suelos con elevadas concentraciones de metales pesados y xenobióticos. Esta capacidad de actuar en procesos de biorremediación se explica por la capacidad de producir sideróforos y actividad ACC desaminasa, permitiendo la tolerancia y/o capacidad para translocar al interior de las plantas metales pesados (Fan et al., 2018) y/o degradar pesticidas del suelo (Bhatt et al., 2022).

Producción de metabolitos secundarios y enzimas: Se ha demostrado que las BENN poseen una importante capacidad de producción de metabolitos secundarios como sideróforos, auxinas, giberelinas, entre otros (Etesami & Adl, 2020); así como una serie de enzimas como la ACC desaminasa, proteasas, lipasas, pectinasas, celulasas, xilanasas, amilasas, fosfatasas, quitinasas, etc., que de una u otra manera están involucradas en el establecimiento de la simbiosis (Etesami, 2022)

Nuevos compuestos antifúngicos: Las BENN han demostrado un gran potencial de biocontrol contra patógenos vegetales eucariotas (hongos), aunque no se ha observado contra procariontes aún. No obstante, el descubrimiento de nuevos metabolitos con propiedades antimicrobianas es un campo poco explorado en la biotecnología de las BENN, lo que debe estimular la investigación en este aspecto (Tokgöz et al., 2020; Etesami, 2022).

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Aunque se ha avanzado en el estudio y conocimiento de las BENN, quedan por resolver numerosos aspectos de su función en el interior de los nódulos de las leguminosas. La investigación del microbioma empleando técnicas de secuenciación de nueva generación en los nódulos representa un elemento clave para comprender la función que realizan las BENN en su interior y cómo y en qué extensión intervienen en el mantenimiento del homeostasis de la planta leguminosa y así contribuir a su mejor crecimiento y desarrollo. Es de esperar que aquellas cepas con potencial biotecnológico puedan incluirse en la formulación de bioinoculantes a base de rizobios para mejorar su eficiencia. Debe llevarse a cabo, por otra parte, la inoculación no solo de leguminosas, sino también de otros cultivos, con el objetivo de ampliar el potencial biotecnológico de las BENN.

FINANCIAMIENTO

Investigación financiada por la Universidad Nacional de Barranca mediante Resolución de Comisión Organizadora N° 483-2021-UNAB.

CONFLICTO DE INTERESES

No existe ningún tipo de conflicto de interés relacionado con la materia del trabajo.

CONTRIBUCIÓN DE AUTORÍA

Conceptualización: Valdez-Nuñez, R. A., Ríos-Ruiz, W. F. y Bedmar, E. J.

Curación de datos: Ríos-Ruiz, W. F. y Bedmar, E. J.

Análisis formal: Valdez-Nuñez, R. A. y Ríos-Ruiz, W. F.

Investigación: Valdez-Nuñez, R. A., Ríos-Ruiz, W. F. y Bedmar, E. J.

Metodología: Valdez-Nuñez, R. A. y Bedmar, E. J.

Supervisión: Valdez-Nuñez, R. A., Ríos-Ruiz, W. F. y Bedmar, E. J.

Redacción-borrador original: Valdez-Nuñez, R. A.

Redacción-revisión y edición: Ríos-Ruiz, W. F. y Bedmar, E. J.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Azani, N., Babineau, M., Bailey, C. D., Banks, H., Barbosa, A., Pinto, R. B., Boatwright, J., Borges, L., Brown, G., Bruneau, A., Candido, E., Cardoso, D., Chung, K.-F., Clark, R., Conceição, A. de S., Crisp, M., Cubas, P., Delgado-Salinas, A., Dexter, K., ... Zimmerman, E. (2017). A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny – The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). *Taxon*, *66*(1), 44–77. <https://doi.org/10.12705/661.3>
- Benito, P., Alonso-Vega, P., Aguado, C., Luján, R., Anzai, Y., Hirsch, A. M., & Trujillo, M. E. (2017). Monitoring the colonization and infection of legume nodules by *Micromonospora* in co-inoculation experiments with rhizobia. *Scientific Reports*, *7*(1), 11051. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11428-1>
- Bhatt, K., Suyal, D. C., Kumar, S., Singh, K., & Goswami, P. (2022). New insights into engineered plant-microbe interactions for pesticide removal. *Chemosphere*, *309*, 136635. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136635>
- Brígido, C., Menéndez, E., Paço, A., Glick, B. R., Belo, A., Félix, M. R., Oliveira, S., & Carvalho, M. (2019). Mediterranean Native Leguminous Plants: A Reservoir of Endophytic Bacteria with Potential to Enhance Chickpea Growth under Stress Conditions. *Microorganisms*, *7*(10), 392. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7100392>
- de Lajudie, P. M., Andrews, M., Ardley, J., Eardly, B., Jumas-Bilak, E., Kuzmanović, N., Lassalle, F., Lindström, K., Mhamdi, R., Martínez-Romero, E., Moulin, L., Mousavi, S. A., Nesme, X., Peix, A., Puławska, J., Steenkamp, E., Stępkowski, T., Tian, C.-F., Vinuesa, P., ... Young, P. (2019). Minimal standards for the description of new genera and species of rhizobia and agrobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *69*(7), 1852–1863. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003426>
- De Meyer, S. E., De Beuf, K., Vekeman, B., & Willems, A. (2015). A large diversity of non-

- rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). *Soil Biology and Biochemistry*, 83, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.01.002>
- Egamberdieva, D., Wirth, S. J., Shurigin, V. V., Hashem, A., & Abd_Allah, E. F. (2017). Endophytic Bacteria Improve Plant Growth, Symbiotic Performance of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) and Induce Suppression of Root Rot Caused by *Fusarium solani* under Salt Stress. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01887>
- Etesami, H. (2022). Root nodules of legumes: A suitable ecological niche for isolating non-rhizobial bacteria with biotechnological potential in agriculture. *Current Research in Biotechnology*, 4, 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2022.01.003>
- Etesami, H., & Adl, S. M. (2020). Can interaction between silicon and non-rhizobial bacteria help in improving nodulation and nitrogen fixation in salinity-stressed legumes? A review. *Rhizosphere*, 15, 100229. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100229>
- Fan, M., Liu, Z., Nan, L., Wang, E., Chen, W., Lin, Y., & Wei, G. (2018). Isolation, characterization, and selection of heavy metal-resistant and plant growth-promoting endophytic bacteria from root nodules of *Robinia pseudoacacia* in a Pb/Zn mining area. *Microbiological Research*, 217, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.09.002>
- Foyer, C. H., Nguyen, H., & Lam, H.-M. (2019). Legumes-The art and science of environmentally sustainable agriculture. *Plant, Cell & Environment*, 42(1), 1–5. <https://doi.org/10.1111/pce.13497>
- Kan, F. L., Chen, Z. Y., Wang, E. T., Tian, C. F., Sui, X. H., & Chen, W. X. (2007). Characterization of symbiotic and endophytic bacteria isolated from root nodules of herbaceous legumes grown in Qinghai-Tibet plateau and in other zones of China. *Archives of Microbiology*, 188(2), 103–115. <https://doi.org/10.1007/s00203-007-0211-3>
- Lace, B., & Ott, T. (2018). Commonalities and Differences in Controlling Multipartite Intracellular Infections of Legume Roots by Symbiotic Microbes. *Plant and Cell Physiology*, 59(4), 666–677. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy043>
- Li, J. H., Wang, E. T., Chen, W. F., & Chen, W. X. (2008). Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1), 238–246. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.08.014>
- Liu, J., Wang, E. T., Ren, D. W., & Chen, W. X. (2010). Mixture of endophytic *Agrobacterium* and *Sinorhizobium meliloti* strains could induce nonspecific nodulation on some woody legumes. *Archives of Microbiology*, 192(3), 229–234. <https://doi.org/10.1007/s00203-010-0543-2>
- Magadlela, A., Pérez-Fernández, M. A., Kleinert, A., Dreyer, L. L., & Valentine, A. J. (2016). Source of inorganic N affects the cost of growth in a legume tree species (*Virgilia divaricata*) from the Mediterranean-type Fynbos ecosystem. *Journal of Plant Ecology*, 9(6), 752–761. <https://doi.org/10.1093/jpe/rtw015>

- Martínez-Hidalgo, P., & Hirsch, A. M. (2017). The Nodule Microbiome: N₂-Fixing Rhizobia Do Not Live Alone. *Phytobiomes Journal*, 1(2), 70–82. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-12-16-0019-RVW>
- Mehrasa, H., Farnia, A., Kenarsari, M. J., & Nakhjavan, S. (2022). Correction to: Endophytic Bacteria and SA Application Improve Growth, Biochemical Properties, and Nutrient Uptake in White Beans Under Drought Stress. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 22(3), 3447–3447. <https://doi.org/10.1007/s42729-022-00898-6>
- Pandya, M., Naresh Kumar, G., & Rajkumar, S. (2013). Invasion of rhizobial infection thread by non-rhizobia for colonization of *Vigna radiata* root nodules. *FEMS Microbiology Letters*, 348(1), 58–65. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12245>
- Ríos-Ruiz, W. F., Valdez-Nuñez, R. A., Bedmar, E. J., & Castellano-Hinojosa, A. (2019). *Utilization of Endophytic Bacteria Isolated from Legume Root Nodules for Plant Growth Promotion* (pp. 145–176). https://doi.org/10.1007/978-3-030-30926-8_6
- Safronova, V. I., Kuznetsova, I. G., Sazanova, A. L., Kimeklis, A. K., Belimov, A. A., Andronov, E. E., Pinaev, A. G., Pukhaev, A. R., Popov, K. P., Akopian, J. A., Willems, A., & Tikhonovich, I. A. (2015). Extra-slow-growing Tardiphaga strains isolated from nodules of *Vavilovia formosa* (Stev.) Fed. *Archives of Microbiology*, 197(7), 889–898. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1122-3>
- Saini, R., Dudeja, S. S., Giri, R., & Kumar, V. (2015). Isolation, characterization, and evaluation of bacterial root and nodule endophytes from chickpea cultivated in Northern India. *Journal of Basic Microbiology*, 55(1), 74–81. <https://doi.org/10.1002/jobm.201300173>
- Somasegaran, P., & Hoben, H. J. (1994). *Handbook for Rhizobia*. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8375-8>
- Sprent, J. I., Ardley, J., & James, E. K. (2017). Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. *New Phytologist*, 215(1), 40–56. <https://doi.org/10.1111/nph.14474>
- Sturz, A. V., Christie, B. R., Matheson, B. G., & Nowak, J. (1997). Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. *Biology and Fertility of Soils*, 25(1), 13–19. <https://doi.org/10.1007/s003740050273>
- Tokgöz, S., Lakshman, D. K., Ghazlan, M. H., Pinar, H., Roberts, D. P., & Mitra, A. (2020). Soybean Nodule-Associated Non-Rhizobial Bacteria Inhibit Plant Pathogens and Induce Growth Promotion in Tomato. *Plants*, 9(11), 1494. <https://doi.org/10.3390/plants9111494>
- Valdez-Nuñez, R. A., Castro-Tuanama, R., Castellano-Hinojosa, A., Bedmar, E. J., & Ríos-Ruiz, W. F. (2019). *PGPR Characterization of Non-Nodulating Bacterial Endophytes from Root Nodules of Vigna unguiculata (L.) Walp.* (pp. 111–126). https://doi.org/10.1007/978-3-030-17597-9_7
- Velázquez, E., Carro, L., Flores-Félix, J. D., Martínez-Hidalgo, P., Menéndez, E., Ramírez-

- Bahena, M.-H., Mulas, R., González-Andrés, F., Martínez-Molina, E., & Peix, A. (2017). The Legume Nodule Microbiome: A Source of Plant Growth-Promoting Bacteria. In *Probiotics and Plant Health* (pp. 41–70). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-3473-2_3
- Wigley, K., Moot, D., Wakelin, S. A., Laugraud, A., Blond, C., Seth, K., & Ridgway, H. (2017). Diverse bacterial taxa inhabit root nodules of lucerne (*Medicago sativa* L.) in New Zealand pastoral soils. *Plant and Soil*, *420*(1–2), 253–262. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3395-6>
- Zhao, L., Xu, Y., & Lai, X. (2018). Antagonistic endophytic bacteria associated with nodules of soybean (*Glycine max* L.) and plant growth-promoting properties. *Brazilian Journal of Microbiology*, *49*(2), 269–278. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.06.007>
- Zineb, F. B., Chahinez, M., Abdelkader, B., Sonia, S., Odile, D., Robin, D., & Antoine, G. (2016). Nodular bacterial endophyte diversity associated with native *Acacia* spp. in desert region of Algeria. *African Journal of Microbiology Research*, *10*(18), 634–645. <https://doi.org/10.5897/AJMR2015.7678>