

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas –PEDECIBA–

Maestría en Ciencias Biológicas. Subárea Ecología y Evolución



Ecología de semillas y plántulas de árboles nativos de Uruguay, y su interacción con bacterias endófitas nativas en las primeras etapas de la regeneración.

Sofía Acosta Nabune

Orientadoras

Dra. Christine Lucas

Dra. Adriana Montañez

Dra. Camila Pizano

Universidad de la República -UDELAR-

Octubre 2024

Agradecimientos

A mis orientadoras Christine, Adriana y Camila por su tiempo, por direccionarme estos años y acompañarme a explorar y construir una profunda mirada microbiológica y holística de la flora. A Christine, por su generosidad y humanidad en todos los desafíos, que han enriquecido profundamente mi historia como persona y como investigadora.

Al equipo del laboratorio de Microbiología de Suelos por permitirme utilizar bacterias de su colección y desarrollar los experimentos en sus instalaciones. A Patricia Vaz, Carla Silva y Tania Trasante por su constantes respuestas de la vida de laboratorio, y a María Morel por la fortuna de su trébol. A mis amigas, Lu y Ange, por sus valiosos aportes en la realización de los experimentos, y a Serrana por su constante apoyo en el camino.

A Beatriz, Daniella y sus equipos, quienes crearon los espacios en los que laboré, y que, de alguna manera no lineal, son fragmentos de este proceso.

Además, a todas las personas e instituciones que han contribuido con el material vegetal y bacteriano de este proyecto. En primer lugar, a las Áreas Protegidas Montes del Queguay y a su equipo, en particular al Director Elías Brum y al Guardaparque Federico Berrade, por su valioso apoyo en la colecta de semillas. Del mismo modo, a los Guardaparques y a Gabriela Betancourt del Área Protegida Esteros de Farrapos e Islas del Río Uruguay por su colaboración en las salidas de campo. También a Francisco Bergos, Director Regional de Áreas Protegidas del Litoral Norte de Uruguay y a la Comisión Administradora del Río Uruguay, cuyo apoyo fue esencial para la recolección de semillas que proporcionaron las bacterias endófitas para los experimentos de inoculación.

Agradezco a Camilo Zalamea y Lindsay McCulloch por la valiosa experiencia durante mi pasantía en el Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales.

Al tribunal, Patricia Vaz, Carolina Toranza y Camilo Zalamea, por sus aportes, observaciones y correcciones, que han dado profundidad a este trabajo.

Al Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) por darme la oportunidad de desarrollar esta Maestría y financiarla, conjunto con la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII).

A la Universidad de la República por mi formación académica y que continúa brindándome oportunidades. Y a quienes, con su esfuerzo a lo largo del tiempo, hacen y han hecho posible que hoy pueda continuar mi formación en esta institución pública.

En este mosaico de colaboración, reconozco toda la vida que ha permitido esta investigación, cada semilla que se desarrolló en árbol y a las bacterias que comienzan a revelar sus misterios.

A Suyao Tian, por su generosidad y su arte, que embellece esta carátula y creo que refleja la esencia de la planta como holobionte.

Agradezco el amor, de mi madre Carmen, y de mi abuela Juanita; de mis hermanas y familia; de mis amigas y amigos de aquí y de allá; y de Pacita y sus hermanos, quienes hicieron de este viaje una hermosa etapa en mi vida.

Y a quienes llevo siempre conmigo.

Resumen

Las relaciones entre las bacterias endófitas y sus plantas huésped se han desarrollado a lo largo de una larga historia evolutiva, y tiene influencia en su aptitud a través de funciones esenciales para su desarrollo y evolución, impactando en la estabilidad y el funcionamiento de los ecosistemas. El interés en estudiar las comunidades microbianas asociadas a las plantas ha aumentado significativamente en las últimas décadas. Esta creciente atención ha revelado la importancia de considerar el microbioma como un componente activo del desarrollo de las plantas huéspedes, que también responde a los cambios en las condiciones ambientales (bióticas y abióticas). Esta tesis tiene el objetivo general de evaluar el efecto de la inoculación de bacterias endófitas nativas en las fases iniciales de la regeneración en tres especies de árboles nativos, con un enfoque específico en los procesos de germinación y el desarrollo temprano de las plántulas. En el capítulo I, se realiza una revisión del conocimiento actual sobre las bacterias endófitas y su interacción con las plantas durante las etapas iniciales del desarrollo vegetal. La primera parte del capítulo se centra en el concepto de la planta como un holobionte vegetal, enfatizando en el papel crucial de su microbioma bacteriano. Se explora cómo estas interacciones microbianas influyen en el desarrollo de la planta al inicio de su ciclo de vida. En la segunda parte, se aborda el conocimiento sobre el microbioma bacteriano endofítica de las semillas. Se profundiza en cómo estas bacterias endófitas afectan las etapas tempranas del desarrollo de la planta, desde la germinación, pasando por su dispersión, hasta el establecimiento de la plántula en su hábitat natural. Se destacan las funciones y mecanismos mediante los cuales estas interacciones pueden influir en el desarrollo y la adaptación de las plantas en sus ecosistemas. En el capítulo II, dada la importancia ecológica de las zonas ribereñas y los limitados estudios sobre el microbioma de semillas de estos ecosistemas, se evalúa el efecto de la inoculación de bacterias endófitas en tres especies nativas del Bajo Río Uruguay en América del Sur, *Blepharocalyx salicifolius* (Myrtaceae), *Erythrina crista-galli* (Fabaceae) y *Neltuma affinis* (Fabaceae). Evaluamos el efecto de inoculación con bacterias provenientes de semillas nativas de árboles del Río Uruguay: *Neobacillus drentensis* (origen Myrtaceae), *Kosakonia radicincitans* (origen Fabaceae), y *Citrobacter freundii* y *Priestia megaterium* (origen Lauraceae), sobre la germinación y el crecimiento de las plántulas. Específicamente, evaluamos la respuesta germinativa (proporción de germinación final, velocidad de germinación y tiempo medio de germinación), y la vigorosidad de las plántulas en su primera etapa del establecimiento (biomasa seca, altura del tallo, área foliar y la relación biomasa subterráneo:aérea), en comparación con el control sin inoculación. Los resultados resaltan que i) las bacterias endófitas nativas inoculadas tuvieron efectos tanto en las variables de germinación como en el crecimiento de las plántulas de árboles nativos del Río Uruguay; ii) los efectos de la inoculación fueron diversos y variaron según la combinación de bacteria y especie de árbol. Estos resultados sugieren un potencial efecto de las bacterias endófitas en las primeras fases de regeneración de las plantas y destacan la complejidad de las interacciones del microbioma de las semillas. Además, plantean numerosas preguntas y abren nuevas posibilidades para futuros estudios sobre la biología de microorganismos asociados con plantas nativas y la ecología de semillas y plántulas en los bosques de Uruguay.

Contenido

Agradecimientos.....	2
Resumen.....	3
Contenido.....	4
Capítulo I: Conocimiento actual sobre el microbioma bacteriano durante las primeras etapas de la regeneración del holobionte vegetal.	7
Introducción.....	7
Las plantas vasculares y el microbioma vegetal.....	8
Microbioma vegetal bacteriano.....	9
Factores que afectan la microbiota vegetal.....	11
Microbioma central.....	12
El microbioma bacteriano de semillas y plántulas en las etapas iniciales del desarrollo de la planta.	13
Formación y maduración de la semilla.....	13
Latencia de las semillas.....	16
El microbioma bacteriano en la transición de semilla a plántula.....	17
Funciones y mecanismos de endófitos bacterianos en la promoción de la germinación de semillas y del crecimiento de plántulas.....	18
Funciones de endófitos bacterianos.....	18
Mecanismos de endófitos bacterianos.....	19
i) Adquisición de nutrientes.....	19
ii) Producción de fitohormonas.....	20
iii) Resistencia a patógenos.....	20
Microbioma de semillas: fundamentos para su conservación.....	21
Bibliografía.....	24
Resumen.....	34
Capítulo II: Interacción de semillas y plántulas de árboles nativos de Uruguay con bacterias endófitas nativas, en las primeras etapas de la regeneración.	35
INTRODUCCIÓN.....	35
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	37
Objetivo general.....	37
Hipótesis.....	37
Objetivos específicos.....	37
MÉTODOS.....	38
Área de estudio.....	38
Selección de especies arbóreas.....	40
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	40
<i>Erythrina crista-galli</i>	41

<i>Neltuma affinis</i>	41
Origen de material microbiano.....	42
<i>Neobacillus drentensis</i>	43
<i>Kosakonia radicincitans</i>	43
<i>Citrobacter freundii</i>	43
<i>Priestia megaterium</i>	44
Experimentos de promoción del crecimiento vegetal.....	45
Material vegetal.....	45
Preparación del inóculo bacteriano.....	46
Diseño experimental.....	46
Variables analizadas.....	47
Variables de germinación.....	47
Variables de plántulas.....	47
Análisis de datos.....	48
Variables de germinación.....	48
Variables de plántulas.....	48
RESULTADOS.....	48
Calidad de las semillas.....	48
Variables de germinación.....	49
Variables de plántulas.....	51
Biomasa seca total.....	53
Área foliar.....	53
Relación subterráneo:aérea.....	53
Altura.....	53
DISCUSIÓN.....	54
Efectos de bacterias endófitas sobre la germinación y el crecimiento de las plántulas.....	54
Potenciales asociaciones taxonómicas planta-microorganismo.....	56
Aspectos metodológicos.....	56
i) Efecto de la inoculación.....	56
ii) Selección de especies.....	56
Implicaciones para la biodiversidad, conservación y regeneración de bosques.....	57
CONCLUSIONES.....	58
Conclusiones generales y perspectivas futuras.....	59
Bibliografía.....	61
Anexos.....	73

Capítulo I

De la semilla a la plántula: conocimiento actual sobre el microbioma bacteriano durante las primeras etapas de la regeneración del holobionte vegetal.

Capítulo I

Conocimiento actual sobre el microbioma bacteriano durante las primeras etapas de la regeneración del holobionte vegetal.

Introducción

Las relaciones entre las bacterias endófitas y sus plantas huésped, desarrolladas a lo largo de una extensa historia evolutiva, han influido en la aptitud de las plantas al aportar funciones clave para su desarrollo, su evolución y la estabilidad de los ecosistemas. La regeneración natural, constituye la base para la renovación y continuidad de las especies y, por lo tanto, contribuye al mantenimiento de la diversidad de los bosques. Este proceso ocurre en una serie de etapas, que van desde la formación y la dispersión de las semillas, pasando por la germinación, hasta el establecimiento de las plántulas en su entorno natural (Nathan & Muller-Landau, 2000; Wang & Smith, 2002). Cada una de estas fases representa un fuerte cuello de botella en la demografía de las especies, ya que los estadios más tempranos, como semillas y plántulas, son vulnerables a diversos factores ambientales, lo que resulta en altos riesgos de mortalidad.

El interés en estudiar las comunidades microbianas asociadas a las plantas ha aumentado significativamente en las últimas décadas. Esta creciente atención ha revelado la importancia de considerar el microbioma, definido como el conjunto de microorganismos, sus genes y las condiciones ambientales que los afectan en un entorno específico, como un factor activo en el desarrollo de las plantas huésped. En particular, las semillas albergan diversos microorganismos cuya influencia en la vida de la planta está siendo cada vez más comprendida. Entre ellos, ciertos taxones microbianos desempeñan un papel crucial en la promoción de la salud y el crecimiento de las plantas, así como en la supervivencia de las semillas. Esta tesis tiene como objetivo general evaluar el efecto de la inoculación de bacterias endófitas nativas en las fases iniciales de la regeneración en tres especies de árboles nativos, con un enfoque particular en los procesos de germinación y desarrollo temprano de las plántulas.

En el capítulo 1, se realiza una revisión del conocimiento actual sobre las bacterias endófitas y su interacción con las plantas durante las etapas iniciales del desarrollo vegetal. La primera parte del capítulo se centra en el concepto de la planta como un holobionte vegetal, enfatizando en el papel crucial de su microbioma bacteriano. Se explora cómo estas interacciones microbianas influyen en el desarrollo de la planta al inicio de su ciclo de vida. En la segunda parte, se aborda el conocimiento sobre las bacterias endófitas presentes en las semillas, profundizando en su influencia sobre las etapas tempranas del desarrollo de la planta, desde la germinación y dispersión hasta el establecimiento de la plántula en su hábitat natural.

Se destacan las funciones y mecanismos mediante los cuales estas interacciones pueden influir en el desarrollo y la adaptación de las plantas en sus ecosistemas. Además, se

profundiza en el estado actual del microbioma de las semillas y sus principales desafíos para su conservación.

Las plantas vasculares y el microbioma vegetal

Las interacciones entre plantas y microorganismos, como bacterias, arqueas, hongos y protistas se remontan a una larga historia evolutiva. La evidencia plantea que la capacidad para formar relaciones simbióticas con micorrizas y hongos, ha sido uno de los factores críticos para la colonización de los ambientes terrestres. Este evento fue determinante para su adaptación y supervivencia en diversos entornos, dando lugar a los ecosistemas terrestres (Delaux et al. 2015; Strullu-Derrien et al. 2018).

En el ámbito de la investigación biológica contemporánea, se ha ampliado el conocimiento teórico y experimental sobre la influencia de los microorganismos asociados al huésped, cuya importancia resulta fundamental para el funcionamiento y la supervivencia del organismo hospedador (Berg et al. 2020). Este énfasis subraya la necesidad de comprender de manera integral las funciones e interacciones que se establecen entre un organismo hospedador y sus comunidades de microorganismos asociados, destacando así la complejidad de las relaciones en este contexto biológico. En particular, esta tesis se centrará en las interacciones bacterianas, enfatizando su papel crucial en la evolución y ecología de las plantas.

En este contexto, surge el término "holobionte", que denota las asociaciones simbióticas a largo plazo entre un organismo hospedador multicelular y su comunidad de microorganismos asociados (Bordenstein & Theis, 2015; Gilbert et al. 2012). El prefijo "holo" derivado del griego "holos", connota integridad y totalidad en las relaciones. Adolf Meyer-Abich lo describió por primera vez en 1940, y su popularización se atribuye a la bióloga Lynn Margulis a principios de los años 1990 (Baedke et al. 2020). La hipótesis del holobionte, desarrollada posteriormente, proporciona una perspectiva integral de las funciones e interacciones entre un huésped y sus simbioses, considerando el holobionte con su hologenoma, que abarca los genes del hospedador y el microbioma, como una entidad biológica única. En esta entidad, todos los organismos poseen interacciones dinámicas que contribuyen a la estabilidad general del sistema (Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006; Vandenkoornhuyse et al. 2015; Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008). La evidencia indica que todas las especies vegetales establecen interacciones con microorganismos, ya que resulta muy complejo cultivar plantas en ausencia de bacterias y hongos (Hardoim et al. 2008).

Actualmente, las plantas son consideradas holobiontes vegetales, formadas por la planta huésped y su microbioma, conocido como microbioma vegetal. El microbioma vegetal, definido como los genomas colectivos de microorganismos en un hábitat específico, incluyen una amplia diversidad de bacterias, hongos y protistas que interactúan entre sí (Hardoim et al. 2015; Hassani et al. 2018). Este microbioma emerge como un rasgo novedoso que amplía la capacidad de las plantas, influyendo en todas las fases de su ciclo

de vida, desde la germinación hasta la reproducción, y afectando componentes clave de su fitness (Hardoim et al. 2015; Lemanceau et al. 2017; Vandenkoornhuyse et al. 2015).

Las interacciones entre las plantas y sus comunidades microbianas asociadas son bidireccionales. Por un lado, la planta huésped proporciona nichos específicos para la interacción con sus microorganismos asociados, esto incluye una matriz de nutrientes, metabolitos y estructuras físicas. Estos ambientes pueden ofrecer una fuente continua de nutrientes, protección contra elementos dañinos y la oportunidad de establecer interacciones. La planta huésped selecciona y regula su microbiota, influyendo en su adaptación y afectando el fitness de la planta. Los microorganismos pueden ser mutualistas (beneficiosos), comensalistas (neutrales) o patógenos (perjudiciales) (Hassani et al. 2018). La selección y las presiones evolutivas impactan las interacciones, favoreciendo generalmente una simbiosis beneficiosa. Sin embargo, varios factores pueden alterar esta dinámica y promover microorganismos patógenos. Por ende, la división en categorías antropocéntricas (beneficiosos, comensalistas y patógenos) varían lo largo del tiempo en respuesta a factores ecológicos y evolutivos (Berg et al. 2020).

El hologenoma, es decir el acervo genético proporcionado por el microbioma vegetal, tendrá una participación clave conjunto con la epigenética en la generación de variación fenotípica, ejerciendo una gran influencia en las trayectorias evolutivas (Friesen et al. 2011; Vandenkoornhuyse et al. 2015; Wagner et al. 2014). Los cambios fenotípicos integrados en el genoma permiten adaptaciones tanto en tiempos cortos, durante la vida de la planta, como en tiempos evolutivos más prolongados (Theis et al. 2016). Esta comprensión integral destaca la importancia del microbioma vegetal como un reservorio de genes con funciones esenciales para el fitness de la planta huésped, y el ensamblaje de la comunidad microbiana, lo cual le permitirá enfrentar desafíos ambientales a distintas escalas temporales (Lemanceau et al. 2017; Partida-Martínez & Heil, 2011). Numerosas investigaciones han demostrado que el microbioma vegetal desempeña funciones cruciales en el crecimiento y la salud de las plantas (Nelson, 2018; Compant et al. 2019). Dentro de la microbiota vegetal se incluyen hongos, arqueas, bacterias, y protistas, en este trabajo se hará foco en el componente bacteriano.

Microbioma vegetal bacteriano

En el ecosistema complejo del holobionte vegetal, las bacterias tienen un rol relevante en la dinámica y funcionalidad de las plantas. Las bacterias, uno de los grupos con mayor diversidad de especies (Prosser et al. 2007), exhiben una notable variabilidad genética, morfológica y estructuras accesorias especializadas (Reinhold-Hurek & Hurek, 2011). Las características les confieren resistencia a condiciones ambientales adversas, optimizando su motilidad, adhesión e intercambio genético, además de su capacidad para adaptarse a un amplio rango de temperaturas, niveles de humedad, pH y oxígeno (Ferenci, 2016). En el contexto del holobionte, las bacterias coexisten y colaboran con otros microorganismos y la planta huésped, formando una comunidad diversa y dinámica que interactúa de manera continua con el tejido vegetal.

El dominio Bacteria abarca una amplia diversidad de organismos, presentes de manera cosmopolita en numerosos hábitats. El microbioma bacteriano de las plantas está compuesto por una gran variedad de bacterias, siendo los filos predominantes *Proteobacteria*, *Actinobacteria* y *Bacteroidetes* (Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006; Hassani et al. 2018). Según su localización, las bacterias pueden ser epífitas, que viven sobre los tejidos de la planta, o endófitas, que habitan dentro de ellos. Las epífitas pueden convertirse en endófitas y viceversa (Partida-Martínez & Heil, 2011; Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006). Además, los endófitos bacterianos se clasifican en obligados, que dependen estrictamente de la planta huésped para su crecimiento y supervivencia, y facultativos, que tienen una etapa de su ciclo de vida fuera de las plantas hospedantes (Müller et al. 2016). Experimentalmente, los endófitos se identifican como aquellas bacterias aisladas de tejidos internos de plantas tras una desinfección superficial, sin inducir síntomas visibles de enfermedad en la planta (Quadt-Hallmann et al. 1997.; Sakiyama et al. 2001).

Las bacterias endófitas se establecen principalmente en los espacios intercelulares de los tejidos vegetales y, en menor medida, en el interior de células individuales y en los tejidos vasculares (Reinhold-Hurek & Hurek, 2011). A diferencia de los rizobios y los hongos micorrízicos, las bacterias endófitas no inducen la formación de estructuras internas o externas en las raíces de las plantas. Una vez dentro del tejido vegetal, las bacterias pueden desplazarse por la planta mediante transporte pasivo a través de los elementos conductores o por migración activa gracias a la presencia de flagelos, en el apoplasto (Reinhold-Hurek & Hurek, 2011). La diversidad en los mecanismos de distribución puede estar relacionada con interacciones entre diferentes bacterias o con las distintas necesidades ecológicas de cada microorganismo, que les permite ocupar nichos específicos dentro del tejido, especialmente en los espacios intercelulares (Reinhold-Hurek & Hurek, 2011; Ferenci, 2016).

Este posicionamiento permite a las bacterias endófitas interactuar estrechamente con el huésped y ejercer una influencia en el fenotipo de la planta (Compant et al. 2019). Además, al vivir dentro del tejido vegetal, las bacterias se benefician de una protección contra estresores abióticos, como variaciones en la disponibilidad de agua, pH, temperatura y nutrientes, así como contra estresores bióticos, como la competencia con otros microorganismos (Lodewyckx et al. 2002; Berendsen et al. 2012; Andreote et al. 2014).

La diversidad de bacterias endófitas es amplia, y se han aislado de una variedad de especies y tejidos de plantas, tanto de monocotiledóneas como dicotiledóneas (Hardoim et al. 2015), con un foco en especies de cultivos domésticos (Truyens et al. 2015). Sin embargo, la mayoría de los microorganismos transmitidos no son cultivables, lo que sugiere que se conoce sólo una fracción reducida de la diversidad microbiana total (Rodríguez et al. 2009; Wassermann et al. 2021). Muchas bacterias son difíciles de aislar debido a su baja abundancia en los tejidos vegetales, clasificándolas como especies raras y presentando desafíos para su estudio. Además, las comunidades bacterianas pueden variar según el medio de cultivo utilizado para el aislamiento, las condiciones de crecimiento del huésped y el tipo de tejido vegetal analizado (Lodewyckx et al. 2002). Estas limitaciones, especialmente en bacterias endófitas no cultivables mediante métodos tradicionales, añaden complejidad al estudio de la microbiota vegetal (Abdelfattah et al. 2023; Malfanova

et al. 2013). Sin embargo, los avances en técnicas moleculares y en la secuenciación metagenómica de próxima generación (mNGS) (Guo et al. 2021) han ampliado el conocimiento sobre la diversidad de microorganismos presentes tanto en el interior como en la superficie de las semillas, y su posible papel funcional en las plantas hospedantes (Nathan et al. 2020).

Factores que afectan la microbiota vegetal

Las plantas representan hábitats dinámicos que varían tanto espacial como temporalmente, y en los que diversos factores influyen en la estructura y composición de su microbioma. El huésped, los microorganismos y el ambiente, junto con sus interacciones, son los principales determinantes de las composiciones microbianas (Sun et al. 2023). Dentro de los factores ambientales, se destacan el microbioma del suelo y las condiciones climáticas, como la temperatura, la humedad y las precipitaciones (Bulgarelli et al. 2013; Bintarti et al. 2022; Latz et al. 2021). Las comunidades microbianas que habitan en los diferentes tejidos vegetales se adaptan continuamente a las condiciones específicas de cada holobionte, lo que permite que tanto los microorganismos como la planta ajusten sus funciones y respuestas frente a los cambios en el entorno (Vandenkoornhuyse et al. 2015). En particular, las bacterias asociadas a las plantas intercambian señales con su huésped y emplean distintos mecanismos de adaptación y colonización, esenciales para la dinámica de las comunidades microbianas (Hardoim et al. 2012; Malfanova et al. 2013).

Los factores del huésped, como su identidad taxonómica influye activamente en la composición y función de su microbiota. Existe evidencia de que especies bacterianas varían en las plantas a nivel de especie (Links et al. 2014), y también de genotipo (Johnston-Monje y Raizada 2011; Barret et al. 2015). También son importantes los factores intrínsecos que componen a la especie hospedadora, la etapa de crecimiento, sus respuestas inmunitarias, la domesticación, su metabolismo y la disponibilidad de nutrientes (Sánchez-Cañizares et al. 2017).

Dada la ubicuidad de los microorganismos en la planta huésped, la microbiota asociada se encuentra especializada en un continuo definido de hábitats o compartimentos que componen el holobionte. Este continuo se extiende por toda la planta, abarcando incluso las zonas circundantes. Los hábitats microbianos pueden clasificarse según su ubicación en tres grandes categorías: rizosféricos, epífitos y endofíticos (Andreote et al. 2014). Además, existen hábitats más específicos, como la rizosfera, que es la zona del suelo afectada por las raíces de la planta, y la espermosfera, que corresponde al área influenciada por las semillas en germinación (Nelson, 2018; Shade et al. 2017). Otros hábitats importantes, que se manifiestan en diferentes etapas de la vida de la planta, incluyen la antosfera asociada a las flores y la carposfera vinculada a los frutos. Cada uno de estos hábitats ofrece condiciones únicas para la interacción entre plantas y microorganismos, reflejando la diversidad de la microbiota vegetal (Nelson, 2018).

Cada uno de estos compartimentos crea un nicho específico con condiciones bióticas y abióticas características, propiciando la colonización de una comunidad microbiana

adaptada a las condiciones particulares de su entorno respectivo. Dentro de estos hábitats microbianos, las comunidades se adaptan a su entorno específico y se vuelven cada vez más específicas durante el crecimiento y desarrollo de la planta (Chaparro et al. 2014; Edwards et al. 2018; Nelson, 2018). Por lo tanto, se pueden esperar respuestas a corto plazo relacionadas con modificaciones de la comunidad microbiana (Vandenkoornhuysen et al. 2015).

Además, un componente fundamental de la variabilidad bacteriana del holobionte vegetal es el resultado de su dinámica temporal (Sánchez-Cañizares et al. 2017). Stegen et al. (2018) proponen un marco conceptual que sugiere que los factores y procesos eco-evolutivos que influyen en la dinámica temporal de los microbiomas actúan de manera simultánea y se retroalimentan continuamente. Este marco conceptual se basa en la influencia individual y combinada de tres factores generales: i) contingencias históricas: condiciones históricas, tanto abióticas como bióticas, que modelan el microbioma y afectan su respuesta a futuras perturbaciones. ii) dinámica interna: factores dentro del microbioma que generan cambios a lo largo del tiempo, incluyendo evolución, interacciones y retroalimentación ambiental (conocidos como sucesión autógena), y iii) factores extrínsecos, como inmigración o invasión de nuevos organismos (conocidos como sucesión alogénica). La conexión entre la sucesión autógena y alogénica subraya que la historia, la dinámica interna y el forzamiento externo están interrelacionados y no existen límites claros que los distinguan (Stegen et al. 2018). Los autores sugieren que dividir las tres categorías puede ser una heurística útil, pero también es importante considerar las interconexiones e interacciones entre estos dominios conceptuales.

Microbioma central

El concepto de microbioma central o núcleo (en inglés, core microbiome), se refiere a los grupos microbianos que están consistentemente asociados con una especie o genotipo particular, independientemente de las variaciones en las condiciones ambientales (Edwards et al. 2015; Lemanceau et al. 2017; Trivedi et al. 2020). Sin embargo, la definición precisa de este microbioma central puede variar debido a la diversidad de métodos utilizados para describir los grupos microbianos. Por lo tanto, la definición adecuada depende explícitamente del contexto ecológico específico que se esté investigando (Shade & Stopnisek, 2019; Risely, 2020).

En escalas evolutivas, los microorganismos del microbioma central han desarrollado estrategias de transmisión, conservando su capacidad de colonizar las plantas (Shade et al. 2017; Truyens et al. 2015). En particular, se propone que los endófitos del microbioma central de las semillas han desarrollado una estrategia de transmisión vertical altamente eficiente a lo largo de las generaciones, coevolucionando con sus huéspedes. En las plantas, este proceso está estrechamente relacionado con la formación de la semilla, que actúa como un vehículo para la transmisión de estos microorganismos (Truyens et al. 2015).

La investigación del microbioma vegetal ha estado mayormente enfocada en la rizosfera y la filosfera, dejando el microbioma de las semillas menos explorado (Chen et al. 2018). Sin

embargo, estudios recientes han revelado microbiomas centrales en semillas de diversos cultivos (Berg & Raaijmakers, 2018; Johnston-Monje et al. 2021; Zhang et al. 2022; Eyre et al. 2019; Simonin et al. 2022). Aun así, se han realizado intentos limitados para caracterizar la microbiota central de la semilla de una especie de planta específica o en varias especies de plantas a gran escala (Chen et al. 2018; Eyre et al. 2019).

Las comunidades bacterianas en las semillas comparten taxones centrales comunes, pero no se ha identificado una agrupación específica por especie. Además, se ha observado una notable variabilidad en la composición microbiana en semillas del mismo lote para una misma especie (Simonin et al. 2022).

Actualmente, existe evidencia de que la domesticación de las plantas y el manejo agrícola intensivo modifican el microbioma natural de las plantas, lo que provoca la pérdida de microorganismos beneficiosos (Pérez-Jaramillo et al. 2016; 2017). Además, el cambio climático, al aumentar las temperaturas globales y la frecuencia de las sequías, exacerba las tensiones antropogénicas, afectando la interacción planta-microbioma y, por ende, la resiliencia de los sistemas vegetales ante estos estresores (Trivedi et al. 2022). Resultados preliminares sugieren que estos efectos también se observan en el microbioma de las semillas (Adam et al. 2018; Rybakova et al. 2017).

El microbioma bacteriano de semillas y plántulas en las etapas iniciales del desarrollo de la planta.

Las comunidades bacterianas representan una parte importante de la microbiota vegetal y conectan diferentes microhábitats vegetales, con funciones específicas durante las diferentes etapas de desarrollo de las plantas (Hassani et al. 2018). La dinámica de las bacterias en el ciclo de vida de la planta puede dividirse en tres etapas, cada una con distintos mecanismos de transmisión y efectos de cuello de botella regidos por diversos factores: primero, la formación de la semilla en la planta madre; luego, la fase de latencia; y finalmente, la transición de semilla a plántula (Abdelfattah et al. 2023). A continuación, se describe el desarrollo del microbioma de la semilla en el ciclo de vida de la planta, enfatizando los aspectos importantes de la ecología de las semillas y la herencia bacteriana endofítica.

Formación y maduración de la semilla

Las semillas, son estructuras de espermatofitos de origen sexual que contienen material genético, nutrientes y un microbioma asociado (Mitter et al. 2017; Verma et al. 2019), son los órganos de dispersión y propagación en las angiospermas (Azcón-Bieto & Talón, 2013). Representan una etapa clave en el ciclo de vida de las plantas, desempeñando un papel fundamental en la supervivencia de las poblaciones y en su capacidad de adaptación frente a cambios ambientales (Fenner & Thompson, 2005). Además, su importancia es crítica en la restauración de la vegetación en paisajes degradados (Merritt & Dixon, 2011).

A lo largo de su evolución, las semillas han desarrollado diversas adaptaciones para asegurar su descendencia, entre ellas la asociación con microorganismos. Las asociaciones mutualistas de plantas con microorganismos son importantes para mejorar su aptitud a través de su influencia en varios procesos fisiológicos y bioquímicos (Compant et al. 2019). Sin embargo, a pesar de su importancia, pocos estudios han explorado el papel y las posibles aplicaciones del microbioma de las semillas, especialmente en el contexto de su influencia en la regeneración y restauración de ecosistemas (War et al. 2023).

El particular, el microbioma de las semillas es ecológicamente relevante, que actúa tanto como un resultado final del ensamblaje comunitario dentro de la semilla, como un punto de inicio para la formación del microbioma en las plántulas (Shade et al. 2017). A pesar de la importancia de las interacciones iniciales, el conocimiento sobre el ensamblaje, la dinámica y la función del microbioma de las semillas varía en profundidad según la etapa del desarrollo (Compant et al. 2010; Truyens et al. 2015; Nelson, 2018).

El microbioma de la semilla está compuesto por un número limitado de taxones dominantes que se introducen durante la etapa inicial de llenado en la planta madre, y algunos de estos taxones persisten hasta la maduración completa de la semilla (Ganley & Newcombe, 2006; Chesneau et al. 2020; Tarquinio et al. 2021).

La diversidad microbiana presente en las semillas se origina en las condiciones internas dinámicas que experimentan durante su desarrollo y maduración, las cuales influyen directamente en la composición de la comunidad endofítica (Mano et al. 2006). Los taxones transmitidos por las semillas deben adaptarse a los rápidos cambios fisiológicos del huésped. Solo aquellos microorganismos con características específicas, como la resistencia a la desecación, la formación de endosporas (Mano et al. 2006; Compant et al. 2011) y la motilidad celular (Shazard, 2020), pueden colonizar y prosperar en las condiciones de la semilla. Además, el proceso de colonización bacteriana en el tejido de la semilla puede dar lugar al fenómeno ecológico conocido como el efecto de prioridad, que describe cómo la secuencia de colonización influye en la composición final de la comunidad, modificando recursos, interacciones bióticas y condiciones ambientales (Dickie et al. 2012; Fukami, 2015).

La transmisión vertical es el proceso mediante el cual los microorganismos se transmiten de una generación de plantas a la siguiente, a través de las semillas. Este mecanismo implica la transferencia de microorganismos presentes en la planta madre a su descendencia, facilitando la perpetuación de las relaciones simbióticas entre plantas y sus microorganismos asociados. La transmisión vertical es la principal vía para transferir endófitos entre generaciones de plantas (Truyens et al. 2015; Hardoim et al. 2015; Shade et al. 2017), e involucra el xilema de la planta materna y las cavidades intracelulares que conectan la planta madre con la semilla (Compant et al. 2005; Mitter et al. 2017; Shahzad et al. 2018).

Desde un punto de vista evolutivo, la transferencia vertical permite que los microorganismos beneficiosos se mantengan en las especies vegetales, favoreciendo su adaptación y éxito (Frank et al. 2017). La persistencia de los endófitos a través de las semillas podría ser esencial, dado que estos microorganismos aportan beneficios a las plantas huésped (Khalaf & Raizada, 2018; Mitter et al. 2017). Además, la transmisión vertical podría

ser evolutivamente ventajosa al reducir la dependencia de la planta hacia la adquisición de simbiontes de manera horizontal, lo que asegura la calidad del hábitat para la descendencia (Wilkinson & Sherratt, 2001; Nathan & Muller-Landau, 2000). En el caso de las bacterias, este tipo de transmisión puede ser crucial para preservar comunidades microbianas específicas y adaptadas a lo largo de generaciones, favoreciendo la estabilidad y continuidad de estas relaciones simbióticas (Truyens et al. 2015).

Otra vía importante de transmisión microbiana se establece durante la floración, cuando se desarrolla el sistema reproductivo de la planta. Los órganos florales, donde se formarán y desarrollarán las semillas, albergan un microbioma diverso conocido como antosfera (Nelson, 2018). Esta zona, que incluye el área alrededor de las flores, y es un entorno único para las comunidades microbianas debido a sus variados nichos en términos de morfología, composición química y longevidad (Alekkett et al. 2014; Ruraż et al. 2023). El microbioma de la antosfera tiene su origen en diversas fuentes, entre ellas las ambientales como el viento (Ambika-Manirajan et al. 2016) y las precipitaciones (Gundel et al. 2017; Shade et al. 2017). Además, el néctar floral (Álvarez-Peréz et al. 2012; Bartlewicz et al. 2016) puede servir como un reservorio para microorganismos que contribuyen a la diversidad microbiana en el entorno floral (Nelson, 2018).

Otras fuentes del microbioma floral incluyen los polinizadores, que pueden introducir bacterias, a través en la superficie del estigma o a través del polen durante la penetración de los tubos polínicos (Malfanova et al. 2013; Barriol et al. 2015). Existe evidencia de que este proceso varía entre especies, dependiendo del tipo de polinización (Ambika-Manirajan et al. 2016). Además, evidencia reciente sugiere que la polinización por insectos juega un papel clave en la transmisión de bacterias desde las flores hasta las semillas (Madmony et al, 2005; Ushio et al, 2015; Prado et al, 2020).

Los microorganismos también pueden colonizar los órganos reproductivos de las plantas a partir de diferentes hábitats microbianos como la caulosfera, la filosfera y la carposfera (Compant et al. 2010, 2011). Durante la fructificación, la carposfera ofrece un ambiente favorable para los microorganismos, lo que influye en la resistencia del fruto a patógenos, así como en su maduración y calidad postcosecha (Shade et al. 2013; Wassermann et al. 2019).

Además, durante la maduración de las semillas ocurren otros cambios en la dinámica bacteriana debido al ambiente interno, como el incremento de la deshidratación y la presión osmótica. Existe evidencia de que, en las etapas finales de este proceso, se encuentran más endófitos con tolerancia a condiciones de alta presión osmótica, lo cual sugiere una adaptación microbiana específica a los cambios internos de la semilla durante su maduración (Mano et al, 2006). Sin embargo, las rutas de transmisión de estos microorganismos aún no se comprenden completamente, dejando espacio para futuras investigaciones sobre este aspecto clave (Abdelfattah et al, 2023).

En los bosques, las etapas de semillas y plántulas enfrentan tasas de mortalidad elevadas debido a factores como depredadores, herbívoros, patógenos y condiciones ambientales adversas (Moles & Westoby, 2004; Bagchi et al, 2014). Los patógenos son cruciales para la supervivencia de las semillas y el éxito de las plántulas (Bever et al, 2015). Este alto riesgo

de mortalidad genera presión para que las semillas se dispersen lejos del árbol materno, como sugiere la hipótesis de Janzen-Connell (1970), lo que favorece su establecimiento al reducir la concentración de patógenos locales.

Latencia de las semillas

Cuando la semilla madura se desprende de la planta madre, inicia su dispersión a través de unidades de dispersión, como frutos o estructuras especializadas que protegen el embrión (Carrión & Cabezudo, 2003). Este período de inactividad (latencia), que transcurre entre la maduración de las semillas y su germinación, las expone a una variedad de microorganismos. La dispersión se divide en dos fases: la dispersión primaria, que es el movimiento de una semilla desde la planta madre hasta su primer sitio de reposo, y la dispersión secundaria, que incluye los movimientos posteriores, tanto horizontales como verticales en el suelo (Chambers & MacMahon, 1994). La dispersión define el área potencial de establecimiento para las plantas e influye en procesos subsiguientes como la depredación, la germinación, la competencia y el crecimiento (Schupp, 1993; Nathan & Muller-Landau, 2000). Esta adaptación permite evadir enemigos naturales, factores de mortalidad y competiciones intraespecíficas por recursos, lo que aumenta la probabilidad de encontrar un sitio adecuado para el establecimiento (Fenner & Thompson, 2005). Por lo tanto, la dispersión es importante para la regeneración, el mantenimiento y la dinámica de las poblaciones de plantas (Traveset et al. 2014).

Las interacciones entre semillas, sus agentes dispersores y los microorganismos ejercen una función clave en la dinámica de las poblaciones vegetales y las comunidades ecosistémicas (Nelson, 2018). Los mecanismos de dispersión de semillas se dividen en varias categorías según el método de transporte: autocoria, donde la planta disemina sus propias semillas; anemocoria, que involucra la dispersión por el viento; barocoria, basada en la gravedad; hidrocoria, que utiliza el agua para el transporte; y zoocoria, que depende de los animales (Poschlod et al. 2013; Traveset et al. 2014). Las semillas de la mayoría de las plantas son dispersadas por múltiples agentes (Bakker et al. 1996), un proceso que interfiere en el ensamblaje del microbioma en ecosistemas naturales. Cada modalidad de dispersión expone las semillas a distintos consorcios microbianos (Nelson, 2018; Klaedtke et al. 2016; Traveset et al. 2014; Viana et al. 2016). La dispersión hidrocoria, en ambientes acuáticos, introduce una gran diversidad bacteriana (Pernthaler, 2013), mientras que la dispersión por viento tiene un impacto menor en el microbioma por su carácter efímero (Nelson, 2018). En contraste, la dispersión zoocórica contribuye en mayor medida, especialmente con endófitos, debido al tránsito intestinal de los animales y su manipulación (Traveset et al. 2014; Viana et al. 2016; Godon et al. 2016). Además, la ruptura de estructuras protectoras durante el tránsito intestinal o la manipulación por insectos facilita la colonización de hongos, nematodos y bacterias en el suelo (Davis et al. 2008).

La mayor parte de la mortalidad de las semillas ocurre inmediatamente después de la dispersión y parece ser independiente del tamaño de las semillas (Moles et al. 2003). Existen diversas adaptaciones que ayudan a maximizar las oportunidades de éxito reproductivo a

pesar de los desafíos ambientales. Una de ellas es la germinación rápida, que permite que las semillas se desarrollen antes de que sean consumidas (Hadj-Chikh et al. 1996). Además, asegurar una alta velocidad de germinación, que implica una transición rápida de la emergencia de la radícula a la fase de plántula, puede mejorar la supervivencia en condiciones adversas (Beckstead et al. 2007). Otra estrategia importante es desarrollar tolerancia al daño, permitiendo que las semillas y plántulas sobrevivan a eventos de depredación o daño físico (Dalling & Harms, 1999).

Tras su dispersión, las semillas alcanzan un micrositio de deposición donde se asocian con una microbiota específica (Nelson, 2018), lo que puede influir en su destino, tal como se muestra en la Figura 1. Algunas semillas persisten en el suelo durante períodos prolongados, formando parte del banco permanente de semillas, mientras que otras permanecen solo por períodos breves, formando bancos de semillas transitorios (Mall & Singh, 2013; Saatkamp et al. 2014). La permanencia en el banco de semillas permite a las semillas interactuar con una amplia gama de microorganismos del suelo y de su ambiente circundante (Chee-Sanford & Fu, 2010).

La persistencia de las semillas viables en el suelo depende de diversos factores, entre los cuales se incluyen las características morfofisiológicas de la semilla, los niveles y tipos de dormición, así como la depredación, las infecciones por patógenos y la descomposición microbiana (Wagner & Mitschunas, 2008). Además, las condiciones climáticas y edáficas también juegan un papel crucial (Wagner & Mitschunas, 2008; Mall & Singh, 2013; Saatkamp et al. 2014; Long et al. 2015).

De acuerdo con su tamaño, las semillas de mayor tamaño suelen depender de mecanismos de defensa química, mientras que las semillas más pequeñas emplean estrategias de defensa física, como cubiertas gruesas y resistentes (Dalling et al. 2020). Además, según el tipo de dormición, se distinguen las semillas con dormición física, que utilizan defensas estructurales para evitar a los depredadores y germinan rápidamente para evadir patógenos (Chen et al. 2018). Por ejemplo, la permeabilidad de las semillas, característica de la dormición física, puede influir en la accesibilidad para los patógenos (Dalling et al. 2011; Zalamea et al. 2015). En contraste, las semillas con dormición fisiológica invierten en defensas químicas y físicas variables; y las semillas sin dormición, con defensas limitadas, pueden depender de microorganismos beneficiosos para protección, especialmente en bancos de semillas en suelos transitorios (Hamzazai, 2020; Kissell, 2019).

El microbioma bacteriano en la transición de semilla a plántula

La transición de la semilla a la plántula durante la germinación es una etapa fundamental del ciclo de vida, en la que las interacciones previas con los microorganismos pueden tener su impacto definitivo (Nelson, 2018). Durante la imbibición y germinación, tanto la microbiota endófito y epífita de las semillas como la microbiota del suelo forman un hábitat denominado espermosfera (Nelson, 2018). En esta fase, los microorganismos presentes en la espermosfera se activan e interactúan debido a la liberación de compuestos bioactivos por parte de la semilla, que incluyen proteínas, lípidos, carbohidratos, ácidos grasos,

aminoácidos, compuestos fenólicos y volátiles (Nelson, 2004; Schiltz et al. 2015). Estos compuestos no solo contribuyen al desarrollo de la semilla, sino que también actúan como nutrientes y señales para los microorganismos cercanos, generando un nicho ecológico que afecta la dinámica de los microorganismos asociados en su entorno inmediato (Nelson, 2018).

A medida que la radícula emerge, la influencia de los compuestos secretados por las raíces se extiende a la rizosfera, que se define como la zona del suelo directamente afectada por las raíces (Andreote et al. 2014). Los exudados radiculares modifican la composición y estructura de las comunidades microbianas en la rizosfera, alterando la estructura de la microbiota circundante (Berendsen et al. 2012; Somers et al. 2004). Este proceso es similar al que ocurre en la espermósfera, pero a una escala mayor, ya que los nutrientes y compuestos liberados por las raíces afectan un volumen de suelo mucho más amplio. Además, se ha observado que las bacterias que colonizan las semillas pueden encontrarse en la rizosfera y suelos circundantes, sugiriendo que los endófitos transmitidos de esta manera también pueden colonizar los entornos adyacentes del hospedero a medida que se da el crecimiento y expansión de la plántula (Hardoim et al. 2012; Muller et al. 2016).

En este momento, el proceso de rizodeposición, en el cual las raíces liberan compuestos en el suelo a medida que la planta crece, modifica las concentraciones locales de oxígeno y libera nutrientes adicionales en el suelo. Además, los metabolitos secundarios juegan un papel crucial en la colonización endofítica, afectando la estructura y función de la comunidad microbiana dentro de las plantas (Zhang et al. 2006; Papik, 2020).

Por otro lado, la superficie de la plántula, conocida como la filósfera, se coloniza por una comunidad microbiana diversa. Los estomas, aunque menos estudiados, pueden servir como rutas de entrada para los endófitos provenientes del ambiente. La penetración en la planta puede ocurrir a través de estomas, heridas o áreas de emergencia de raíces laterales, y las endófitas pueden producir enzimas hidrolíticas capaces de degradar la pared celular de los vegetales (McCully, 2002).

Funciones y mecanismos de endófitos bacterianos en la promoción de la germinación de semillas y del crecimiento de plántulas

Funciones de endófitos bacterianos

Las semillas de alta calidad, generalmente libres de enfermedades, presentan un mayor porcentaje de germinación y mayor vigor (Nelson, 2004; Dalling et al. 2020). En general, la presencia de funciones ecológicas aditivas respaldadas por el microbioma de las plantas son un rasgo clave que amplía la capacidad de la planta para adaptarse a diversas condiciones y cambios ambientales (Bulgarelli et al. 2013). Los endófitos presentes en las semillas se transmiten verticalmente de las plantas madre a su descendencia (Hardoim et al. 2008; Nelson, 2018), lo que sugiere que estos endófitos desempeñan un papel importante en las funciones fisiológicas de la planta, esenciales para el establecimiento de

plántulas, así como para su crecimiento y desarrollo (Truyens et al. 2015; Santoyo et al. 2016; Verma et al. 2019; Shahzad et al. 2018). A pesar de las diversas funciones, el microbioma de las semillas ha recibido poca atención en la ecología vegetal y pocos estudios han analizado el papel y las posibles aplicaciones del microbioma de la semilla (War et al. 2023). Aunque existe cierta información sobre la diversidad del microbioma de las semillas, su importancia funcional aún no se comprende completamente (Links et al. 2014; Barret et al. 2015; Klaedtke et al. 2016; Chesneau et al. 2021).

Se ha evidenciado que la inoculación con bacterias endófitas puede promover la germinación y mejorar la tasa de emergencia de plántulas en diversas especies cultivadas (White et al. 2018; Pitzschke, 2016, 2018; Martins et al. 2018). Por ejemplo, *Chenopodium quinoa* (Quinoa) presentó una germinación acelerada, un desarrollo superior y una mayor resistencia al estrés salino tras ser inoculada con bacterias endófitas provenientes de sus propias semillas (Pitzschke, 2016, 2018). De manera similar, en especies invasoras como *Phragmites australis* (Carrizo), con la inoculación con *Pseudomonas* aumentó la germinación y el crecimiento de las plántulas, evidenciando cómo el microbioma de las semillas puede influir en la dinámica de las invasiones vegetales (White et al. 2018). Además, en relación con la dormancia, se ha observado que las bacterias presentes en las semillas de *Lolium rigidum* pueden regular este estado mediante la síntesis de hormonas (Goggin et al. 2015).

Mecanismos de endófitos bacterianos

Existen diversos mecanismos mediante los cuales las bacterias endófitas afectan la fisiología y ecología de sus hospedadores. Estos mecanismos pueden variar incluso dentro de un mismo grupo taxonómico, mientras que endófitos de diferentes grupos pueden emplear mecanismos moleculares similares o idénticos (Partida-Martínez & Heil, 2011). Los endófitos bacterianos, al igual que las bacterias rizosféricas promotoras del crecimiento vegetal, pueden promover el crecimiento y desarrollo de las plantas mediante mecanismos compartidos, como la adquisición de recursos y la modulación del crecimiento vegetal (Hardoim et al. 2008; Santoyo et al. 2016).

i) Adquisición de nutrientes

Un mecanismo importante por el cual las bacterias endófitas influyen sobre el crecimiento de la plántula es la adquisición directa de nutrientes minerales. Las bacterias pueden fijar nitrógeno, solubilizar fosfatos inorgánicos y producir sideróforos que facilitan la absorción de hierro. Aunque el papel exacto de los endófitos autóctonos en la movilización de nutrientes desde el endospermo de la semilla durante la germinación no está completamente claro, se presume que podrían interactuar con las plántulas para facilitar esta movilización (Verma et al. 2019).

El nitrógeno, generalmente considerado uno de los principales nutrientes limitantes en el crecimiento de las plantas. La capacidad de fijar biológicamente el N atmosférico (diazotrofía), es exclusiva de procariontes, con evidencia en bacterias endófitas o de vida libre (Chimwa-murombe et al. 2016). Las bacterias transforman el nitrógeno atmosférico en

amonio y generan disponibilidad de nitrito y óxidos de nitrógeno (N₂O y NO). El NO actúa como una molécula de señalización en las plantas, alterando el crecimiento y la proliferación de las raíces de manera dependiente de la auxina (Lamattina, 2003).

La deficiencia en la disponibilidad de hierro también se considera un factor limitante para el desarrollo de las plantas. En condiciones limitantes de este microelemento esencial, las bacterias endófitas sintetizan sideróforos y ácidos orgánicos que se unen eficientemente al mismo, facilitando su absorción por las células de la raíz (Jeong & Guerinot, 2009). Además, las plantas sintetizan fitosideróforos que capturan hierro y lo transportan a la superficie de la raíz, donde es reducido para su absorción, aunque son de muy baja afinidad en comparación con los sideróforos bacterianos (Lemanceau et al. 2009). La biodisponibilidad del hierro promueve directamente el crecimiento y desarrollo de las plantas (Bulgarelli, 2013; Truyens et al. 2015; Shahzad et al. 2018).

ii) Producción de fitohormonas

La fitoestimulación, que incluye la producción y modulación de hormonas como auxinas, citoquininas y giberelinas, actúa como regulador del crecimiento y desarrollo de las plantas (Weyens et al. 2009). Por ejemplo, la modulación del etileno por bacterias productoras de la enzima *ACC desaminasa* (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) y el ácido indolacético (IAA) puede potenciar esta producción (Glick et al. 2005). Esta modulación del etileno mejora el crecimiento de raíces y la germinación de semillas al reducir la inhibición del crecimiento causada por el estrés, como inundaciones, sequías, compuestos tóxicos y ataques de patógenos (Long et al. 2010). Existe una amplia evidencia de la presencia de la enzima ACC desaminasa en bacterias endófitas, de vida libre y rizosféricas (Lugtenberg et al. 2013).

Otras fitohormonas clave producidas por bacterias endofíticas incluyen el ácido abscísico, las citoquininas y las giberelinas (Malfanova et al. 2013). Entre ellas, citoquininas bacterianas destacan por su capacidad para reducir el periodo de dormancia de las semillas, lo que sugiere una interacción significativa entre las hormonas bacterianas y vegetales dentro de la planta. Esta relación es especialmente relevante en la modulación de los niveles de dormancia en las semillas (Goggin et al. 2015).

Además, los endófitos bacterianos también pueden liberar compuestos orgánicos volátiles (COV) que promueven el crecimiento de las plantas (Ryu et al. 2004).

iii) Resistencia a patógenos

Los endófitos bacterianos protegen a las plantas de los patógenos mediante varios mecanismos clave. Primero, producen sustancias como sideróforos, antibióticos y bacteriocinas que limitan el crecimiento de los patógenos al secuestrar hierro y eliminar directamente a los organismos dañinos (Berg & Raaijmakers, 2018). Además, estos endófitos estimulan las respuestas defensivas de las plantas, mejorando su capacidad para resistir infecciones (Rudrappa et al. 2008; de Vrieze et al. 2018).

Por otro lado, los endófitos de semillas también compiten por recursos y espacio con los patógenos, reduciendo las oportunidades de infección. Además, hay evidencia del reclutamiento de cepas bacterianas beneficiosas en la espermosfera después de la germinación, la cual puede promover el desarrollo de las plántulas al disminuir la colonización por *Pythium aphanidermatum* (Jack & Nelson, 2018). En conjunto, estos mecanismos fortalecen la resistencia de las plantas frente a diversos tipos de estrés biótico y abiótico (Khalaf & Raizada, 2018).

Microbioma de semillas: fundamentos para su conservación.

El conocimiento sobre el microbioma de semillas autóctonas en ecosistemas naturales sigue siendo limitado (Hassani et al. 2018). La mayoría de los estudios se han centrado en microbiomas de cultivos comerciales, utilizando cepas bacterianas comerciales o aislados de estos ambientes (Truyens et al. 2015). Esta falta de investigación impide una comprensión más profunda de cómo las bacterias afectan a ecosistemas naturales más complejos y dinámicos (Pérez-Montaña et al. 2014; Backer et al. 2018). Por ello, es urgente ampliar los estudios sobre las bacterias nativas y su impacto a largo plazo en estos ecosistemas (Santos-Medellín et al. 2021).

La perturbación antropogénica del hábitat es un factor clave que altera la biodiversidad, afectando no solo la persistencia de las especies, sino también las interacciones ecológicas que las sostienen (Fonturbel, 2015). Estas interacciones ecológicas son fundamentales, ya que vinculan la selección natural y la dinámica de las poblaciones, sustentando los procesos ecológicos y evolutivos que impulsan la biodiversidad.

En este contexto, el microbioma de las semillas forma parte de una red compleja de interacciones en los ecosistemas. Actualmente se conoce que el ensamblaje del microbioma de las semillas tiene vínculo con otras interacciones, entre ellas con los microbiomas de los dispersores y polinizadores (Rodríguez-Cabal et al. 2007; Fonturbel, 2015). Las interacciones que tienen lugar dentro y alrededor de las semillas tienen impactos significativos sobre la salud y la productividad de las plantas en los ecosistemas tanto agrícolas como naturales (Nelson, 2018).

La introducción de especies exóticas representa una causa común de alteración en las funciones ecosistémicas (Hooper et al. 2005). En este contexto, las semillas de especies exóticas suelen ser introducidas junto con su microbioma residente, el cual podría desempeñar un papel crucial en su establecimiento, colonización y propagación, en concordancia con la hipótesis del mutualismo mejorado (Klironomos, 2002; Reinhart & Callaway, 2006; Shearin et al. 2018). Sin embargo, el papel específico del microbioma de la semilla en la capacidad invasiva de estas especies aún no ha sido completamente elucidado (Newcombe et al. 2009). Por ello, profundizar en las interacciones entre el microbioma de las semillas, las plantas y los mecanismos subyacentes bajo condiciones naturales es esencial para predecir de manera más precisa las consecuencias de estas relaciones en la dinámica de las comunidades vegetales y los procesos de invasión.

El conocimiento actual del microbioma de la semillas contribuye a la conservación de especies de plantas dado su interacción con su ciclo de vida (Berg & Raaijmakers, 2018). Entre las estrategias de conservación y restauración de comunidades vegetales, está el almacenamiento de semillas autóctonas (Merritt & Dixon 2011). Chandel et al. (2021) demostraron que, en *Glycine max* (Soja) el secado inicial de las semillas antes del almacenamiento redujo significativamente la composición microbiana, lo que sugiere que el aislamiento microbiano previo al secado es fundamental para conservar estos microorganismos. Además, identificaron que el almacenamiento a -20 °C es la condición más adecuada para preservar el microbioma bacteriano de las semillas, ya que esta temperatura ralentiza la pérdida de diversidad microbiana, especialmente en taxones de baja abundancia, durante períodos prolongados. No obstante, la influencia de las condiciones de almacenamiento en la conservación del microbioma de las semillas sigue siendo poco estudiada, especialmente en el caso de las semillas de especies nativas. El microbioma de las semillas se ha propuesto como una herramienta para la conservación y la restauración de los ecosistemas (Truyens et al. 2015; Kusstatscher et al. 2021). Tradicionalmente, los programas de restauración de ecosistemas degradados se han centrado en la reintroducción de especies vegetales, evaluando la biodiversidad principalmente en función del número y la abundancia de especies (Wortley et al. 2013; Fraser et al. 2015). Sin embargo, estos proyectos suelen enfocarse en plantas vasculares, dejando de lado los microorganismos, y el papel esencial que desempeñan en la funcionalidad de los ecosistemas (Barrett et al. 2009; Harry, 2009; Calabrese & Rovere, 2013). Incluir el microbioma en los procesos de restauración puede transformar la salud de las plantas en un puente hacia la recuperación integral del ecosistema.

Por lo tanto, el estudio del microbioma de las semillas es fundamental para comprender y conservar la diversidad de los ecosistemas naturales. A pesar de su importancia, la investigación en este campo aún es incipiente, y persisten muchas preguntas sobre cómo influye en la adaptación de las plantas, sus interacciones ecológicas y la invasividad de especies exóticas. Para avanzar en la conservación y restauración de los ecosistemas, es crucial profundizar en el conocimiento del microbioma de las semillas y garantizar que las estrategias de conservación incluyan la preservación de organismos microbianos esenciales.

A nivel mundial, la investigación sobre el microbioma de las semillas, aunque aún en sus primeras etapas, está proporcionando valiosa información sobre sus diversidad, funciones y mecanismos de interacción con las plantas hospedantes. Esta investigación también está revelando cómo la diversidad microbiana presente en las semillas interactúa con otros microbiomas importantes, como el de las plantas, el del suelo, así como los microbiomas asociados con dispersores y polinizadores. En esencia, los estudios están comenzando a desentrañar las complejas redes de relaciones entre los microorganismos en las semillas y sus efectos en el entorno, lo que es fundamental para entender la ecología y el funcionamiento de los ecosistemas (Nelson, 2018).

Particularmente en Uruguay, el conocimiento actual del microbioma de semillas en especies nativas es limitado, especialmente en comparación con el entendimiento de microorganismos simbióticos en leguminosas (Zabaleta, 2013; Ríos Mendaro, 2014), y de

endófitos hongos en especies arbóreas asociados a las hojas y semillas (Alonso et al. 2011; Bettucci et al. 2004; Tiscornia et al. 2012; Sessa et al. 2018). Siendo estudio de las bacterias endófitas de árboles nativos de Uruguay un área poco investigada (Vaz Jauri et al. 2023).

El Laboratorio de Microbiología de Suelo (LMS) del Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales (IECA) de la Facultad de Ciencias - UdelAR conjunto con el Laboratorio de Ecología Fluvial del Departamento de Ciencias Biológicas del CENUR Litoral Norte - UdelAR comenzó en el año 2021 sus experiencias en el estudio de la microbiota endófitica cultivable en semillas nativas de bosques riparios en el corredor biológico del Río Uruguay. Su investigación se ha centrado en las bacterias nativas asociadas a diversas especies leñosas nativas, considerando que representan una valiosa riqueza natural de nuestro bosque* con información sumamente limitada. El grupo LMS, ha dirigido sus esfuerzos al estudio de las características de los endófitos bacterianos, poniendo énfasis en aislamientos bacterianos, y evaluar cómo las bacterias nativas pueden promover el crecimiento de plántulas. Entre los árboles estudiados se encuentran especies nativas de las familias más representativas del país, siendo Myrtaceas como *Eugenia uruguayensis* y *Myrcianthes cisplatensis*, y de la familia Fabaceae entre ellas, *Erythrina crista-galli* y *Gleditsia amorphoides*, además se estudió la invasora *Gleditsia triacanthos*. Las semillas nativas mostraron una amplia diversidad de aislamientos bacterianos, destacando la presencia de 28 géneros, entre ellos *Pseudomonas* y *Bacillus*, muchos de los cuales presentan características biotecnológicas notables. Estos hallazgos, recientemente publicados en Vaz Jauri et al. 2023, enriquecen nuestro conocimiento sobre las interacciones planta-microorganismo en los bosques y proporcionan información valiosa para la conservación y el manejo de estos ecosistemas.

Bibliografía

- Abdelfattah, A., Tack, A. J. M., Lobato, C., Wassermann, B., & Berg, G. (2023). From seed to seed: The role of microbial inheritance in the assembly of the plant microbiome. *Trends in Microbiology*, *31*(4), 346–355. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.10.009>
- Adam, E., Bernhart, M., Müller, H., Winkler, J., & Berg, G. (2018). The *Cucurbita pepo* seed microbiome: genotype-specific composition and implications for breeding. *Plant and Soil*, *422*, 35–49.
- Aleklett, K., Hart, M., & Shade, A. (2014). The microbial ecology of flowers: an emerging frontier in phyllosphere research. *Botany*, *92*(4), 253–266.
- Álvarez-Pérez, S., Herrera, C. M., & de Vega, C. (2012). Zooming-in on floral nectar: a first exploration of nectar-associated bacteria in wild plant communities. *FEMS Microbiology Ecology*, *80*(3), 591–602. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01329.x>
- Ambika Manirajan, B., Ratering, S., Rusch, V., Schwiertz, A., Geissler-Plaum, R., Cardinale, M., & Schnell, S. (2016). Bacterial microbiota associated with flower pollen is influenced by pollination type and shows a high degree of diversity and species-specificity. *Environmental Microbiology*, *18*(12), 5161–5174. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13524>
- Andreote, F. D., Gumiere, T., & Durrer, A. (2014). Exploring interactions of plant microbiomes. *Scientia Agricola*, *71*(6), 528–539. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2014-0195>
- Azcón-Bieto, J., & Talón, M. (2013). *Fundamentos de fisiología vegetal*. España: Editorial McGraw-Hill.
- Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., & Smith, D. L. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 1473.
- Baedke, J., Fábregas-Tejeda, A., & Delgado, A. N. (2020). The holobiont concept before Margulis. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, *334*(3), 149–155. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22931>
- Bakker, J. P., Poschlod, P., Strykstra, R. J., Bekker, R. M., & Thompson, K. (1996). Seed banks and seed dispersal: important topics in restoration ecology. *Acta Botanica Neerlandica*, *45*(4), 461–490.
- Bagchi, R., Gallery, R. E., Gripenberg, S., Gurr, S. J., Narayan, L., Addis, C. E., & Lewis, O. T. (2014). Pathogens and insect herbivores drive rainforest plant diversity and composition. *Nature*, *506*(7486), 85–88.
- Barret, M., Briand, M., Bonneau, S., Préveaux, A., Valiere, S., Bouchez, O., & Jacques, M. A. (2015). Emergence shapes the structure of the seed microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(4), 1257–1266.
- Bartlewicz, J., Lievens, B., Honnay, O., et al. (2016). Microbial diversity in the floral nectar of *Linaria vulgaris* along an urbanization gradient. *BMC Ecology*, *16*(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s12898-016-0072-1>
- Beckstead, J., Meyer, S. E., Molder, C. J., & Smith, C. (2007). A race for survival: Can *Bromus tectorum* seeds escape *Pyrenophora semeniperda*-caused mortality by germinating quickly? *Annals of Botany*, *99*(5), 907–914.
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M. J., & Bakker, P. A. H. M. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, *17*(8), 478–486. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.04.001>

Berg, G., & Raaijmakers, J. M. (2018). Saving seed microbiomes. *ISME Journal*, 12(5), 1167–1170. <https://doi.org/10.1038/s41396-017-0028-2>

Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M. C. C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G. H., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J. A., Maguin, E., Mauchline, T., McClure, R., Schloter, M. (2020). Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>

Bettucci, L., Simeto, S., Alonso, R., & Lupo, S. (2004). Endophytic fungi of twigs and leaves from three native species of *Myrtaceae* in Uruguay. *Sydowia*, 56, 8–23.

Bever, J., Mangan, A., & Alexander, M. (2015). Maintenance of plant species diversity by pathogens. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 46, 305–325.

Bintarti, A. F., Sulesky-Grieb, A., Stopnisek, N., & Shade, A. (2022). Endophytic microbiome variation among single plant seeds. *Phytobiomes Journal*, 6(1), 45–55.

Bordenstein, S. R., & Theis, K. R. (2015). Host biology in light of the microbiome: Ten principles of holobionts and hologenomes. *PLoS Biology*, 13(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002226>

Bulgarelli, D., Schlaeppli, K., Spaepen, S., Themaat, E. V. L. Van, & Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual Review of Plant Biology*, 64, 807–838. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120106>

Calabrese, G., & Rovere, A. (2013). El rol de los musgos en la germinación de especies leñosas: Implicancias de la heterogeneidad de micro-sitios para la restauración. *Revista de la Asociación Argentina de Ecología de Paisajes*, 4(2), 130–136.

Carrión, J. S., & Cabezudo, B. (2003). Current perspectives in plant evolution. *Anales de Biología*, 25, 163–198. Facultad de Biología, Universidad de Murcia.

Chambers, J. C., & MacMahon, J. A. (1994). A day in the life of a seed: Movements and fates of seeds and their implications for natural and managed systems. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 25, 263–292. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.25.110194.001403>

Chandel, A., Mann, R., Kaur, J., Norton, S., Edwards, J., Spangenberg, G., & Sawbridge, T. (2021). Implications of seed vault storage strategies for conservation of seed bacterial microbiomes. *Frontiers in Microbiology*, 12, 784796. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.784796>

Chaparro, J. M., Badri, D. V., & Vivanco, J. M. (2014). Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. *The ISME Journal*, 8(4), 790–803. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.196>

Chee-Sanford, J., & Fu, X. (2010). Investigating the role of microorganisms in soil seed bank management. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 1, 257–266.

Chen, H., Wu, H., Yan, B., Zhao, H., Liu, F., Zhang, H., & Liang, Z. (2018). Core microbiome of medicinal plant *Salvia miltiorrhiza* seed: A rich reservoir of beneficial microbes for secondary metabolism? *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 672. <https://doi.org/10.3390/ijms19030672>

Chen, Y., Huang, Z., Li, J., Su, G., & Feng, B. (2020). Complete genome sequence of *Kosakonia radicincitans* GXGL-4A, a nitrogen-fixing bacterium with capability to degrade TEX. *Current Microbiology*, 77, 1848–1857.

Chesneau, G., Torres-Cortes, G., Briand, M., Darrasse, A., Preveaux, A., Marais, C., Jacques, M. A., Shade, A., & Barret, M. (2020). Temporal dynamics of bacterial communities during seed development and maturation. *FEMS Microbiology Ecology*, *96*(12). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa190>

Chim-wamurombe, P. M., Grönemeyer, J. L., & Reinhold-Hurek, B. (2016). Isolation and characterization of culturable seed-associated bacterial endophytes from gnotobiotically grown Marama bean seedlings. *FEMS Microbiology Ecology*, *92*(6).

Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E. A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(9), 4951–4959.

Compant, S., Clément, C., & Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. In *Soil Biology and Biochemistry*, *42*(5), 669–678. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>

Compant, S., Mitter, B., Colli-Mull, J. G., Gangl, H., & Sessitsch, A. (2011). Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: Identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. *Microbial Ecology*, *62*(1), 188–197. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9883-y>

Compant, S., Samad, A., Faist, H., & Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of Advanced Research*, *19*, 29–37.

Dalling, J. W., & Harms, K. E. (1999). Damage tolerance and cotyledonary resource use in the tropical. *OIKOS*, *35*(2).

Dalling, J. W., Davis, A. S., Schutte, B. J., & Elizabeth Arnold, A. (2011). Seed survival in soil: Interacting effects of predation, dormancy, and the soil microbial community. *Journal of Ecology*, *99*(1), 89–95.

Dalling, J. W., Davis, A. S., Arnold, A. E., Sarmiento, C., & Zalamea, P. C. (2020). Extending plant defense theory to seeds. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, *51*(1), 123–141.

Davis, A. S., Schutte, B. J., Iannuzzi, J., & Renner, K. A. (2008). Chemical and physical defense of weed seeds in relation to soil seedbank persistence. *Weed Science*, *56*(5), 676–684.

De Vrieze, M., Germanier, F., Vuille, N., & Weisskopf, L. (2018). Combining different potato-associated *Pseudomonas* strains for improved biocontrol of *Phytophthora infestans*. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 2573.

Delaux, P. M., Radhakrishnan, G. V., Jayaraman, D., Cheema, J., Malbreil, M., Volkening, J. D., Sekimoto, H., Nishiyama, T., Melkonian, M., Pokorný, L., Rothfels, C. J., Sederoff, H. W., Stevenson, D. W., Surek, B., Zhang, Y., Sussman, M. R., Dunand, C., Morris, R. J., Roux, C., & Ane, J. M. (2015). Algal ancestor of land plants was preadapted for symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(43), 13390–13395. <https://doi.org/10.1073/pnas.1515426112>

Dickie, I. A., Fukami, T., Wilkie, J. P., Allen, R. B., & Buchanan, P. K. (2012). Do assembly history effects attenuate from species to ecosystem properties? A field test with wood-inhabiting fungi. *Ecology Letters*, *15*(2), 133–141.

Edwards, J. A., Santos-Medellín, C. M., Liechty, Z. S., Nguyen, B., Lurie, E., Eason, S., & Sundaresan, V. (2018). Compositional shifts in root-associated bacterial and archaeal microbiota track the plant life cycle in field-grown rice. *PLOS Biology*, *16*(2), e2003862.

Eyre, A. W., Wang, M., Oh, Y., & Dean, R. A. (2019). Identification and characterization of the core rice seed microbiome. *Phytobiomes Journal*, *3*(2), 148–157.

- Fenner, M., & Thompson, K. (2005). The ecology of seeds. *Cambridge University Press*.
- Ferenci, T. (2016). Trade-off mechanisms shaping the diversity of bacteria. *Trends in Microbiology*, 24(3), 209–223. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.11.009>
- Fontúrbel, F. E., Candia, A. B., Malebrán, J., Salazar, D. A., González-Browne, C., & Medel, R. (2015). Meta-analysis of anthropogenic habitat disturbance effects on animal-mediated seed dispersal. *Global Change Biology*, 21(11), 3951–3960.
- Frank, A. C., Saldierna Guzmán, J. P., & Shay, J. E. (2017). Transmission of bacterial endophytes. *Microorganisms*, 5(4), 70.
- Fraser, L., Harrower, W., Garris, H., Davidson, S., Hebert, P., Howie, R., Moody, A., Polster, D., Schmitz, O., Sinclair, A., Starzomski, B., Sullivan, T., Turkington, R., & Wilson, D. (2015). A call for applying trophic structure in ecological restoration: Trophic structure in restoration. *Restoration Ecology*, 23, 10–13. <https://doi.org/10.1111/rec.12225>
- Friesen, M. L., Porter, S. S., Stark, S. C., von Wettberg, E. J., Sachs, J. L., & Martinez-Romero, E. (2011). Microbially mediated plant functional traits. *Annual review of ecology, evolution, and systematics*, 42(1), 23–46.
- Fukami, T. (2015). Historical contingency in community assembly: integrating niches, species pools, and priority effects. *Annual review of ecology, evolution, and systematics*, 46(1), 1–23.
- Ganley, R. J., & Newcombe, G. (2006). Fungal endophytes in seeds and needles of *Pinus monticola*. *Mycological research*, 110(3), 318–327.
- Geisen, S., Kostenko, O., Cnossen, M. C., Ten Hooven, F. C., Vreš, B., & van Der Putten, W. H. (2017). Seed and root endophytic fungi in a range expanding and a related plant species. *Frontiers in microbiology*, 8, 1645.
- Gilbert, S. F., Sapp, J., & Tauber, A. I. (2012). A symbiotic view of life: We have never been individuals. *The Quarterly Review of Biology*, 87(4), 325–341.
- Glick, B. R. (2015). Beneficial plant-bacterial interactions (243). *Springer*.
- Godon J.J., Arulazhagan P., Steyer J.P., Hamelin J. (2016). Vertebrate bacterial gut diversity: size also matters. *BMC Ecol* 16:12. <https://doi.org/10.1186/s12898-016-0071-2>
- Goggin, D. E., Emery, R. N., Kurepin, L. V., & Powles, S. B. (2015). A potential role for endogenous microflora in dormancy release, cytokinin metabolism and the response to fluridone in *Lolium rigidum* seeds. *Annals of botany*, 115(2), 293–301.
- Gundel, P. E., Helander, M., Garibaldi, L. A., et al. (2017). Direct and indirect effects of the fungal endophyte *Epichloë uncinatum* on litter decomposition of the host grass, *Schedonorus pratensis*. *Plant Ecology*, 218(8), 1107–1115. <https://doi.org/10.1007/s11258-017-0755-5>
- Guo, J., Bowatte, S., & Hou, F. (2021). Diversity of endophytic bacteria and fungi in seeds of *Elymus nutans* growing in four locations of Qinghai-Tibet Plateau, China. *Plant and Soil*, 459(1–2), 49–63. <https://doi.org/10.1007/s11104-020-04608-y>
- Hadj-Chikh, L. Z., Steele, M. A., & Smallwood, P. D. (1996). Caching decisions by grey squirrels: a test of the handling time and perishability hypotheses. *Animal Behaviour*, 52(5), 941–948.
- Hamzazai, A. (2020). Factors Shaping Endophyte Communities Associated with Selected Cultivated Plants in Arizona (Doctoral dissertation, The University of Arizona).

- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., & Elsas, J. D. van. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, *16*(10), 463–471. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.07.008>
- Hardoim, P. R., Hardoim, C. C., van Overbeek, L. S., & van Elsas, J. D. (2012). Dynamics of seed-borne rice endophytes on early plant growth stages. *PLoS One*, *7*(2), e30438. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030438>
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., Döring, M., & Sessitsch, A. (2015). The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *79*(3), 293–320. <https://doi.org/10.1128/mmmbr.00050-14>
- Hassani, M. A., Durán, P., & Hacquard, S. (2018). Microbial interactions within the plant holobiont. *Microbiome*, *7*(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0445-0>
- Hooper, D. U., Chapin, F. S., III, Ewel, J. J., Hector, A., Inchausti, P., Lavorel, S., Lawton, J. H., Lodge, D. M., Loreau, M., Naeem, S., Schmid, B., Setälä, H., Symstad, A. J., Vandermeer, J., & Wardle, D. A. (2005). Effects of biodiversity on ecosystem functioning: A consensus of current knowledge. *Ecological Monographs*, *75*(1), 3–35. <https://doi.org/10.1890/04-0922>
- Jack, A. L., & Nelson, E. B. (2018). A seed-recruited microbiome protects developing seedlings from disease by altering homing responses of *Pythium aphanidermatum* zoospores. *Plant and Soil*, *422*, 209–222.
- Jeong, J., & Guerinot, M. L. (2009). Homing in on iron homeostasis in plants. *Trends in Plant Science*, *14*(5), 280–285.
- Johnston-Monje, D., Gutiérrez, J. P., & Lopez-Lavalle, L. A. B. (2021). Seed-transmitted bacteria and fungi dominate juvenile plant microbiomes. *Frontiers in Microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.737616>
- Johnston-Monje, D., & Raizada, M. N. (2011). Conservation and diversity of seed associated endophytes in *Zea* across boundaries of evolution, ethnography and ecology. *PLoS One*, *6*(6), e20396.
- Khalaf, E. M., & Raizada, M. N. (2018). Bacterial seed endophytes of domesticated cucurbits antagonize fungal and oomycete pathogens including powdery mildew. *Frontiers in Microbiology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00042>
- Kissell, D. (2019). Recruitment of microbes to seeds of an ethnobotanically important restoration plant (*Prosopis velutina*): Land use history and student engagement (Thesis, University of Arizona).
- Klaedtke, S., Jacques, M. A., Raggi, L., Préveaux, A., Bonneau, S., Negri, V., & Barret, M. (2016). Terroir is a key driver of seed-associated microbial assemblages. *Environmental Microbiology*, *18*(6), 1792–1804.
- Kusstascher, P., Adam, E., Wicaksono, W. A., Bernhart, M., Olimi, E., Müller, H., & Berg, G. (2021). Microbiome-assisted breeding to understand cultivar-dependent assembly in *Cucurbita pepo*. *Frontiers in Plant Science*, *12*, 642027.
- Lamattina, L., García-Mata, C., Graziano, M., & Pagnussat, G. (2003). Nitric oxide: The versatility of an extensive signal molecule. *Annual Review of Plant Biology*, *54*(1), 109–136.
- Latz, M. A. C., Kern, M. H., Sørensen, H., Collinge, D. B., Jensen, B., Brown, J. K. M., Madsen, A. M., & Jørgensen, H. J. L. (2021). Succession of the fungal endophytic microbiome of wheat is dependent on tissue-specific interactions between host genotype and environment. *Science of the Total Environment*, *759*, 143804. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143804>
- Lemanceau, P., Expert, D., Gaymard, F., Bakker, P. A. H. M., & Briat, J. F. (2009). Role of iron in plant–microbe interactions. *Advances in Botanical Research*, *51*, 491–549.

Lemanceau, P., Barret, M., Mazurier, S., Mondy, S., Pivato, B., Fort, T., & Vacher, C. (2017). Plant communication with associated microbiota in the spermosphere, rhizosphere and phyllosphere. *Advances in Botanical Research*, 82, 101–133. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2016.10.007>

Links, M. G., Demeke, T., Gräfenhan, T., Hill, J. E., Hemmingsen, S. M., & Dumonceaux, T. J. (2014). Simultaneous profiling of seed-associated bacteria and fungi reveals antagonistic interactions between microorganisms within a shared epiphytic microbiome on *Triticum* and *Brassica* seeds. *New Phytologist*, 202(2), 542–553.

Lodewyckx, C., Vangronsveld, J., Porteous, F., Moore, E. R. B., Taghavi, S., Mezgeay, M., & Van der Lelie, D. (2002). Endophytic bacteria and their potential applications. In *Critical Reviews in Plant Sciences*, 27(6), 583–606. <https://doi.org/10.1080/0735-260291044377>

Long, H. H., Sonntag, D. G., Schmidt, D. D., & Baldwin, I. T. (2010). The structure of the culturable root bacterial endophyte community of *Nicotiana attenuata* is organized by soil composition and host plant ethylene production and perception. *New Phytologist*, 185(2), 554–567.

Long, R. L., Gorecki, M. J., Renton, M., Scott, J. K., Colville, L., Goggin, D. E., Commander, L. E., Westcott, D. A., Cherry, H., & Finch-Savage, W. E. (2015). The ecophysiology of seed persistence: A mechanistic view of the journey to germination or demise. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 90(1), 31–59. <https://doi.org/10.1111/bvr.12095>

Lugtenberg, B. J., Malfanova, N., Kamilova, F., & Berg, G. (2013). Plant growth promotion by microbes. *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*, 1, 559–573.

Madmony, A., Chernin, L., Pleban, S., Peleg, E., & Riov, J. (2005). *Enterobacter cloacae*, an obligatory endophyte of pollen grains of Mediterranean pines. *Folia Microbiologica*, 50, 209–216.

McCully, M. E. (1999). Roots in soil: Unearthing the complexities of roots and their rhizospheres. *Annual Review of Plant Biology*, 50(1), 695–718.

Malfanova, N., Lugtenberg, B. J., & Berg, G. (2013). Bacterial endophytes: Who and where, and what are they doing there? *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*, 1, 391–403.

Mall, U., & Singh, G. S. (2013). Soil seed bank dynamics: History and ecological significance in sustainability of different ecosystems. In *Environment and Sustainable Development* (pp. 31–46).

Mano, H., Tanaka, F., Watanabe, A., Kaga, H., Okunishi, S., & Morisaki, H. (2006). Culturable surface and endophytic bacterial flora of the maturing seeds of rice plants (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy field. *Microbes and Environment*, 21(2), 144–151.

Martins, S. J., Medeiros, F. H., Lakshmanan, V., & Bais, H. P. (2018). Impact of seed exudates on growth and biofilm formation of *Bacillus amyloliquefaciens* ALB629 in common bean. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2631. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02631>

Merritt, D. J., & Dixon, K. W. (2011). Restoration seed banks a matter of scale. *Science*, 332(6028), 424–425.

Mitter, B., Pfaffenbichler, N., Flavell, R., Compant, S., Antonielli, L., Petric, A., & Sessitsch, A. (2017). A new approach to modify plant microbiomes and traits by introducing beneficial bacteria at flowering into progeny seeds. *Frontiers in Microbiology*, 8, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.0001>

Moles, A. T., Warton, D. I., & Westoby, M. (2003). Seed size and survival in the soil in arid Australia. *Austral Ecology*, 28(5), 575–585.

- Moles, A. T., & Westoby, M. (2004). Seedling survival and seed size: A synthesis of the literature. *Journal of Ecology*, *92*(3), 372-383.
- Müller, D. B., Vogel, C., Bai, Y., & Vorholt, J. A. (2016). The plant microbiota: Systems-level insights and perspectives. *Annual Review of Genetics*, *50*, 211-234. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-034952>
- Nathan, R., & Muller-Landau, H. C. (2000). Spatial patterns of seed dispersal, their determinants and consequences for recruitment. *Trends in Ecology & Evolution*, *15*(7), 278-285.
- Nathan, V. K., Vijayan, J., & Ammini, P. (2020). Comparison of bacterial diversity from two mangrove ecosystems from India through metagenomic sequencing. *Regional Studies in Marine Science*, *35*, 101184. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2020.101184>
- Nelson, E. B. (2004). Microbial dynamics and interactions in the spermosphere. In *Annual Review of Phytobiology*, *42*, 271-309. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.121603.131041>
- Nelson, E. B. (2018). The seed microbiome: Origins, interactions, and impacts. *Plant and Soil*, *422*(1-2), 7-34. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3289-7>
- Nelson, E. B., Simoneau, P., Barret, M., Mitter, B., & Compant, S. (2018). Editorial special issue: the soil, the seed, the microbes and the plant. *Plant and Soil*, *422*(1), 1-5.
- Newcombe, George, Alexey Shipunov, S. D. Eigenbrode, Anil K.H. Raghavendra, H. Ding, Cort L. Anderson, R. Menjivar, M. Crawford, and M. Schwarzländer. (2009). Endophytes Influence Protection and Growth of an Invasive Plant. *Communicative & Integrative Biology*, *2*(1): 29-31. doi:10.4161/cib.2.1.7393.
- Papik, J., Folkmanova, M., Polivkova-Majorova, M., Suman, J., & Uhlik, O. (2020). The invisible life inside plants: Deciphering the riddles of endophytic bacterial diversity. *Biotechnology Advances*, *44*, 107614.
- Partida-Martinez, L. P. P., & Heil, M. (2011). The microbe-free plant: Fact or artifact? *Frontiers in Plant Science*, *2*, 100. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00100>
- Pérez-Jaramillo, J. E., Mendes, R., & Raaijmakers, J. M. (2016). Impact of plant domestication on rhizosphere microbiome assembly and functions. *Plant Molecular Biology*, *90*, 635-644.
- Pérez-Montaño, F., Alías-Villegas, C., Bellogín, R., Del Cerro, P., Espuny, M., Jiménez-Guerrero, I., & Cubo, T. (2014). Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research*, *169*(5-6), 325-336.
- Pernthaler, J., Rosenberg, E., DeLong, E., & Lory, S. (2013). Freshwater microbial communities. In *Bacterial Diversity in Nature and Technology* (pp. 13-30). https://doi.org/10.1007/978-94-007-5333-0_2
- Pitzschke, A. (2016). Developmental peculiarities and seed-borne endophytes in quinoa: Omnipresent, robust bacilli contribute to plant fitness. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 2.
- Ríos Mendaro, C. (2014). Estudio de bacterias simbiotas de leguminosas nativas: Aportes para la conservación de la biodiversidad en un área protegida de Uruguay. Universidad de la República. *Repositorio COLIBRÍ*. <http://hdl.handle.net/20.500.12008/6403>
- Sun, Z., Lee-Sarwar, K., Kelly, R. S., Lasky-Su, J. A., Litonjua, A. A., Weiss, S. T., & Liu, Y. Y. (2023). Revealing the importance of prenatal gut microbiome in offspring neurodevelopment in humans. *EBioMedicine*, *90*, 103496.
- Tarquino, F., Attlan, O., Vanderklift, M. A., Berry, O., & Bissett, A. (2021). Distinct endophytic bacterial communities inhabiting seagrass seeds. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 703014.

Theis, K. R., Dheilly, N. M., Klassen, J. L., Brucker, R. M., Baines, J. F., Bosch, T. C. G., Cryan, J. F., Gilbert, S. F., Goodnight, C. J., Lloyd, E. A., Sapp, J., Vandenkoornhuysen, P., Zilber-Rosenberg, I., Rosenberg, E., & Bordenstein, S. R. (2016). Getting the hologenome concept right: An eco-evolutionary framework for hosts and their microbiomes. *MSystems*, 12(2), e00028-16. <https://doi.org/10.1128/msystems.00028-16>

Tiscornia, G., Cal, A., & Giménez, A. (2016). Análisis y caracterización de la variabilidad climática en algunas regiones de Uruguay. *RIA. Revista de investigaciones agropecuarias*, 42(1), 66-71.

Toju, H., Vannette, R. L., Gauthier, M. P. L., Dhami, M. K., & Fukami, T. (2018). Priority effects can persist across floral generations in nectar microbial metacommunities. *OIKOS*, 127(3), 345–352. <https://doi.org/10.1111/oik.04243>

Traveset, A., Heleno, R., & Nogales, M. (2014). The ecology of seed dispersal. In R. S. Gallagher (Ed.), *Seeds: The ecology of regeneration in plant communities* (pp. 62–93). CABI. <https://doi.org/10.1079/9781780641836.0062>

Trivedi, P., Leach, J. E., Tringe, S. G., Sa, T., & Singh, B. K. (2020). Plant–microbiome interactions: From community assembly to plant health. *Nature Reviews Microbiology*, 18(11), 607-621.

Trivedi, P., Batista, B. D., Bazany, K. E., & Singh, B. K. (2022). Plant–microbiome interactions under a changing world: Responses, consequences and perspectives. *New Phytologist*, 234(6), 1951-1959.

Truyens, S., Weyens, N., Cuypers, A., & Vangronsveld, J. (2015). Bacterial seed endophytes: Genera, vertical transmission and interaction with plants. *Environmental Microbiology Reports*, 7(1), 40–50. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12181>

Ushio, M., Yamasaki, E., Takasu, H., Nagano, A. J., Fujinaga, S., Honjo, M. N. & Kudoh, H. (2015). Microbial communities on flower surfaces act as signatures of pollinator visitation. *Scientific reports*, 5(1), 8695. <https://doi.org/10.1038/srep08695>

Vaz Jauri, P. V., Silva, C., Trasante, T., Acosta, S., Tió, A., Lucas, C., & Massa, A. M. (2023). Exploration of seed culturable microbiota for the conservation of South American riparian forests. *Environmental Sustainability*, 6(3), 359-371.

Vandenkoornhuysen, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A., & Dufresne, A. (2015). The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist*, 206(4), 1196–1206. <https://doi.org/10.1111/nph.13312>

Verma, S. K., Kharwar, R. N., & White, J. F. (2019). The role of seed-vectored endophytes in seedling development and establishment. *Symbiosis*, 78(2), 107-113. <https://doi.org/10.1007/s13199-019-00619>

Viana, D. S., Gangoso, L., Bouten, W., & Figuerola, J. (2016). Overseas seed dispersal by migratory birds. Proceedings of the Royal Society B: *Biological Sciences*, 283(1839), 20152406. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.2406>

Wagner, M., & Mitschunas, N. (2008). Fungal effects on seed bank persistence and potential applications in weed biocontrol: A review. *Basic and Applied Ecology*, 9(3), 191-203.

Wagner, M. R., Lundberg, D. S., Coleman-Derr, D., Tringe, S. G., Dangl, J. L., & Mitchell-Olds, T. (2014). Natural soil microbes alter flowering phenology and the intensity of selection on flowering time in a wild *Arabidopsis* relative. *Ecology Letters*, 17(6), 717–726. <https://doi.org/10.1111/ele.12276>

Wang, Y.-L., & Zhang, H.-B. (2023). Assembly and function of seed endophytes in response to environmental stress. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(9), 1119–1129. <https://doi.org/10.4014/jmb.2303.03004>

War, A. F., Bashir, I., Reshi, Z. A., Kardol, P., & Rashid, I. (2023). Insights into the seed microbiome and its ecological significance in plant life. *Microbiological Research*, 269, 127318.

Wassermann, B., Cernava, T., Müller, H., Berg, C., & Berg, G. (2019). Seeds of native alpine plants host unique microbial communities embedded in cross-kingdom networks. *Microbiome*, 7(1), 108.

Wassermann, B., Rybakova, D., Adam, E., Zachow, C., Bernhard, M., Müller, M., Mancinelli, R., & Berg, G. (2021). Studying seed microbiomes. In R. R. Schmidt & D. M. Meier (Eds.), *Methods in Molecular Biology*, 2232, 1-21. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1040-4_1

Weyens, N., van der Lelie, D., Taghavi, S., & Vangronsveld, J. (2009). Phytoremediation: Plant–endophyte partnerships take the challenge. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(2), 248-254.

White, J. F., Kingsley, K. I., Kowalski, K. P., Irizarry, I., Micci, A., Soares, M. A., & Bergen, M. S. (2018). Disease protection and allelopathic interactions of seed-transmitted endophytic pseudomonads of invasive reed grass (*Phragmites australis*). *Plant and Soil*, 422, 195-208.

Wilkinson, D. M., & Sherratt, T. N. (2001). Horizontally acquired mutualisms, an unsolved problem in ecology?. *OIKOS*, 92(2), 377-384.

Wortley, L., Hero, J. M., & Howes, M. (2013). Evaluating ecological restoration success: A review of the literature. *Restoration Ecology*, 21(5), 633-643.

Zabaleta, M. (2013). Conservación de leguminosas nativas y sus bacterias simbióticas del Parque Nacional Esteros de Farrapos e Islas del Río Uruguay (ROU). Universidad de la República. <http://hdl.handle.net/20.500.12008/4049>

Zalamea, P. C., Sarmiento, C., Arnold, A. E., Davis, A. S., & Dalling, J. W. (2015). Do soil microbes and abrasion by soil particles influence persistence and loss of physical dormancy in seeds of tropical pioneers? *Frontiers in Plant Science*, 5, 799. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00799>

Zhang, X., Ma, Y. N., Wang, X., Liao, K., He, S., Zhao, X., Guo, H., Zhao, D., & Wei, H. L. (2022). Dynamics of rice microbiomes reveal core vertically transmitted seed endophytes. *Microbiome*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01422-9>

Zilber-Rosenberg, I., & Rosenberg, E. (2008). Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: The hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(5), 723–735. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00123>.

Capítulo II

Interacción de semillas y plántulas de árboles nativos de Uruguay con bacterias endófitas nativas, en las primeras etapas de la regeneración.

Resumen

Las relaciones entre las bacterias endófitas y sus plantas huésped se han desarrollado a lo largo de una larga historia evolutiva, y tiene influencia en su aptitud a través de funciones esenciales para su desarrollo y evolución, impactando en la estabilidad y el funcionamiento de los ecosistemas. El interés en estudiar las comunidades microbianas asociadas a las plantas ha aumentado significativamente en las últimas décadas. Esta creciente atención ha revelado la importancia de considerar el microbioma un componente activo del desarrollo de las plantas huésped, que también responde a los cambios en las condiciones ambientales (bióticas y abióticas). Esta tesis tiene el objetivo general de evaluar el efecto de la inoculación de bacterias endófitas nativas en las fases iniciales de la regeneración en tres especies de árboles nativos, con un enfoque específico en los procesos de germinación y el desarrollo temprano de las plántulas. En el capítulo I, se realiza una revisión del conocimiento actual sobre las bacterias endófitas y su interacción con las plantas durante las etapas iniciales del desarrollo vegetal. En el capítulo II, dada la importancia ecológica de las zonas ribereñas y los pocos estudios sobre el microbioma de semillas de estos ecosistemas, se evalúa el efecto de la inoculación de bacterias endófitas en tres especies nativas del Bajo Rio Uruguay en América del Sur, *Blepharocalyx salicifolius* (Myrtaceae), *Erythrina crista-galli* (Fabaceae) y *Neltuma affinis* (Fabaceae). Evaluamos el efecto de inoculación con bacterias provenientes de semillas nativas de árboles de Uruguay: *Neobacillus drentensis* (origen Myrtaceae), *Kosakonia radicincitans* (origen Fabaceae), *Citrobacter freundii* y *Priestia megaterium* (origen Lauraceae) sobre la germinación y crecimiento de las plántulas. Específicamente, evaluamos la respuesta germinativa (proporción de germinación final, velocidad de germinación y tiempo medio de germinación), y la vigorosidad de las plántulas en su primera etapa del establecimiento (biomasa seca, altura del tallo, área foliar y la relación biomasa subterráneo:aérea), en comparación con el control sin inoculación. Los resultados resaltan 1) las bacterias endófitas nativas inoculadas tuvieron varios efectos tanto en las variables de germinación como en el crecimiento de las plántulas, 2) los efectos de la inoculación variaron según la combinación de bacteria y especie de árbol. Estos resultados sugieren el potencial efecto de las bacterias endófitas en las etapas de las primeras fases de la regeneración y resalta la complejidad de las interacciones entre bacterias y plantas. Los cuales plantea muchas preguntas y abren nuevos caminos para futuros estudios en la biología de microorganismos asociados con las plantas nativas y la ecología de plántulas en bosques de Uruguay.

Capítulo II

Interacción de semillas y plántulas de árboles nativos de Uruguay con bacterias endófitas nativas, en las primeras etapas de la regeneración.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las plantas son conceptualizadas como holobiontes vegetales, entidades compuestas por la planta huésped y su microbiota asociada, denominado microbioma vegetal (Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008). El microbioma vegetal coloniza todas las especies de plantas conocidas y se encuentra en varias partes de las plantas, incluidas las semillas (Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006). A lo largo de su coevolución, el microbioma vegetal ha desarrollado una relación simbiótica con el huésped, influyendo en numerosos procesos biológicos clave para su supervivencia y desarrollo. Durante las etapas más vulnerables del desarrollo vegetal, estas interacciones resultan fundamentales para la dinámica de las poblaciones y comunidades vegetales (Berg et al. 2014; Larios et al. 2017; Dalling et al. 2020), lo que es esencial para el establecimiento y la continuidad de las especies a largo plazo (Buckley et al. 1998).

La germinación y el desarrollo de las plántulas dependen de una diversidad de factores, tanto bióticos, como el microbioma asociado y la acción de depredadores, así como por factores abióticos, como la temperatura y la luz (Fenner & Thompson, 2005; Sarmiento et al. 2017; Khalaf & Raizada, 2018; Abdelfattah et al. 2023). Dada la alta presión de selección natural en esta etapa, los individuos están expuestos a altos riesgos de mortalidad, representando un “cuello de botella” en su sobrevivencia (Leck et al. 2008; Alvarez-Clare & Kitajima, 2009). Estos factores actúan como “filtros” ecológicos y determinan la distribución espacial de los individuos, por lo tanto, la estructuración de las comunidades (Wang & Smith, 2002; Donohue et al. 2010). Existe una amplia evidencia de que bacterias interfieren en estas etapas iniciales, estimulando los procesos de germinación y crecimiento en las plantas, a través de diversos mecanismos, como la fijación de nitrógeno o la solubilización de fósforo, la producción de fitohormonas y la inducción de la resistencia sistémica (Weyens et al. 2009; Compant et al. 2010; Partida-Martínez & Heil, 2011; Malfanova et al. 2013; Shade et al. 2017).

La transformación de los ecosistemas, impulsada por las actividades humanas y el cambio climático, ha aumentado la necesidad de investigar y gestionar los bosques nativos. Las zonas ribereñas, que cumplen un papel ecológico fundamental, están siendo especialmente afectadas por la agricultura, la ganadería, la forestación y la expansión urbana. Esta alteración ha generado una creciente preocupación, tanto a nivel global como nacional, por la recuperación de estos ecosistemas. Por ello, es crucial comprender las etapas de regeneración de las especies nativas y sus interacciones. Este conocimiento es esencial para desarrollar estrategias de restauración adaptadas a las condiciones específicas de cada ecosistema y para mitigar los impactos en las cuencas hidrográficas.

La cuenca del Río Uruguay cubre un área de aproximadamente 365,000 km² y se extiende a lo largo de 1,600 km, abarcando territorios de Brasil, Argentina y Uruguay (Di Persia et al. 1986). En la cuenca, los bosques desempeñan un papel clave en la conservación de la biodiversidad y el mantenimiento de servicios ecosistémicos, como la protección del ciclo hidrológico, la prevención de la erosión y la contaminación de los cursos de agua (Huston et al. 2004; Pinay et al. 1993). A pesar de su relevancia y del creciente interés nacional en la regeneración de bosques (Etchebarne & Brazeiro, 2016; Etchebarne-Palla et al. 2022), la deforestación (Proyecto REDD+ Uruguay, 2019), el control de especies exóticas (Sosa et al. 2015; Proyecto REDD+ Uruguay, 2019; 2020), y la restauración y gestión forestal (MGAP, 2018), la investigación sobre la ecología de semillas y plántulas de árboles nativos sigue siendo limitada, al igual que el estudio de las bacterias endófitas en estas especies (Vaz Jauri et al. 2023).

Existe evidencia de la diversidad de bacterias en especies arbóreas (Alibrandi et al. 2018; Yarte et al. 2020), principalmente en forestales domesticadas como el pino y el eucalipto (Izumi 2011; Kandel et al. 2017). Sin embargo, en Uruguay los estudios de endófitos en especies arbóreas se han centrado predominantemente en hongos asociados a las hojas y semillas (Alonso et al. 2011; Bettucci et al. 2004; Tiscornia et al. 2012; Sessa et al. 2018).

El Laboratorio de Microbiología de Suelos (LMS) participa en el proyecto del Convenio Específico entre la Comisión Administradora del Río Uruguay (CARU) y el CENUR-Litoral-Norte: "Ecología de la regeneración de especies leñosas nativas del Litoral y su aplicación a la restauración de zonas ribereñas" bajo la coordinación del Polo Ecología Fluvial del CENUR-Litoral-Norte. En este marco el LMS desarrollo estudios de la diversidad funcional de bacterias cultivables del microbioma de semillas de especies nativas de la familia Fabaceae: Corondá (*Gleditsia amorphoides*), Ceibo (*Erythrina crista-galli*), y Myrtaceae: Guayabo colorado (*Myrcianthes cisplatensis*) y Guayabo blanco (*Eugenia uruguayensis*). Actualmente, esta colección de bacterias y los resultados parciales contribuyen a entender la biodiversidad taxonómica y funcional de las bacterias endófitas asociadas a las semillas de los ecosistemas, evidenciando una gran diversidad bacteriana en las semillas de especies de árboles nativos de los bosque del Río Uruguay.

Los beneficios de la inoculación con bacterias endófitas han sido ampliamente estudiados en cultivos y escasamente en plantas nativas, siendo ésta una gran oportunidad de investigación con aislamientos de bacterias endófitas nativas. El principal objetivo de esta investigación será analizar el efecto de la inoculación con bacterias endófitas de semillas de árboles nativos sobre la germinación y el crecimiento de árboles nativos de las zonas ribereñas del Río Uruguay. El proyecto pretende aportar información base sobre las interacciones de árboles nativos de los bosques de Uruguay con bacterias endófitas nativas en las primeras fases de regeneración de las plantas.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar los efectos de la inoculación con cuatro especies de bacterias endófitas nativas *Neobacillus drentensis*, *Kosakonia radicincitans*, *Citrobacter freundii* y *Priestia megaterium* sobre la germinación y el desarrollo temprano de plántulas de las especies arbóreas *Blepharocalyx salicifolius* (Myrtaceae), *Erythrina crista-galli* (Fabaceae) y *Neltuma affinis* (Fabaceae).

Hipótesis

- i) La inoculación con las bacterias endófitas nativas *Neobacillus drentensis*, *Kosakonia radicincitans*, *Citrobacter freundii* y *Priestia megaterium* aumentará significativamente la respuesta germinativa de las semillas de *Blepharocalyx salicifolius* (Myrtaceae), *Erythrina crista-galli* (Fabaceae) y *Neltuma affinis* (Fabaceae), reflejada en una mayor proporción de germinación final, una mayor velocidad de germinación y una reducción en el tiempo medio de germinación.
- ii) La inoculación con bacterias endófitas nativas (*Neobacillus drentensis*, *Kosakonia radicincitans*, *Citrobacter freundii* y *Priestia megaterium*), promoverá un crecimiento inicial más vigoroso en las plántulas de *Blepharocalyx salicifolius* (Myrtaceae), *Erythrina crista-galli* (Fabaceae) y *Neltuma affinis* (Fabaceae), medido en términos de biomasa seca total, altura del tallo, área foliar y la relación subterráneo:aérea.

Objetivos específicos

- i) Analizar la respuesta germinativa de las semillas de *B. salicifolius* (Myrtaceae), *E. crista-galli* (Fabaceae) y *N. affinis* (Fabaceae) tras la inoculación con las bacterias endófitas nativas *N. drentensis*, *K. radicincitans*, *C. freundii* y *P. megaterium*, en términos de proporción de germinación, tiempo medio de germinación y velocidad de germinación.
- ii) Evaluar las variables de crecimiento temprano de las plántulas de las especies *B. salicifolius* (Myrtaceae), *E. crista-galli* (Fabaceae) y *N. affinis* (Fabaceae) tras la inoculación con las bacterias endófitas nativas *Neobacillus drentensis*, *K. radicincitans*, *C. freundii* y *Priestia megaterium*, en términos de biomasa seca total, altura del tallo, área foliar y la relación subterráneo:aérea.

MÉTODOS

Área de estudio

La Cuenca del Río Uruguay abarca aproximadamente 365,000 km² y se extiende a lo largo de unos 1,600 km (Di Persia & Neiff, 1986). Esta cuenca representa alrededor del 11.5% de la cuenca del Río de la Plata, según la delimitación de cuencas por HYDROSheds (Lehner & Grill, 2013), e incluye territorios de Brasil, Argentina y Uruguay. El Río Uruguay tiene su origen en las elevadas regiones de la Serra do Mar, en la costa atlántica de Brasil, específicamente en las cabeceras de los ríos Pelotas y Canoas (Figura 1). El clima de la región se caracteriza como subtropical húmedo (Cfa, Clasificación Climática de Köppen), con una precipitación anual promedio de 1397 mm y⁻¹. La lluvia se distribuye a lo largo del año, con un promedio mensual de 116 mm, según los datos de precipitación mensual CRU 4.05 de 1970 a 2020, accesibles en el KNMI Climate Explorer (Trouet y Van Oldenborgh, 2013).

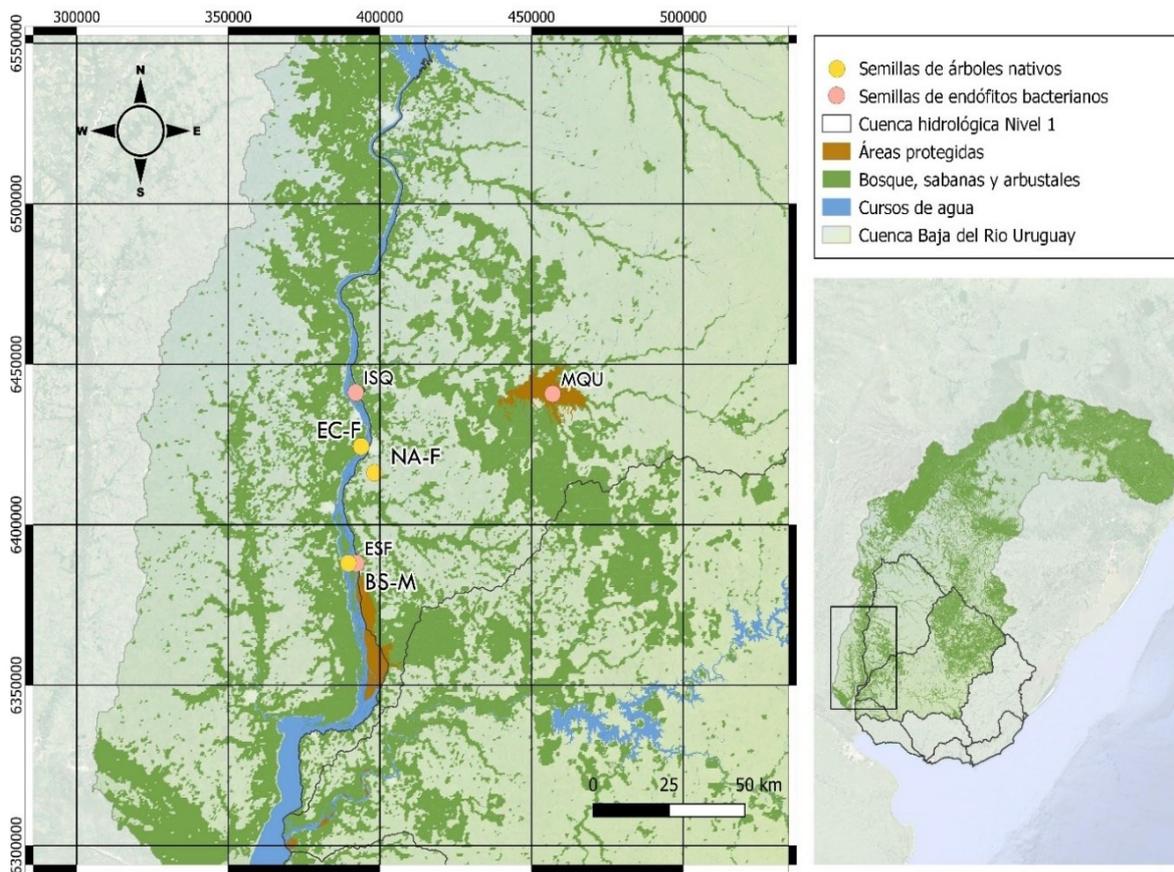


Figura 1. Mapa de la Cuenca del Río Uruguay, con sitios de colección del material vegetal y microbiano. Los puntos son sitios de colecta de semillas. En amarillo las especies inoculadas, *B. salicifolius* (Myrtaceae) (B.S-M), *E. crista-galli* (Fabaceae) (E.C) y *N. affinis* (Fabaceae) (N.A-F). En rosado semillas de bacterias endófitas: *N. dretensis* (ESF), *K. radicincitans* (MQU), *C. freundii* y *P. megaterium* (ISQ). Las Áreas Protegidas en Uruguay indicado en naranja (DINAMA-Geoservicios), debajo cobertura de bosque, sabana y vegetación arbustiva, obtenida a partir de datos MODIS Land Use MCD12Q1 Spatial resolution of 500 x 500 m.

Los bosques en Uruguay ocupan el 5.2% del territorio nacional (MGAP, 2018). Aunque representan una baja superficie, estos ecosistemas son fundamentales para la conservación de la biodiversidad, con una alta proporción de la flora leñosas (91% de las especies) y fauna, incluyendo un 38% de los anfibios, 89% de los reptiles, 61% de las aves y 91% de los mamíferos (Brazeiro et al. 2014). El bajo Río Uruguay y sus tributarios se caracterizan por la presencia de cursos de agua de orden tres y superiores, así como por la existencia de bosques ribereños, los cuales desempeñan un papel fundamental en la zona ribereña de los principales ríos de la región (Mary-Lauye et al., 2023). El área de estudio incluye bosques que son importantes corredores biológicos (Nores et al. 2005), brindan servicios ecosistémicos ligados a la protección del ciclo hidrológico (Huston et al 2004) y previenen la erosión del suelo y la contaminación orgánica de los cursos de agua (Pinay et al. 1993). Los bosques ribereños nativos enfrentan actualmente una creciente amenaza debido a la intensificación de la agricultura y la ganadería, así como a la invasión de especies exóticas (Etchebarne & Brazeiro, 2016; Etchebarne-Palla et al., 2022).

La flora leñosa (arbórea y arbustiva) de Uruguay pertenece a la región Pampeana (Cabrera & Willink, 1973), que está estrechamente relacionada con las floras de origen subtropical Paranaense y Chaqueña de las provincias vecinas (Chebataroff, 1942; Grela, 2004; Haretche et al., 2012). En particular, el área de estudio está influenciada por dos regiones dendroflorísticas: la Paranaense, que abarca el bosque ribereño del Río Uruguay clasificado como Bosque latifoliado de planicie vargedícola, y la Chaqueña, que afecta los bosques parque del litoral, clasificados como Sabana arbolada de planicie en suelo alcalino (Grela, 2004; Haretche et al., 2012; Brazeiro et al., 2020).

El bosque latifoliado de planicie vargedícola, conocido como "bosque ribereño" en Uruguay, se encuentra asociado a los cursos de agua, siendo una formación característica de las zonas riparias del Río Uruguay y sus afluentes. Este ecosistema está compuesto principalmente de árboles y arbustos, formando un dosel continuo con una cobertura superior al 50% y alturas que varían entre 3 y 20 metros (Brazeiro et al. 2020). Estos bosques son dinámicos y están adaptados a las inundaciones periódicas y a la alta humedad del suelo. Presentan una zonificación basada en las necesidades hídricas de las especies: cerca del agua predominan especies hidrófilas como *Salix humboldtiana* (Sauce), *Pouteria salicifolia* (Mataojo) y *Cephalanthus glabratus* (Sarandí colorado); en zonas intermedias se encuentran especies mesófilas como *Blepharocalyx salicifolius* (Arrayán) y *Eugenia uniflora* (Pitanga) y en áreas más secas y luminosas, especies semixerófilas como *Vachellia caven* (Espinillo) y *Schinus molle* (Molle) (Rodríguez et al, 2018).

La sabana arbolada de planicie en suelos alcalinos, conocida como "bosque parque" en Uruguay, se caracteriza por la coexistencia de árboles dispersos y una cobertura herbácea densa que supera el 50% de la superficie. Su dosel arbóreo es abierto, con una cobertura que varía entre el 10% y el 50%, lo que favorece el desarrollo de una rica diversidad de hierbas y subarbustos predominantes en el paisaje (Brazeiro et al., 2020). Este ecosistema, típico de planicies con suelos alcalinos, presenta vegetación arbórea y arbustiva dispersa, dominada por especies espinosas adaptadas a condiciones xerófilas o semixerófilas en suelos mal drenados y salinos, conocidos como blanquizales o blanqueales (Rodríguez et

al., 2018; Baietto et al., 2024). Entre las especies más representativas se encuentran *Neltuma nigra* (Algarrobo negro), *Neltuma affinis* (Ñandubay), *Vachellia caven* (Espinillo), y *Aspidosperma quebracho-blanco* (Quebracho blanco) (Rodríguez et al. 2018).

En esta área se localizan zonas protegidas pertenecientes al Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP) de Uruguay, cuya finalidad es conservar y proteger la diversidad de paisajes, ecosistemas, especies y elementos culturales del país. En particular, el área de estudio incluye las áreas protegidas del Parque Nacional Esteros de Farrapos e Islas del Río Uruguay, así como la Reserva de Recursos Manejados Montes del Queguay.

Selección de especies arbóreas

Las especies arbóreas seleccionadas, *Blepharocalyx salicifolius*, *Erythrina crista-galli* y *Neltuma affinis* (Tabla 1), representan las dos familias más importantes en términos de diversidad de especies leñosas en Uruguay: las Mirtáceas (Myrtaceae) y las Leguminosas (Fabaceae). La disponibilidad de semillas fue un factor clave en la selección de estas especies, particularmente al tener en cuenta los efectos del fenómeno climático La Niña, que causó una sequía prolongada y una reducción en la producción de frutos durante los años 2021 y 2022 (Barreiro & Renom, 2023). Los sitios de colecta incluyen el sitio Ramsar y Parque Nacional Esteros de Farrapos e Islas del Río Uruguay, donde se colectaron semillas con las coordenadas: *Blepharocalyx salicifolius* (-32.6400°S, -58.1489°W), *Erythrina crista-galli* (-32.3121°S, -58.0999°W) y *Neltuma affinis* (-32.38658°S, -58.0539°W) (Figura 1).

Tabla 1. Características de las especies arbóreas de enfoque. La tabla presenta la familia botánica, la especie, el tipo de fruto, el mecanismo de dispersión, el mes y año de colecta y el tipo de cotiledones de cada especie.

Familia	Especie	Fruto	Dispersión	Colecta	Cotiledones
Myrtaceae	<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	Drupa indehiscente	Zoocorica	Abril, 2023	Reserva
Fabaceae	<i>Erythrina crista-galli</i>	Legumbre, dehiscente	Hidrocoria	Octubre, 2022	Reserva
Fabaceae	<i>Neltuma affinis</i>	Legumbre, indehiscente	Zoocorica	Abril, 2023	Foliar

Blepharocalyx salicifolius

Blepharocalyx salicifolius, conocido como Arrayán, es un árbol que varía en tamaño, alcanzando entre 4 y 12 metros de altura, con un tronco recto de hasta 40 cm de diámetro a la altura del pecho (Silva Júnior, 2005; Rodríguez et al. 2018). Esta especie pertenece a la familia Myrtaceae, y se distribuye en Bolivia, Ecuador, sur de Brasil, Paraguay, Uruguay y en el noreste y noroeste de Argentina, llegando hasta la provincia de Buenos Aires, donde es común en la ribera del Río de la Plata y en los bosques del Delta del Paraná (Landrum, 1986; Cabrera & Zardini, 1979; Carvalho, 2006). *B. salicifolius* prospera en diversos ambientes, desde campos abiertos hasta sotobosques bien desarrollados, siendo frecuente en bosques ribereños especialmente en áreas maduras del ecosistema (Lorenzi, 1998). Es considerada

una especie clímax secundaria tardía o demandante de luz (Carvalho, 2006), y algunos autores la categorizan como especie tolerante a la sombra (Morales et al. 1995, Arturi et al. 1998).

El fruto de *B. salicifolius* es una baya globosa de 3 a 5 mm de diámetro, de color naranja a rojizo, y contiene máximo 4 semillas (Rego et al. 2009; Rodríguez et al. 2018). Estas semillas son pequeñas, reniformes, de color verdoso, y miden entre 4 y 5 mm de largo. La dispersión es zoocórica, principalmente a través de aves frugívoras (Mantese & Montaldo, 2000; Silva, 2006). Los frutos maduran de enero a marzo y las semillas, que no presentan dormición, germinan rápidamente (Rego et al. 2013), aunque su longevidad es baja (Lorenzi, 1998; Carvalho, 2006; Rego et al. 2009). Las semillas de esta especie son recalcitrantes, lo que significa que no toleran la deshidratación (Rego et al. 2013). Además, posee cotiledones epigeos y es fanerocotiledónea (Rego et al. 2013).

Erythrina crista-galli

Erythrina crista-galli L., conocida comúnmente como Ceibo, es un árbol de 4-10 m de altura, con tronco de hasta 1 m diámetro en la base (Rodríguez et al. 2018). Esta especie pertenece a la familia Fabaceae, subfamilia Papilionoideae, y se distribuye en América del Sur, en Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay (de Mello et al. 2019).

Se encuentra comúnmente en áreas ribereñas, bosques subtropicales y templados, así como en zonas inundables debido a su capacidad higroscópica, con adaptaciones a ambientes inundables, incluidos pajonales y albardones (Carvalho, 2006; Brussa & Grela, Rodríguez et al., 2018). Además, es una especie pionera (de Mello et al., 2019; González & Cadenazzi, 2015) y tiene la capacidad de fijar nitrógeno en el suelo (Silva et al., 2006).

El fruto de *Erythrina crista-galli* es una legumbre dehiscente, multiseeminada, que mide entre 1,2 y 1,8 cm de ancho por 2 a 35 cm de largo, con un color marrón oscuro (Rodríguez et al., 2018). Las semillas, de forma reniforme, presentan un color castaño oscuro, una superficie lisa y un tegumento duro, alcanzando longitudes de entre 1 y 1,5 cm (Velásquez et al., 2019). Esta especie exhibe un ciclo bianual, con floración y fructificación que ocurre entre diciembre y marzo (Brussa & Grela, 2007). La dispersión de sus semillas es predominantemente hidrocórica, siendo transportadas por el agua, lo que facilita su propagación a lo largo de los cursos fluviales (González & Cadenazzi, 2015). Las semillas presentan dormición física (Silva et al., 2006; Mello et al., 2016), una característica común en la familia *Fabaceae* (Silva et al., 2006). Los tratamientos pregerminativos más utilizados para esta especie incluyen la escarificación química, mecánica y térmica (Silva et al., 2006; Mello et al., 2016). La germinación de *E. crista-galli* es epigea o fanerocotiledónea (Carvalho, 2006). Aunque se clasifica generalmente como una semilla ortodoxa (Silva et al., 2006), algunos estudios sugieren que *E. crista-galli* podría presentar semillas recalcitrantes (Neill, 1993).

Neltuma affinis

Neltuma affinis, previamente conocida como *Prosopis affinis* (Hughes et al 2022), comúnmente denominada Ñandubay, es un árbol de pequeño porte, de 3 a 8 metros de

altura, con copa extendida achaparrada (Rodríguez et al. 2018). Esta especie pertenece a la familia Fabaceae, subfamilia Mimosoideae, se distribuye en Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay. *N. affinis* es una especie característica de la provincia del Espinal, crece en todo el litoral del país a veces junto con *N. nigra* (Algarrobo), constituyendo formaciones de bosques parques, en pequeños islotes y en ejemplares aislados (Rodríguez, et al. 2018). La especie muestra una clara adaptación a la ocurrencia de episodios de sequía. Sin embargo, desde el punto de vista edáfico, es tolerante al mal drenaje, sobreviviendo en sitios inundados periódicamente. Es también una especie fijadora de nitrógeno (Bennadji, & Alfonso, 2013).

El fruto de *Neltuma affinis* es una legumbre multiseeminada, con un margen ondulado y un color amarillo con manchas violáceas (Palacios & Brizuela, 2005; Rodríguez et al. 2018). Las semillas tienen una forma ovalada, de color marrón, y están recubiertas por un tegumento externo resistente. Para reducir la dormición del tegumento, los tratamientos más efectivos incluyen la aplicación de ácido sulfúrico y el lijado (Carrillo et al., 2020). En términos de viabilidad y capacidad de germinación, las semillas mantienen su potencial germinativo incluso después de 5 meses de recolección y almacenamiento a 4°C en condiciones de refrigeración (Carrillo et al., 2020).

Origen de material microbiano

Las bacterias endófitas utilizadas en este estudio fueron aisladas y caracterizadas por Vaz et al. (2023), donde analizaron la microbiota bacteriana cultivable de semillas de árboles nativos de Uruguay. Las semillas fueron recolectadas entre 2019 y 2020 en cinco sitios diferentes, incluidos Áreas Protegidas y sitios Ramsar. Para aislar las bacterias, las semillas fueron esterilizadas y cultivadas en diversos medios, seleccionando cepas de interés biotecnológico. Se evaluaron características como la actividad de pectinasa, el antagonismo contra *Fusarium graminearum* y la capacidad de promover el crecimiento de *Brassica juncea* (Vaz Jauri et al., 2023).

Para este ensayo, se seleccionaron bacterias representativas de cada familia botánica del hospedador, conformando un grupo de cepas que reflejan la diversidad de las familias de plantas estudiadas, elegidas por sus características relacionadas con la promoción del

Tabla 2. Bacterias endófitas seleccionadas con su clasificación taxonómica y los hospedadores vegetales nativos asociados. Los sitios de colección para cada una de las bacterias endófitas seleccionadas son: Islas del Queguay (ISQ), Montes del Queguay (MQU) y área protegida Parque Nacional Esteros de Farrapos e Islas del Río Uruguay (EST).

Bacteria endófitas	Orden	Hospedador vegetal	Sitio de colecta
<i>Neobacillus drentensis</i>	Bacillales	<i>Eugenia uruguayensis</i> (Myrtaceae)	ESF
<i>Kosakonia radicincitans</i>	Enterobacterales	<i>Gleditsia amorphoides</i> (Fabaceae)	MQU
<i>Citrobacter freundii</i>	Enterobacterales	<i>Nectandra angustifolia</i> (Lauraceae)	ISQ
<i>Priestia megaterium</i>	Bacillales	<i>Nectandra angustifolia</i> (Lauraceae)	ISQ

crecimiento vegetal. Las especies bacterianas seleccionadas fueron: *Neobacillus drentensis*, *Kosakonia radicincitans*, *Citrobacter freundii* y *Priestia megaterium* (Tabla 2).

Los sitios de colecta incluyen Islas del Queguay (ISQ), Montes del Queguay (MQU) y área protegida Parque Nacional Esteros de Farrapos e Islas del Río Uruguay (EST), donde se colectaron semillas con las coordenadas: *N. drentensis* aislada de *Eugenia uruguayensis* (Myrtaceae) (-32.6427°S, -58.1401°W), *K. radicincitans* de *Gleditsia amorphoides* (Fabaceae) (-32.1658°S, -57.4493°W), *C. freundii* y *P. megaterium* de *Nectandra angustifolia* (Lauraceae) (-32.1730°S, -58.1360°W) (Figura 1).

Neobacillus drentensis

Neobacillus drentensis, previamente descrita como *Bacillus drentensis*, pertenece al filo Firmicutes (Patel & Gupta, 2020; Heyrman et al., 2004). Es una bacteria Gram-positiva, aerobia y formadora de esporas (Liu, 2016). Esta especie ha sido identificada como endófito en diversos cultivos, incluyendo *Physalis ixocarpa*, *Lavandula dentata* (lavanda), *Oryza sativa* (arroz) (Yadav et al., 2011), *Vigna radiata* (frijol mungo) (Mahmood et al., 2016), así como en *Mimosa pudica* (Fabaceae) (Hernández-Pacheco et al., 2021; Pereira, 2016; Akter, 2022) (Anexo 1).

Neobacillus drentensis presenta diversos rasgos que favorecen el crecimiento vegetal, como la producción de ácido indolacético (AIA), sideróforos, solubilización de fosfatos y actividad ACC desaminasa (Mahmood et al., 2016; Hernández-Pacheco et al., 2021). También genera amoníaco (NH₃), ácido cianhídrico (HCN) y enzimas extracelulares (Pereira et al., 2016). Esta bacteria exhibe un fuerte antagonismo contra hongos patógenos como *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani* (Hernández-Pacheco et al., 2021). Además, promueve el crecimiento de *Zea mays* (maíz) bajo estrés salino, mejorando la altura, el diámetro del tallo y la biomasa, y en *Vigna radiata* (frijol mungo), aumentando la biomasa fresca y la longitud de raíces y brotes en condiciones de riego salino (Ayil, 2023; Mahmood et al., 2016) (Anexo 3).

Kosakonia radicincitans

Kosakonia radicincitans, anteriormente conocida como *Enterobacter radicincitans*, pertenece al género *Kosakonia* y al complejo *Enterobacter* (Brady et al., 2013). Es una bacteria Gram-negativa (Kämpfer et al., 2005; Berger et al., 2018). Las cepas del género *Kosakonia* se han encontrado colonizando naturalmente plantas en casi todos los principales clados de angiospermas (Lambrese, 2018). En particular, *K. radicincitans* se ha identificado en cultivos de importancia económica global, como *Zea mays* (maíz) (Chen et al., 2020), *Saccharum officinarum* (caña de azúcar) (Talué et al., 2016), *Ilex paraguariensis* (yerba mate) (Bergottini et al., 2015) y *Musa sp.* (hoja de banano) (Francisco Quintas-Nunes et al., 2022) (Anexo 1).

K. radicincitans es una bacteria diazotrófica eficiente, capaz de solubilizar fosfatos (Schilling et al., 1998) y producir sideróforos (Bergottini et al., 2015; Lambrese, 2018) (Anexo 2). Se ha identificado como promotora del crecimiento vegetal (Berger et al., 2015),

mejorando el rendimiento en cultivos como *Cucumis sativus* (pepino), *Triticum aestivum* (trigo), *Solanum lycopersicum* (tomate) y *Raphanus sativus* (rábano) (Sun et al., 2018; Berger et al., 2013, 2017; Berger, 2018). Su efectividad ha sido confirmada en experimentos tanto de invernadero como de campo, destacando su potencial en diversos sistemas de cultivo (Anexo 3). Sin embargo, los mecanismos genéticos responsables de sus actividades promotoras del crecimiento aún son poco comprendidos (Francisco Quintas-Nunes et al., 2022) (Anexo 2).

Citrobacter freundii

Citrobacter freundii, un bacilo Gram-negativo de la familia *Enterobacteriaceae*, es motil, entérico y anaerobio facultativo, y se encuentra en diversos ambientes (Wang et al. 2000) (Anexo 1). Se ha reportado su presencia como endófito en vainilla (*Vanilla planifolia*) (Hernández, 2014), cebada (*Hordeum vulgare*) (Reparaz, 2018), maíz (*Zea mays*) (Fadiji et al. 2023), arroz (*Oryza sativa*) (Olayemi & Odedara, 2017) y tomate (*Lycopersicum esculentum*) (Anexos 1).

C. freundii promueve el crecimiento vegetal mediante la producción de ácido indol-3-acético, sideróforos, amoníaco y la solubilización de fosfatos (De Almeida Lopes et al., 2015; Susilowatiab et al., 2015). Además, exhibe actividad antagonista contra *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* (Olayemi & Odedara, 2017) (Anexo 2). En plántulas de vainilla, mejora la concentración de hierro y clorofila en comparación con el testigo (Hernández et al., 2014) (Anexo 3). Cabe destacar que, a pesar de sus efectos beneficiosos en el crecimiento vegetal, *C. freundii* es también un patógeno oportunista en humanos y animales, causando infecciones (Badger et al., 1999)

Priestia megaterium

Priestia megaterium, antes denominada *Bacillus megaterium* (Gupta et al., 2020), es un bacilo Gram-positivo aislado de cultivos como maíz (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*) y frijol (*Phaseolus vulgaris*) (Anexo 1). Ha ganado interés por sus beneficios en el crecimiento de plantas, demostrando eficacia en especies como *Arabidopsis thaliana*, así como en cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*) y té (*Camellia sinensis*) (Anexo 3).

Este microorganismo promueve el crecimiento vegetal a través de varias vías, como la fijación de nitrógeno reducido (Ding et al. 2005; Liu et al. 2006) y la solubilización de fosfato (Hu et al. 2013). También sintetiza auxinas, como el ácido indol-3-acético (AIA), y en *Arabidopsis thaliana* ha demostrado incrementar los niveles de ácido abscísico (ABA), lo que mejora la tolerancia al estrés hídrico (Zhou et al. 2016). Además, produce sideróforos, que inhiben patógenos como *Fomes lamoensis*. Debido a estas propiedades, se ha incorporado comercialmente en fertilizantes (Wang et al. 2009) (Anexo 2).

Experimentos de promoción del crecimiento vegetal

Se llevaron a cabo ensayos de promoción del crecimiento vegetal, con cuatro bacterias: *Neobacillus drentensis*, *Kosakonia radicincitans*, *Citrobacter freundii* y *Priestia megaterium*, en tres especies de árboles nativos: *B. salicifolius*, *E. crista-galli* y *N. affinis*.

Para cada una de las especies de árboles se realizó un diseño experimental completamente aleatorizado (DCA) con submuestreo. Se realizaron cuatro tratamientos experimentales: tres con bacterias endófitas provenientes de árboles de diferentes familias botánicas: *N. drentensis* (Myrtaceae), *K. radicincitans* (Fabaceae), y *C. freundii* y *P. megaterium*, (Lauraceae) y además de un tratamiento control sin aplicación de inoculantes (Tabla 3).

Cada tratamiento se llevó a cabo en 13 unidades experimentales, cada una correspondiente a una réplica. En cada unidad, se incluyó un número variable de semillas según su tamaño, considerando a cada semilla como una subunidad experimental. Fueron tres semillas en la especie *E. crista-galli*, cuatro de *N. affinis* y seis semillas de *B. salicifolius*.

Tabla 3. Tratamientos de inoculación: las bacterias inoculadas con la familia botánica de su hospedador (Myrtaceae, Fabaceae, y Lauraceae) y las especies arbóreas expuestas a la inoculación (*B. salicifolius*, *E. crista-galli*, y *N. affinis*).

Tratamiento	Bacterias inoculantes	Especies nativas inoculadas
1	Control (sin inoculación)	<i>Blepharocalyx salicifolius</i> - Myrtaceae <i>Erythrina crista-galli</i> - Fabaceae <i>Neltuma affinis</i> - Fabaceae
2	Myrtaceae: <i>Neobacillus drentensis</i>	<i>Blepharocalyx salicifolius</i> - Myrtaceae <i>Erythrina crista-galli</i> - Fabaceae <i>Neltuma affinis</i> - Fabaceae
3	Fabaceae: <i>Kosakonia radicincitans</i>	<i>Blepharocalyx salicifolius</i> - Myrtaceae <i>Erythrina crista-galli</i> - Fabaceae <i>Neltuma affinis</i> - Fabaceae
4	Lauraceae: <i>Citrobacter freundii</i>	<i>Blepharocalyx salicifolius</i> - Myrtaceae <i>Erythrina crista-galli</i> - Fabaceae <i>Neltuma affinis</i> - Fabaceae
	<i>Priestia megaterium</i>	<i>Blepharocalyx salicifolius</i> - Myrtaceae <i>Erythrina crista-galli</i> - Fabaceae <i>Neltuma affinis</i> - Fabaceae

Material vegetal

Los frutos frescos fueron colectados en el campo y trasladados al laboratorio, donde se almacenaron en bolsas de papel hasta su procesamiento, 1-2 días después de la recolección. Las semillas se limpiaron y se secaron al aire, a la sombra. Posteriormente, se caracterizó un lote de semillas para cada especie, seleccionando aquellas que presentaban características morfológicas homogéneas.

Se seleccionaron 50 semillas por lote para medir su biomasa (g), largo y ancho, y luego se almacenaron en bolsas de papel a 4°C y 40% de humedad relativa en la oscuridad. La viabilidad de las semillas se evaluó mediante tinción con tetrazolio (TZ) en tres réplicas de 15 semillas, siguiendo el protocolo de Castro et al. (1994) y aplicando las condiciones

específicas detalladas en la Tabla 4. Posteriormente, cada semilla fue diseccionada longitudinalmente y el embrión fue observado bajo lupa binocular, según Maldonado (2014).

Tabla 4. Condiciones de pretratamiento y test de tetrazolio (TZ) aplicados a las semillas de tres especies arbóreas: *B. salicifolius*, *E.crista-galli* y *N.affinis*. Se especifican los métodos de escarificación, el tiempo de imbibición y las condiciones del test de tetrazolio (1%, 24 h, 30°C en oscuridad).

Especie	Pretratamiento		Tetrazolio
	Escarificación	Imbibición (h)	Condiciones
<i>B. salicifolius</i>	Sin escarificación	24	1,0 %, TZ-24 h, 30°C oscuridad
<i>E. crista-galli</i>	Mecánica, con lija.	48	1,0 %, TZ-24 h, 30°C oscuridad
<i>N. affinis</i>	Mecánica, con lija.	48	1,0 %, TZ-24 h, 30°C oscuridad

Todos los ensayos se realizaron entre 4 y 8 días después de la colecta de las semillas. Las semillas se esterilizaron superficialmente con hipoclorito de sodio (4%) en agitación constante (150 rpm), y se realizaron diez enjuagues con agua destilada estéril. El tiempo de esterilización varió según las características de las semillas de cada especie, siendo de 15 minutos para *E. crista-galli* y *N. affinis*, y 5 minutos para *B. salicifolius*. Como control de la esterilización superficial de las semillas se realizó una huella de la semilla en un medio rico. Posterior a la esterilización, en el caso de las semillas con tegumento duro de *E. crista-galli* y *N. affinis*, se implementó escarificación mecánica como tratamiento pre-germinativo, mediante el uso de una lija esterilizada.

Preparación del inóculo bacteriano

Se recolectaron cepas en medio líquido Tryptone Yeast Agar (TY) (Beringer 1974), a 150 rpm y 28°C durante 2 días. Después, las células fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue desechado y las células fueron lavadas con solución de NaCl estéril al 0,85%. Las suspensiones celulares se ajustaron para que la densidad óptica (OD) a 620 nm fuera de 0,65, lo que se estima que corresponde a una densidad celular aproximada de 1×10^7 células/ml. Esta estimación fue confirmada mediante recuentos en placa para cada bacteria.

Diseño experimental

La inoculación se realizó en unidades experimentales las cuáles consisten en cajas esterilizables en autoclave y reutilizable (Magenta GA – 7), diseñadas para llevar a cabo la inoculación de microorganismos en medios de cultivo, denominadas a continuación como *magentas* (Figura 2). Las magentas se encuentran fragmentadas en tres compartimentos, con diferentes funciones. En el primer compartimento desde abajo se encuentra agua destilada, conectado mediante un cordón capilar al segundo compartimento que contiene un sustrato estéril compuesto por una mezcla de arena y perlita en una proporción 1:1. El tercer compartimento posee la función de cúpula,

permitiendo el crecimiento de las plantas en condiciones de esterilidad y las condiciones lumínicas proporcionadas. Se inocularon grupos de semillas organizadas en 13 magentas, aplicando 3 ml de cada uno de los cuatro tratamientos de inoculación. Además, se incluyó un control sin inoculación, al que se le añadieron 3 ml de suero fisiológico (0,85%). Las magentas se incubaron en ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, a una temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 2$ y una humedad del 40 ± 6 %. Durante el experimento solo se proporcionó agua (no se adicionaron nutrientes). El experimento se realizó en las instalaciones del Centro de Investigaciones Nucleares (CIN) de la Facultad de Ciencias, UdelaR, en Montevideo.

Se realizó un seguimiento periódico cada 2 o 3 días para verificar las condiciones y contar las semillas germinadas. La duración del seguimiento del crecimiento de las plántulas varió según la especie nativa, principalmente debido al tipo de desarrollo característico de cada especie (rápido o lento). Al finalizar cada ensayo se evaluó la viabilidad de las semillas no germinadas mediante un test de tetrazolio.

VARIABLES ANALIZADAS

VARIABLES DE GERMINACIÓN

Para cada ensayo se realizaron los siguientes índices germinativos: proporción de germinación final (Gf), la velocidad de germinación (Vg) (1), y el tiempo medio de germinación (MGT) (2). Siendo,

$$Vg = \frac{\sum_{i=1}^k n_i * 100}{\sum_{i=1}^k n_i t_i} \quad (1),$$

$$MGT = \frac{\sum_{i=1}^k n_i t_i}{\sum_{i=1}^k n_i} \quad (2),$$

donde n_i es el número de semillas germinadas en el tiempo i , t_i es el tiempo desde el inicio del experimento de la i -ésima observación, y k es el tiempo de la última germinación.

VARIABLES DE PLÁNTULAS

Para cada una de las plántulas se obtuvo la masa fresca de cada sección (cotiledón, raíz, tallo y hojas). También se obtuvo el área foliar (mm^2) representando la lámina foliar proyectada estimada sin peciolo. Para este propósito, se utilizó un escáner (Escáner Lide 300) y las imágenes resultantes se procesaron en el software especializado ImageJ (Schneider et al. 2012), donde se las convirtió a un formato binario blanco y negro de 8 bits. Posteriormente, se determinó la biomasa seca de las distintas secciones de cada planta, utilizando una estufa a 25°C durante 10 días.

Se calculó la relación de biomasa entre la parte aérea (hojas y tallos) y la parte subterránea (raíces). Los cotiledones se categorizaron según su tipo: las especies epígeas, como *B. salicifolius*, se consideraron "aéreas", y las especies hipógeas, como *E. crista-galli*, se consideraron "subterráneas".

Análisis de datos

Variables de germinación

Para las variables de germinación: Gf (germinación final), MGT (tiempo medio de germinación) y Vg (velocidad de germinación), se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis, una prueba no paramétrica, para evaluar si existían diferencias significativas entre los tratamientos y el control. En caso de encontrar diferencias estadísticamente significativas, se realizó una prueba post hoc de comparaciones múltiples de Dunn entre los tratamientos y el control ($p < 0.05$), utilizando el paquete "dunn.test" (R Core Team, 2024).

Variables de plántulas

Para cada una de las "variables de plántulas", se realizó una selección de modelos. Para cada variable, se ajustaron y evaluaron dos tipos de modelos: un modelo lineal generalizado (GLM) y un modelo lineal mixto (LMM), utilizando el software estadístico "R" y los paquetes "glm" y "lme4", respectivamente (R Core Team, 2024). En el GLM, se consideró la relación entre la variable de interés y el tratamiento, mientras que en el LMM se incluyó un término de aleatoriedad para las réplicas dentro de cada tratamiento. Siendo,

```
GLM <- glm("variable_plantula" ~ Trat, data = df_mtot)
```

```
LMM <- lmer("variable_plantula" ~ Trat + (1 | Tratrep), data = df_mtot)
```

La elección del modelo se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) en conjunto con la prueba de chi-cuadrado. Adicionalmente, se tomaron en cuenta los criterios de información AIC (Criterio de Información de Akaike) y BIC (Criterio de Información Bayesiana) para evaluar y contrastar la adecuación de los modelos propuestos.

En el modelo seleccionado, se validaron los supuestos de normalidad de los residuos, entre ellos con un histograma de normalidad de los datos agrupados por tratamiento y el test de Shapiro-Wilk para cada tratamiento utilizando el paquete, "dplyr" (R Core Team, 2022). Posteriormente se utilizó el paquete "lsmeans" (R Core Team, 2022) para realizar un análisis ANOVA y contrastes ortogonales con la prueba de Tukey en términos de medias ajustadas, con el propósito de examinar las diferencias entre los tratamientos.

RESULTADOS

Calidad de las semillas

El lote de semillas de las tres especies presentó la máxima viabilidad inicial según el test de tetrazolio. Al finalizar los ensayos todas las especies mostraron una viabilidad alta ($< 0,95$) (Anexo 4; 5). Durante el experimento, se descartaron tres semillas de *E. crista-galli* dada la descomposición por hongos.

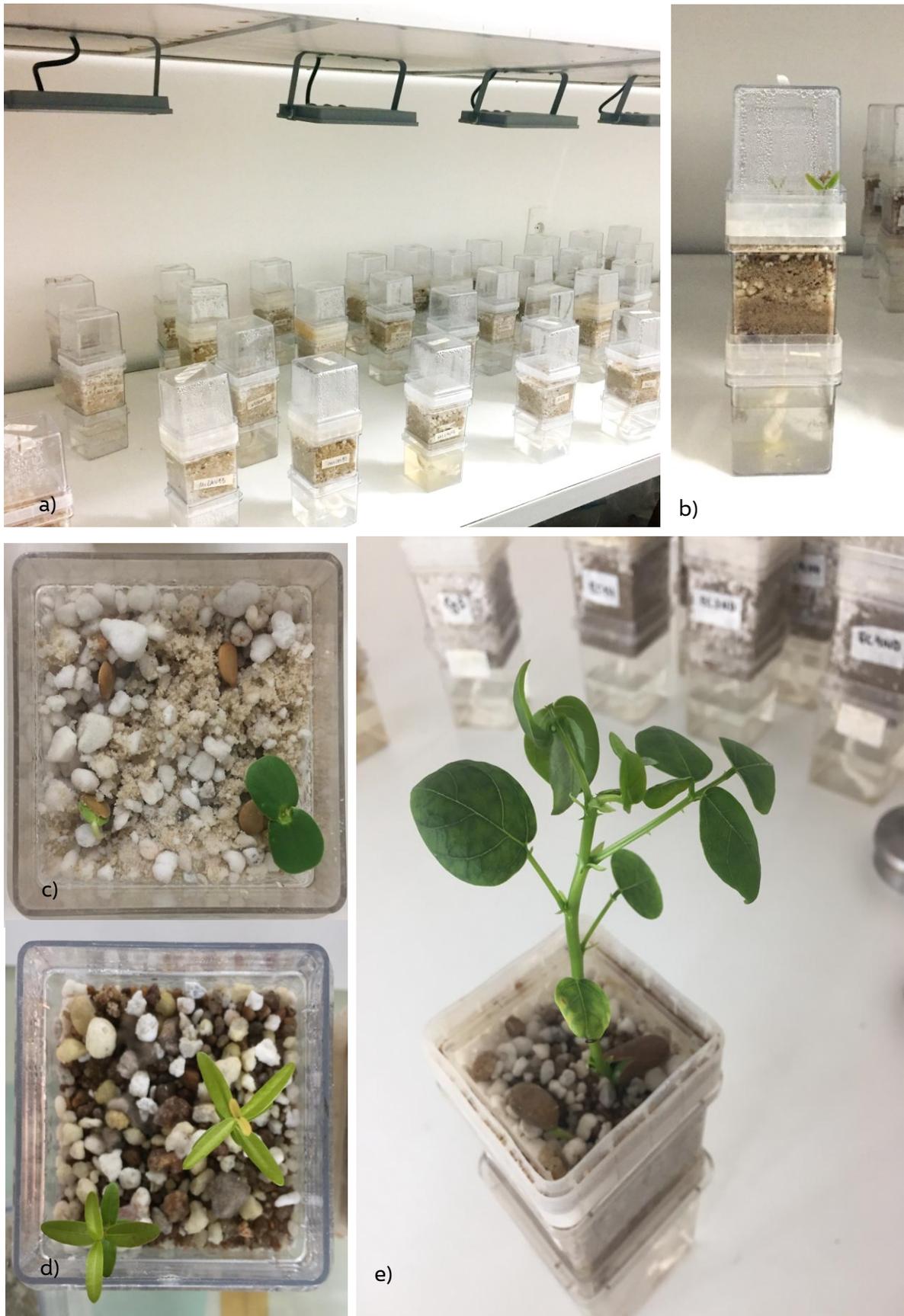


Figura 2. Condiciones experimentales iniciales y disposición de los individuos en la unidad experimental. a) Cámara con condiciones estériles, humedad y temperaturas controladas; b) Unidad experimental. c) Plántulas y semillas de *N. affinis*; d) Plántulas de *B. salicifolius*; e) Plántula de *E. crista-galli* con el tamaño máximo alcanzado en la unidad experimental.

Variables de germinación

Hubo diferencias entre los tratamientos de inoculación sobre la germinación para las especies nativas *B. salicifolius*, *E. crista-galli* y *N. affinis* (Tabla 5; Figura 3).

En *B. salicifolius*, la proporción de germinación (Gf) no mostró diferencias significativas según Kruskal-Wallis ($\chi^2 = 3.1867$, $p = 0.36$). Para MGT, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ($\chi^2 = 10.392$, $p = 0.01551$).

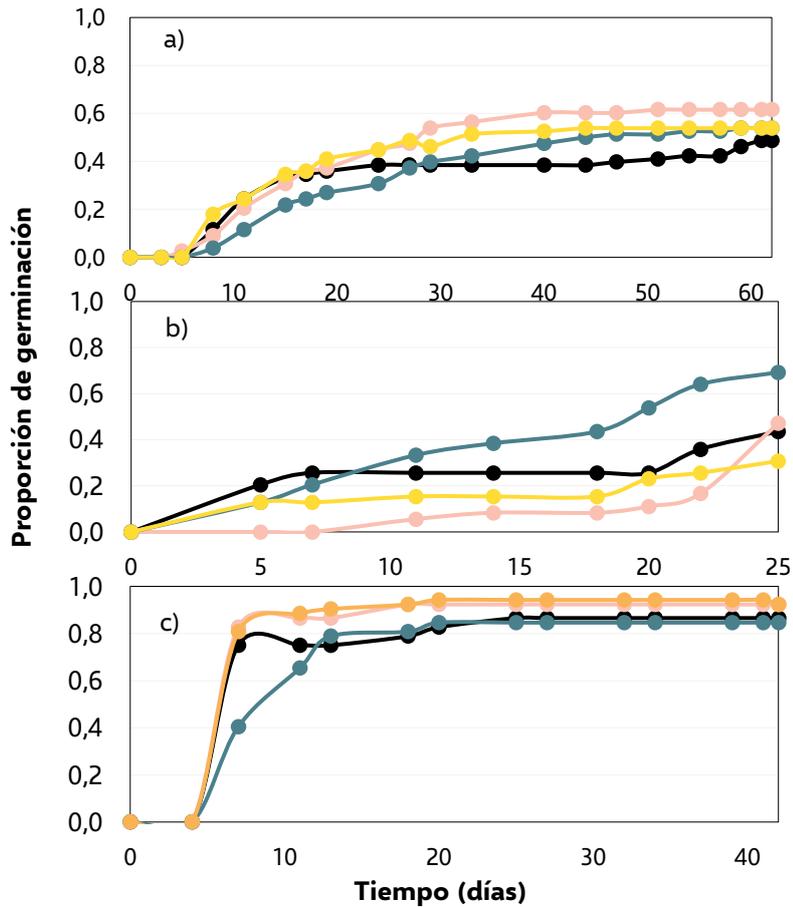
Posteriormente, las comparaciones post hoc con Dunn mostraron diferencias significativas entre Control y *K. radicinans*, con $Z = -2.672$ y $p = 0.0373$. La velocidad de la germinación (VG), mostró diferencias significativas entre tratamientos ($\chi^2 = 10.392$, $p = 0.01551$) y las comparaciones post hoc identificaron diferencias significativas entre el Control y *K. radicinans*, con p ajustado de 0.004 (Anexos 6;7).

En *E. crista-galli*, se detectaron diferencias significativas en la Gf de las semillas entre los tratamientos ($\chi^2 = 9.478$, $p = 0.0236$). Las comparaciones post hoc con Dunn revelaron diferencias significativas entre el control y *K. radicinans* en Gf, con $Z = -2.230$ y $p = 0.013$. También hay diferencias en MGT ($\chi^2 = 11.64$, $p = 0.009$), y las comparaciones post hoc mostraron diferencias significativas entre el control y el *K. radicinans*, con $Z = -2.363$ y $p = 0.009$. En cuanto a VG, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos según Kruskal-Wallis ($\chi^2 = 5.362$, $p = 0.15$) (Anexos 6;7).

En *N. affinis*, la prueba de Kruskal-Wallis no mostró diferencias significativas en Gf ($\chi^2 = 2.5549$, $p = 0.4654$), pero sí para MGT y VG ($\chi^2 = 10.929$, $p = 0.012$). Para ambas variables en las comparaciones post hoc con Dunn, se observaron diferencias significativas entre el control y el tratamiento con *K. radicinans*, siendo en $Z = -1.755$ y $p = 0.040$ (Anexos 6;7). Para las tres especies de árboles inoculadas (*B. salicifolius*, *E. crista-galli* y *N. affinis*), la inoculación con las especies extraídas de *Nectandra angustifolia* (Lauraceae), *C. freundii* y *P. megaterium* no mostró efectos significativos en las variables de germinación evaluadas.

Tabla 5. Promedio y desvío estándar de las variables germinativas Gf (proporción de germinación final), Vg (velocidad de germinación) y MGT (tiempo medio de germinación) en los tratamientos Control (sin inoculación), *N. drentensis*, *K. radicinans*, *C. freundii* y *P. megaterium* para las especies arbóreas nativas *B. salicifolius*, *E. crista-galli* y *N. affinis*. Las diferencias significativas respecto al Control ($p < 0.05$), determinadas mediante pruebas post hoc de Dunn, marcadas con un asterisco (*).

Especie	Tratamientos	Gf	MGT	Vg
<i>B. salicifolius</i>	Control	0.47 ±0.15	34.6±2.16	2.90±0.18
	<i>N. drentensis</i>	0.62±0.20 *	34.6±3.18	2.91±0.26
	<i>K. radicinans</i>	0.54±0.18	39.0±5.25 *	2.60±0.31 *
	<i>C. freundii</i>	0.54±0.18	34.4±2.89	2.92±0.25
<i>E. crista-galli</i>	Control	0.41±0.364	10.8±3.06	3.65±2.97
	<i>N. drentensis</i>	0.47±0.30	12.4±2.33	3.12±1.53
	<i>K. radicinans</i>	0.75±0.36 *	12.9±2.11 *	5.11±1.82
	<i>C. freundii</i>	0.31±0.32	10.1±2.91	3.44±3.00
<i>N. affinis</i>	Control	0.865 ±0.165	21.3±1.48	4.70±0.297
	<i>N. drentensis</i>	0.923±0.120	20.7±0.463	4.84±0.106
	<i>K. radicinans</i>	0.846±0.163	21.7±1.07 *	4.62±0.215 *
	<i>P. megaterium</i>	0.923±0.120	20.7±0.68	4.83±0.155



● Control ● *N. drentensis* ● *K. radicincitans* ● *C. freundii* ● *P. megaterium*

Figura 3. Proporción de germinación a lo largo del tiempo (días) en los tratamientos experimentales: control (sin inoculación), *N. drentensis*, *K. radicincitans*, *C. freundii* y *P. megaterium* para las especies arbóreas nativas (a) *B. salicifolius*, (b) *E. crista-galli* y (c) *N. affinis*.

Variables de plántulas

En el caso de *E. crista-galli*, especie de crecimiento rápido, las plántulas alcanzaron el máximo crecimiento permitido por la magenta, que correspondió a 25 días. En cambio, para *B. salicifolius* y *N. affinis*, especies de crecimiento lento, el experimento duro 62 y 42 días respectivamente (Figura 4; Anexos 10).

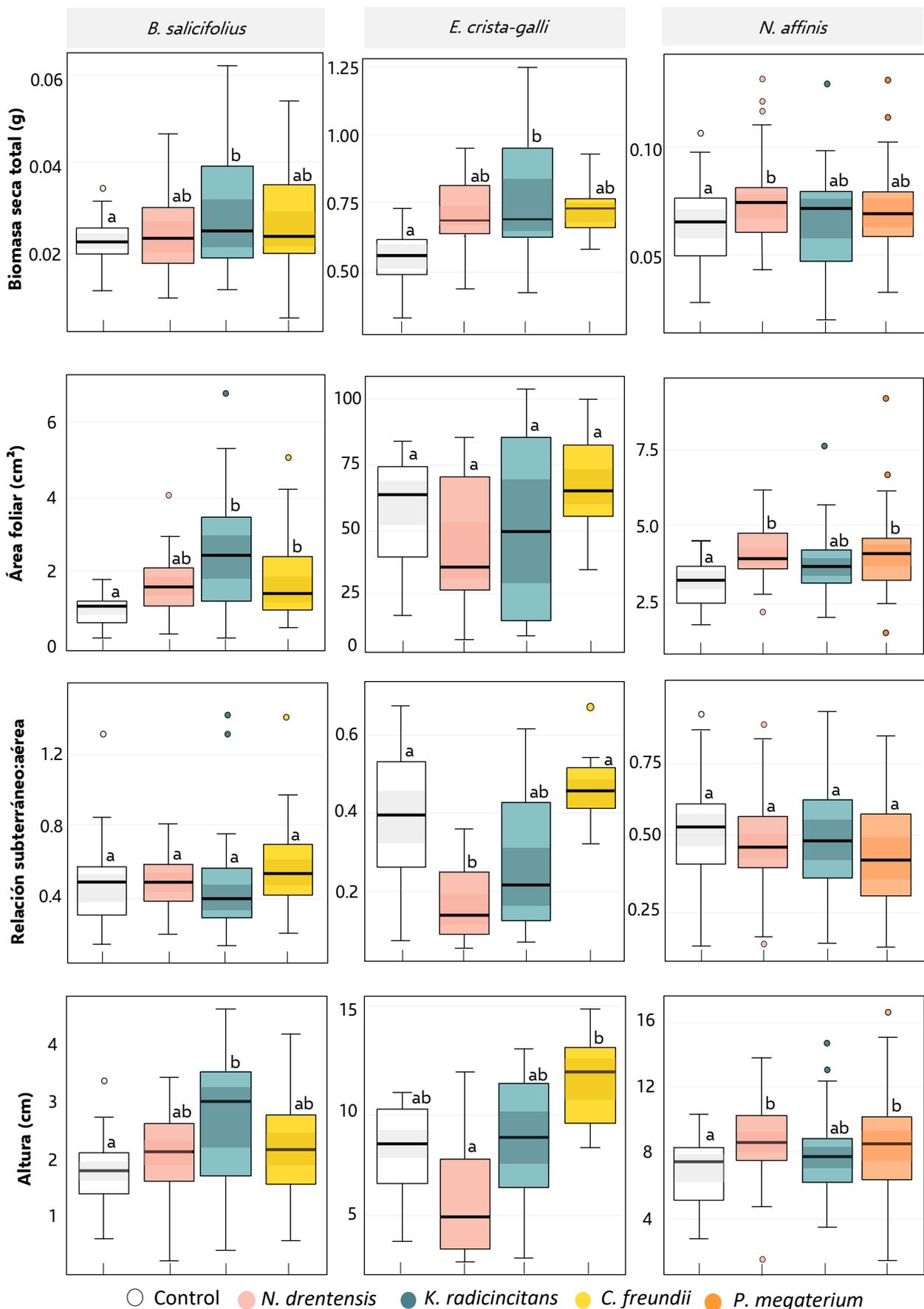


Figura 4. Distribución de datos mediante diagramas de cajas para las especies *B. salicifolius*, *E. crista-galli* y *N. affinis* con los tratamientos: control (sin inoculación), *N. drentensis*, *K. radincitans*, *C. freundii* y *P. megaterium*, en relación con las variables: Biomasa seca total (g), Área foliar (cm²), Relación subterráneo:área y Altura (cm). Cada caja refleja la variabilidad inter-cuartil entre los datos, con la mediana representada por una línea continua. Las letras representan los grupos según las diferencias significativas entre los tratamientos en la prueba de Tukey.

Biomasa seca total

En *B. salicifolius*, se observaron diferencias significativas en la biomasa seca total, siendo el tratamiento con *K. radicincitans* el que presentó una biomasa significativamente mayor en comparación con el control ($p = 0,004$). En *E. crista-galli*, la biomasa seca total fue significativamente mayor en el tratamiento con *K. radicincitans* ($p = 0,002$, g.l. = 42), sin diferencias significativas con *N. drentensis* ni *C. freundii*. En *N. affinis*, *N. drentensis* incrementó significativamente la biomasa ($p = 0,010$, g.l. = 180), mientras que *K. radicincitans* y *P. megaterium* no mostraron diferencias significativas.

Área foliar

En *B. salicifolius*, el tratamiento con *K. radicincitans* aumentó significativamente el área foliar ($p = 0,003$, g.l. = 50). *N. drentensis* también mostró un aumento significativo en comparación con el control ($p = 0,043$), aunque menor que el de *K. radicincitans*. En *E. crista-galli*, el tratamiento con *C. freundii* resultó en un incremento significativo del área foliar ($p = 0,023$, g.l. = 43) respecto al control. En *N. affinis*, tanto *N. drentensis* ($p = 0,001$) como *P. megaterium* ($p = 0,002$) incrementaron significativamente el área foliar, mientras que *K. radicincitans* mostró un incremento menos pronunciado ($p = 0,020$).

Relación subterráneo:aérea

En *E. crista-galli*, se encontraron diferencias significativas en relación con el control, con *N. drentensis* mostrando la menor relación subterránea/aérea ($p = 0,010$, g.l. = 43). En cambio, para *B. salicifolius* y *N. affinis*, no se observaron diferencias significativas entre ningún tratamiento y el control.

Altura

En *B. salicifolius*, el tratamiento con *K. radicincitans* resultó en una altura significativamente mayor ($p = 0,007$, g.l. = 47), mientras que *C. freundii* y *N. drentensis* no mostraron diferencias significativas. En *E. crista-galli*, *C. freundii* presentó la mayor altura ($p = 0,023$, g.l. = 43). En *N. affinis*, tanto *N. drentensis* ($p = 0,001$) como *P. megaterium* ($p = 0,002$) resultaron en alturas significativamente mayores, con *K. radicincitans* mostrando un incremento menos significativo ($p = 0,057$).

Discusión

La interacción planta-microbioma, y en particular el estudio del microbioma de las semillas representa una frontera en la investigación en la ecología de los bosques. Aunque este microbioma es fundamental para las primeras fases de la regeneración, ya que puede influir directamente en procesos cruciales como la germinación y el crecimiento inicial, sigue siendo un área poco explorada. Comprender cómo las bacterias endófitas nativas interactúan en las primeras fases de la regeneración de las plantas, podría revelar estrategias esenciales para el establecimiento de las plantas en nuevos ambientes, transformando nuestro enfoque sobre la restauración y conservación de los ecosistemas forestales.

Este estudio examina los efectos de la inoculación en las etapas iniciales de árboles nativos, utilizando bacterias endófitas extraídas de semillas de plantas hospedantes con distintos orígenes taxonómicos y geográficos. La combinación de las especies de plantas hospedantes y su ubicación geográfica influye de manera significativa en la diversidad del microbioma de la endosfera vegetal (Vaz Jauri et al. 2023). Los resultados resaltan que: *i*) las bacterias endófitas nativas inoculadas tuvieron varios efectos tanto en las variables de germinación como en el crecimiento de las plántulas, y *ii*) los efectos de la inoculación variaron según la combinación de bacteria y especie de árbol. Estos resultados sugieren el potencial efecto de las bacterias endófitas en las etapas de las primeras fases de la regeneración y resalta la complejidad de las interacciones entre bacterias y plantas. Esto plantea muchas preguntas y abre nuevos caminos para futuros estudios en la biología de microorganismos asociados con las plantas nativas y la ecología de plántulas en bosques de Uruguay.

Efectos de bacterias endófitas sobre la germinación y el crecimiento de las plántulas.

Los efectos de las bacterias sobre la germinación de semillas variaron notablemente entre las especies estudiadas, mostrando patrones de promoción, retardo o neutralidad en comparación con los controles. *K. radicincitans* destacó por su capacidad para promover la germinación en *E. crista-galli* y *B. salicifolius*, aumentando la tasa de germinación. Sin embargo, en las tres especies, *B. salicifolius*, *E. crista-galli* y *N. affinis*, la bacteria *K. radicincitans* mostró efectos retardantes, aumentando el tiempo de germinación (MGT) y reduciendo la velocidad de germinación, indicando un impacto negativo en la eficiencia del proceso de germinación. Esta dualidad en el efecto de *K. radicincitans* podría deberse a una combinación de factores biológicos y ecológicos de cada especie arbórea. Aunque *K. radicincitans* ha sido identificada previamente como promotora del crecimiento en ciertos cultivos, no se han registrado estudios que evalúen su impacto específico en la germinación de semillas (Anexo 3). Este hallazgo sugiere la necesidad de profundizar en el conocimiento sobre *K. radicincitans* y su impacto en la germinación de semillas. Aunque existen numerosos datos sobre las características de las cepas y su rol como promotora del crecimiento, es crucial investigar los mecanismos subyacentes que explican estos efectos divergentes. Entender estos mecanismos permitirá una evaluación más completa de cómo *K. radicincitans* influye en la germinación y en el desarrollo de las plántulas.

Las variables de crecimiento de las plántulas presentaron respuestas diferenciadas en función de los distintos inoculantes utilizados. Por un lado, *K. radicincitans* promovió incrementos en la biomasa seca total, altura y área foliar en *B. salicifolius* y en la biomasa seca total en *E. crista-galli*. Sin embargo, su efecto en *N. affinis* fue nulo. *K. radicincitans* es considerada una bacteria promotora del crecimiento vegetal, esta bacteria combinó varias características las cuales podrían aumentar el crecimiento, por ejemplo, actividad de pectinasas y antagonismo de *Fusarium graminearum* (Vaz Jauri et al. 2023), eficiencia diazotrófica (Ruppel & Merbach, 1995; Sun et al. 2018), solubilización de fosfatos (Schilling et al. 1998), y producción de sideróforos (Bergottini et al. 2015). Sus estudios son amplios y han demostrado su capacidad para promover variables del crecimiento de las plántulas de las familias Poaceae (Berger, 2018; Taulé et al. 2016, 2019). Solanaceae (Berger et al. 2013, 2017), Cucurbitaceae (Sun et al. 2018). y Brassicaceae (Ruppel et al. 2006; Berger et al. 2015; Krey et al. 2011; Brock et al. 2013), con experimentos de invernadero y en campo (Anexos 3). Dadas las características promotoras de *K. radicincitans*, aislada de *Gleditsia amorphoides* (Fabaceae), surgen varias preguntas, entre ellas, resulta particularmente interesante comprender por qué no tuvo efectos en la inoculación con *N. affinis* (Fabaceae). De manera similar, *N. drentensis*, extraída de *Eugenia uruguayensis* (Myrtaceae) mejoró la biomasa aérea en *E. crista-galli* y el crecimiento integral en *N. affinis*, pero no mostró efectos en *B. salicifolius* (Myrtaceae).

Las cepas extraídas de la familia Lauraceae, *C. freundii* y *P. megaterium*, demostraron efectos en dos variables del crecimiento de las plantas: altura y área foliar. *C. freundii* aumentó el área foliar en *B. salicifolius* y la altura en *E. crista-galli*, mientras que *P. megaterium* promovió el crecimiento en altura y área foliar en *N. affinis*. Estos efectos limitados sugieren que las bacterias pueden tener un impacto focalizado en el crecimiento de las plantas, dependiendo de la especie y las condiciones experimentales. Es interesante seguir estudiando si estos efectos son específicos para las especies estudiadas o si se extienden a otras. Además, entender los mecanismos detrás de esta promoción del crecimiento podría proporcionar información clave sobre cómo estas bacterias influyen en el desarrollo de las plantas.

En los últimos años, ha crecido significativamente nuestro conocimiento sobre la microbioma vegetal y su funcionalidad en la planta huésped. Sin embargo, se necesita una mejor comprensión de cómo los inoculantes modulan el microbioma residente, cómo la microbiota compleja y el holobionte afectan la actividad de la cepa aplicada y cómo los inoculantes microbianos colonizan el entorno vegetal en el campo (Compant 2019).

Otro resultado interesante es que los efectos de las bacterias en las plantas pueden no manifestarse en la fase de germinación, sino en etapas posteriores del desarrollo o al revés como es el caso de *B. salicifolius* en que tuvo efecto con *N. drentensis* en germinación, pero no en desarrollo. Estos hallazgos subrayan la importancia de considerar tanto la germinación como el crecimiento en estudios de inoculación para evaluar el impacto de los inoculantes sobre la fase inicial del ciclo de vida del árbol.

Una pregunta que surge de este estudio es si existen afinidades o procesos coevolutivos entre las especies de árboles nativos y las bacterias endófitas nativas (ver Anexo de 2 y 3). En este estudio, se seleccionaron bacterias endófitas nativas aisladas de tres familias de árboles hospedantes. Los géneros *Citrobacter* y *Kosakonia*, ambos de la familia Enterobacteriaceae, fueron aislados de árboles de las familias botánicas *Nectandra angustifolia* (Lauraceae) y *Gleditsia amorphoides* (Fabaceae), respectivamente. De manera similar, *Priestia* y *Neobacillus*, de la familia Bacillaceae, fueron aisladas de *Nectandra angustifolia* (Lauraceae) y *Eugenia uruguayensis* (Myrtaceae).

Es especialmente interesante que Fabaceae y Myrtaceae estén filogenéticamente distantes de Lauraceae, lo que subraya la capacidad de bacterias de la misma familia para colonizar especies de familias botánicas tan divergentes. Además, las cepas de Lauraceae fueron recolectadas en el mismo sitio, pero pertenecen a familias bacterianas diferentes, Bacillaceae y Enterobacteriaceae (datos no publicados, de LMS). La evidencia sugiere que estas bacterias, reportadas en numerosos sitios y en distintas plantas (Anexo 1), pueden formar asociaciones con diversas especies vegetales. Comprender estos mecanismos y patrones de colonización puede proporcionar información valiosa sobre su rol en los ecosistemas.

Aspectos metodológicos

i) Efecto de la inoculación

En este estudio se emplearon unidades experimentales estériles con condiciones controladas, y se midieron variables desde la germinación hasta el desarrollo de la plántula, considerando tanto el crecimiento lento como el rápido (Lewis et al. 2000). La esterilización superficial de las semillas y la aplicación del inoculante antes de la germinación mejoraron la competencia de las bacterias endófitas frente a los microorganismos del microbioma de la semilla en la espermosfera durante la germinación. En *E. crista-galli* se observaron hifas de hongos en las semillas al inicio de la aparición de la radícula, lo que destaca la presencia de una comunidad microbiana compuesta por hongos.

El conocimiento del microbioma de las semillas nativas es fundamental, ya que influye en la colonización y el comportamiento de las bacterias inoculadas. Los efectos de la inoculación no dependen solo de las funciones individuales de cada cepa, sino también de las interacciones comunitarias, las cuales pueden verse influenciadas por efectos de prioridad (Debray et al. 2022). Estos efectos, derivados del orden de llegada de los microorganismos al huésped, pueden alterar significativamente tanto la dinámica de colonización como las respuestas microbianas del mismo. Los microorganismos que llegan más tarde se enfrentan a un entorno previamente moldeado por especies que llegaron antes, lo que incluye el uso de nutrientes y la modulación de las respuestas inmunitarias o de defensa del huésped (Bashey et al. 2013).

ii) Selección de especies

En relación con las especies inoculadas, se utilizó *C. freundii* para evaluar sus efectos en dos especies arbóreas. Sin embargo, se ha decidido excluir esta bacteria endófitica, en el siguiente experimento debido a que la literatura indica que *C. freundii* no es adecuada para la salud humana. En su lugar, se ha optado por utilizar *P. megaterium*, la cual también tiene su origen en *Nectandra angustifolia* (Lauraceae). Esta medida asegura la conformidad con los estándares de seguridad y promueve el uso de alternativas más adecuadas en investigaciones futuras.

Implicaciones para la biodiversidad, conservación y regeneración de bosques

Las bacterias endófitas de las semillas son miembros fundamentales del microbioma de las plantas nativas, formando parte de la biodiversidad de los ecosistemas boscosos (Fort et al. 2021). Sin embargo, los estudios de inoculación bacteriana endófitas se han centrado principalmente en inocular especies agrícolas con bacterias no nativas, además menos estudios abordan el efecto de las bacterias endófitas en las etapas iniciales de la regeneración de los ecosistemas naturales (Chanway et al. 1997; Nelson, 2018). Actualmente la mayoría de los experimentos de interacción planta-microbio se han llevado a cabo en condiciones de laboratorio o invernadero (Geisen et al. 2017; White et al. 2018) y los experimentos de laboratorio no capturan la complejidad de la interacción semilla-microbioma-planta que existe en entornos naturales (War et al. 2023). Este vacío en la diversidad, interacciones, funciones y mecanismos de las bacterias endófitas revela que los endófitos nativos asociados a árboles representan una fuente subestimada de biodiversidad forestal (Nelson, 2018). En consecuencia, explorar los efectos de la inoculación bacteriana en las etapas iniciales de regeneración vegetal resulta complejo, especialmente su relevancia ecológica dentro de los ecosistemas (Nongkhlaw & Joshi, 2014; Gouda et al. 2016).

Una de las principales amenazas para los bosques ribereños son las especies exóticas invasoras, que suelen tener ventajas durante la fase de germinación y crecimiento de plántulas, lo que les permite colonizar sitios disponibles y competir con las especies nativas. De acuerdo con la hipótesis del mutualismo mejorado, los endófitos u otros microorganismos adquiridos en el área introducida pueden potenciar la competitividad, el crecimiento y la resistencia a enfermedades de las plantas exóticas, facilitando su establecimiento e invasión a largo plazo (Klironomos, 2002; Reinhart & Callaway, 2006; Shearin et al. 2018).

En los bosques ribereños de Uruguay, *Gleditsia triacanthos* es una especie invasora relevante, incluso en áreas protegidas de donde provienen las semillas utilizadas en este estudio. Comprender el microbioma de las semillas de esta especie y cómo influye en su germinación y desarrollo puede ofrecer una mejor comprensión de los mecanismos que permiten a las plantas invasoras mantener su ventaja competitiva sobre las especies nativas.

Los hallazgos de este estudio resaltan la importancia de investigar los microbiomas de las semillas nativas, entre ellos las bacterias endófitas nativas, para comprender mejor sus efectos en la germinación y el crecimiento de especies arbóreas, y para ampliar nuestro conocimiento sobre la ecología del microbioma en los bosques nativos. Además, las

interacciones observadas entre las bacterias endófitas y las especies nativas sugieren que estos microorganismos podrían desempeñar un papel ecológico crucial en el establecimiento y desarrollo de las plantas. Es fundamental profundizar en cómo estos factores y otros elementos ecológicos modulan dichas interacciones en los ecosistemas forestales, así como explorar el potencial de estos conocimientos para diseñar estrategias de conservación y restauración de la biodiversidad.

Conclusiones

Los resultados de este estudio refuerzan que las semillas, consideradas como parte fundamental de los holobiontes vegetales, albergan microbiomas diversos que forman una compleja red de interacciones con funciones importantes en la vida de las plantas. Particularmente las bacterias endófitas nativas presentes en las semillas de árboles nativos pueden desempeñar efectos en la germinación y el crecimiento de la planta interfiriendo en las etapas iniciales del ciclo de vida, al menos de otras especies nativas a través de la inoculación. Estos resultados subrayan la importancia de conocer y gestionar adecuadamente el componente microbiano de las semillas, ya que la interacción con bacterias endófitas puede modificar atributos clave en la germinación y el crecimiento de las plántulas, impactando posteriormente en su regeneración.

K. radicincitans, reconocida por su capacidad como bacteria promotora del crecimiento en cultivos agrícolas, mostró un efecto dual en especies nativas. Si bien favoreció variables relacionadas con la germinación y el crecimiento en algunas especies, también retrasó el proceso de germinación, incluso en un árbol perteneciente a la misma familia botánica de su origen. La evidencia sobre el efecto promotor del crecimiento de esta bacteria se restringe a especies con características distintas a las de los árboles nativos inoculados. Esto se debe a que dichas especies suelen presentar un grado de domesticación y estrategias de vida de crecimiento rápido, como es el caso de Poaceae y otras plantas herbáceas. Esta dualidad sugiere que las interacciones planta-microorganismo dependen de varios factores, entre ellos la microbiota nativa presente en las semillas y también en la estrategia de vida de la planta.

Además, el estudio reveló que *Citrobacter freundii* y *Priestia megaterium*, aunque no tuvieron efectos significativos en la germinación, sí promovieron el crecimiento en ciertas especies, destacando la importancia de evaluar no solo la germinación, sino también las etapas posteriores del desarrollo vegetal.

Aunque cada vez se reconoce más la importancia de los microbiomas en la salud y desarrollo de las plantas, aún contamos con información limitada sobre el microbioma de semillas nativas. La mayoría de la información disponible, especialmente en estudios sobre inoculación, se centra en cultivos agrícolas, siendo semillas diferentes a las nativas en su carga microbiana. Además, la mayoría de los estudios se enfocan en identificar la diversidad microbiana, pero es fundamental también comprender la abundancia de estos microorganismos y cómo influyen en las interacciones con la planta. Este conocimiento más

detallado permitirá entender los procesos de germinación y crecimiento, y mejorar la gestión y conservación de los bosques.

Conclusiones generales y perspectivas futuras

El estudio del microbioma de semillas, en particular las bacterias endófitas, tienen una amplia influencia en la aptitud de las plantas a través de funciones esenciales para su desarrollo y evolución, impactando en el funcionamiento de los ecosistemas. La interacción entre las plantas y sus microorganismos asociados no solo influye en la germinación y el desarrollo temprano, sino también en la capacidad de adaptación a cambios ambientales. Los resultados resaltan 1) las bacterias endófitas nativas inoculadas tuvieron efectos tanto en las variables de germinación como en el crecimiento de las plántulas de árboles nativos del Río Uruguay, 2) los efectos de la inoculación variaron según la combinación de bacteria y especie de árbol. Estos resultados destacan el potencial impacto de las bacterias endófitas en las primeras etapas de la regeneración vegetal y subrayan la complejidad de las interacciones entre bacterias y plantas. Asimismo, plantean interrogantes fundamentales y abren nuevas perspectivas para investigaciones futuras sobre la biología de los microorganismos asociados a plantas nativas y la ecología de plántulas en los bosques de Uruguay.

Dentro de las áreas de investigación clave, emergen:

Ampliar la investigación del microbioma de semillas de plantas nativas: Investigar el microbioma de las semillas nativas es fundamental para comprender cómo las bacterias endófitas asociadas influyen en las primeras fases de la regeneración de plántulas. Estas bacterias poseen diversos mecanismos que impactan la germinación y el crecimiento de las plantas, modulando procesos críticos como la adquisición de nutrientes y la resistencia a patógenos. Un entendimiento detallado de estas interacciones puede revelar cómo las comunidades microbianas afectan la viabilidad y desarrollo de las plántulas desde sus primeras etapas de la regeneración.

Impacto de las interacciones ecológicas: Investigar las interacciones entre dispersores de semillas y polinizadores que estructuran el ensamblaje del microbioma de las semillas nativas puede proporcionar una comprensión más profunda de las dinámicas bacterianas y las redes de interacción en los ecosistemas.

Efectos del almacenamiento en la conservación del microbioma de las semillas: Investigar cómo las condiciones de almacenamiento en bancos de semillas afectan la composición y viabilidad del microbioma asociado es esencial para garantizar la calidad de las semillas a largo plazo. Además, desarrollar protocolos específicos para preservar la integridad microbiana durante el almacenamiento es fundamental para mantener la viabilidad de las semillas.

Integración del microbioma en programas de restauración ecológica: Incluir el conocimiento sobre el microbioma de semillas en los programas de restauración puede mejorar la estabilidad ecológica al preservar las interacciones beneficiosas para los procesos de regeneración.

Microbioma de especies exóticas invasoras: Explorar cómo el microbioma de las semillas de especies exóticas puede influir en su competitividad y capacidad invasiva. Esta investigación puede ofrecer estrategias para controlar la propagación de especies invasoras y mitigar sus efectos en los ecosistemas nativos.

Estos temas destacan áreas cruciales de investigación que tienen el potencial de profundizar nuestra comprensión de la biología de microorganismos asociados con plantas nativas y la ecología de plántulas en los bosques de Uruguay. Ampliar el conocimiento en estos campos puede revelar nuevas dinámicas microbianas y sus roles en la regeneración y desarrollo de plántulas, sino también ofrecer perspectivas innovadoras para la conservación y restauración de ecosistemas. La integración de estas investigaciones puede facilitar estrategias más efectivas para preservar la biodiversidad, abordando desafíos críticos relacionados con la adaptación de las plantas a cambios ambientales y la gestión de especies invasoras.

Bibliografía

- Abdelfattah, A., Tack, A. J. M., Lobato, C., Wassermann, B., & Berg, G. (2023). From seed to seed: The role of microbial inheritance in the assembly of the plant microbiome. *Trends in Microbiology*, 31(4), 346–355. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.10.009>
- Akter, Y., Barua, R., Uddin, N., Muhammad Sanaullah, A. F., & Marzan, L. W. (2022). Bioactive potentiality of secondary metabolites from endophytic bacteria against SARS-COV-2: An in-silico approach. *PLoS ONE*, 17(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269962>
- Alibrandi, P., Cardinale, M., Rahman, M. M., Strati, F., Ciná, P., De Viana, M. L. & Puglia, A. M. (2018). The seed endosphere of *Anadenanthera colubrina* is inhabited by a complex microbiota, including *Methylobacterium* spp. and *Staphylococcus* spp. with potential plant-growth promoting activities. *Plant and Soil*, 422, 81-99.
- Alonso, R., Tiscornia, S., & Bettucci, L. (2011). Fungal endophytes of needles and twigs from *Pinus taeda* and *Pinus elliotti* in Uruguay. *Sydowia*, 63(2), 141-153.
- Alvarez-Clare, S., & Kitajima, K. (2009). Susceptibility of tree seedlings to biotic and abiotic hazards in the understory of a moist tropical forest in Panamá. *Biotropica*, 41(1), 47–56. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2008.00442.x>
- Arturi, M. F., Grau, H. R., Aceñolaza, P. G., & Brown, A. D. (1998). Estructura y sucesión en bosques montanos del Noroeste de Argentina. *Revista de Biología Tropical*, 46(3), 525-532.
- Ayil Chan, G. A. (2023). Efecto de la inoculación de bacterias halófilas sobre el crecimiento vegetal de *Zea mays* bajo condiciones de estrés por salinidad (Tesis, Campeche). *Repositorio Colpos Digital*.
- Badger, J. L., Stins, M. F., & Sik Kim, K. (1999). *Citrobacter freundii* invades and replicates in human brain microvascular endothelial cells. *Infection and Immunity*, 67(8), 4208-4215.
- Barreiro, M., & Renom, M. (2023). Sequía 2020-2023: Análisis y perspectivas para el suroeste de Uruguay. Instituto de Física, Facultad de Ciencias. Informe.
- Bashey, F., Hawlena, H., & Lively, C. M. (2013). Alternative paths to success in a parasite community: Within-host competition can favor higher virulence or direct interference. *Evolution*, 67(3), 900–907. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2012.01825.x>
- Bennadji, Z., & Alfonso, M. (2013). Ficha técnica del algarrobo (*Prosopis affinis* Spreng). En INIA Tacuarembó, Jornada Técnica.
- Berg, G., Grube, M., Schloter, M., & Smalla, K. (2014). Unraveling the plant microbiome: Looking back and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00148>
- Berger, B., Brock, A. K., & Ruppel, S. (2013). Nitrogen supply influences plant growth and transcriptional responses induced by *Enterobacter radicincitans* in *Solanum lycopersicum*. *Plant and Soil*, 370(1–2), 641–652. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1633-0>
- Berger, B., Patz, S., Ruppel, S., Dietel, K., Faetke, S., Junge, H., & Becker, M. (2018). Successful formulation and application of plant growth-promoting *Kosakonia radicincitans* in maize cultivation. *BioMed research international*, 2018(1), 6439481.
- Berger, B., Wiesner, M., Brock, A. K., Schreiner, M., & Ruppel, S. (2015). *K. radicincitans*, a beneficial bacteria that promotes radish growth under field conditions. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(4), 1521–1528. <https://doi.org/10.1007/s13593-015-0324-z>
- Bergottini, V. M., Filippidou, S., Junier, T., Johnson, S., Chain, P. S., Otegui, M. B., Zapata, P. D., & Junier, P. (2016). Genome sequence of *Kosakonia radicincitans* strain YD4, a plant growth-promoting

rhizobacterium isolated from yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.). *Genome Announcements*, 3(2). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00239-15>

Bettucci, L., Simeto, S., Alonso, R., & Lupo, S. (2004). Endophytic fungi of twigs and leaves of three native species of Myrtaceae in Uruguay. *Sydowia*, 56(1), 8-23.

Brady, C., Cleenwerck, I., Venter, S., Coutinho, T., & De Vos, P. (2013). Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(5), 309–319. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.03.005>

Brazeiro, A. (2014). Los bosques de Uruguay y sus servicios ecosistémicos. *Servicios Ecosistémicos*.

Brazeiro, A. (2018). Recientes avances en investigación para la gestión y conservación del bosque nativo de Uruguay. Facultad de Ciencias, MGAP, BMEL. Montevideo, 101 pp.

Brazeiro, A., Achkar, M., Toranza, C., & Bartesaghi, L. (2020). Agricultural expansion in Uruguayan grasslands and priority areas for vertebrate and woody plant conservation. *Ecology & Society*, 25(1).

Brock, A. K., Berger, B., Mewis, I., & Ruppel, S. (2013). Impact of the PGPB *Enterobacter radicincitans* DSM 16656 on Growth, Glucosinolate Profile, and Immune Responses of *Arabidopsis thaliana*. *Microbial Ecology*, 65(3), 661–670. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0146-3>

Brock, A. K., Berger, B., Schreiner, M., Ruppel, S., & Mewis, I. (2018). Plant growth-promoting bacteria *Kosakonia radicincitans* mediate anti-herbivore defense in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 248(6), 1383–1392. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2964-0>

Brussa, C., & Grella, I. (2007). Flora arbórea del Uruguay, con énfasis en las especies de Rivera y Tacuarembó.

Buckley, D. S., Sharik, T. L., & Isebrands, J. G. (1998). Regeneration of northern red oak: Positive and negative effects of competitor removal. *Ecology*, 79(1), 65-77.

Cabrera, A. L., & Willink, A. (1973). Biogeografía de América Latina. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Departamento de Asuntos Científicos, Secretaría General de la OEA.

Cabrera, A. L., & Zardini, E. M. (1979). Manual de La Flora de Los Alrededores de Buenos Al.

Carrillo, F.; García J.; Cabrera, R.; Vásquez, J.; Tuisima, L.; Escobar, H.; Aguirre, O.; Quintana, C. & Amasifuen, C. (2020). Manual técnico para la conservación y propagación de especies de algarrobo (*Prosopis* spp.). *Instituto Nacional de Innovación Agraria*. ISBN: 978-9972-44-067-0

Carvalho, P. E. R. (2006). Species arbóreas brasileiras Volumen 2. Embrapa Informação Tecnológica; Embrapa Florestas. ISBN 85-7383-373-4.

Chakraborty, U., Chakraborty, B., & Basnet, M. (2006). Plant growth promotion and induction of resistance in *Camellia sinensis* by *Bacillus megaterium*. *Journal of Basic Microbiology*, 46(3), 186–195. <https://doi.org/10.1002/jobm.200510050>

Chanway, C. P. (1997). Inoculation of tree roots with plant growth promoting soil bacteria: an emerging technology for reforestation. *Forest Science*, 43(1), 99-112.

Chebataroff, J. (1942). La vegetación del Uruguay y sus relaciones fitogeográficas con la del resto de la América del Sur. *Revista Geográfica*, 2(4/5/6), 49-90.

Chebataroff, J. (1960). Algunos aspectos evolutivos de la vegetación de la Provincia Fitogeográfica Uruguayense. Montevideo. *Apartado de la Revista Nacional No 201*.

Chen, Y., Huang, Z., Li, J., Su, G., & Feng, B. (2020). Complete genome sequence of *Kosakonia radicincitans* GXGL-4A, a nitrogen-fixing bacterium with capability to degrade TEX. *Current Microbiology*, 77, 1848-1857.

Compant, S., Clément, C., & Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(5), 669–678. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>

Compant, S., Samad, A., Faist, H., & Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of advanced research*, 19, 29–37.

Dalling, J. W., Davis, A. S., Arnold, A. E., Sarmiento, C., & Zalamea, P. C. (2020). Extending plant defense theory to seeds. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 51(1), 123–141.

Debray, R., Herbert, R. A., Jaffe, A. L., Crits-Christoph, A., Power, M. E., & Koskella, B. (2022). Priority effects in microbiome assembly. *Nature Reviews Microbiology*, 20(2), 109–121. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00604-w>

De Almeida Lopes, K. B., Carpentieri-Pipolo, V., Oro, T. H., Stefani Pagliosa, E., & Degrassi, G. (2016). Culturable endophytic bacterial communities associated with field-grown soybean. *Journal of Applied Microbiology*, 120(3), 740–755. <https://doi.org/10.1111/jam.13046>

de Mello, L. M., Lemos, R., Marques, A., & Stefenon, V. M. (2019). Ancient and current distributions of *Erythrina crista-galli* L. (Fabaceae) in South America. *Floresta e Ambiente*, 26(2). <https://doi.org/10.1590/2179-8087.114417>

Di Persia, D. H., Neiff, J. J., & Olazarri, J. (1986). The Uruguay River system (pp. 599–629). https://doi.org/10.1007/978-94-017-3290-1_12

Ding, Y., Wang, J., Liu, Y., & Chen, S. (2005). Isolation and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region. *Journal of applied microbiology*, 99(5), 1271–1281.

do Santos, Á. F. (2010). Caracterização morfológica do fruto, da semente e do desenvolvimento da plântula de *Blepharocalyx salicifolius* (HBK) Berg. e *Myrceugenia gertii* Landrum-Myrtaceae. *Revista Brasileira de Sementes*, 32(3), 052–060.

Dobrzanski, T., Gravina, F., Steckling, B., Olchanheski, L., Sprenger, R., Espírito Santo, B., & Pileggi, M. (2018). *Bacillus megaterium* strains derived from water and soil exhibit differential responses to the herbicide mesotrione. *PLoS one*, 13(4), e0196166.

Donohue, K., Rubio De Casas, R., Burghardt, L., Kovach, K., & Willis, C. G. (2010). Germination, postgermination adaptation, and species ecological ranges. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 41, 293–319. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-102209-144715>

Etchebarne, V., & Brazeiro, A. (2016). Effects of livestock exclusion in forests of Uruguay: soil condition and tree regeneration. *Forest Ecology and Management*, 362, 120–129.

Etchebarne-Palla, V., Rodríguez-Silveira, P., López, L., Martino, D., Benavidez, V., & Porzio, J. (2022). Experiencias de conservación del bosque nativo de Uruguay: oportunidades y desafíos del uso de los bosques nativos integrados a la producción ganadera de Uruguay.

Fadji, A. E., Yadav, A. N., Santoyo, G., & Babalola, O. O. (2023). Understanding the plant-microbe interactions in environments exposed to abiotic stresses: An overview. *Microbiological Research*, 271, 127368.

Feng, F., Ge, J., Li, Y., He, S., Zhong, J., Liu, X., & Yu, X. (2017). Enhanced degradation of chlorpyrifos in rice (*Oryza sativa* L.) by five strains of endophytic bacteria and their plant growth promotional ability. *Chemosphere*, 184, 505–513. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.178>

Fenner, M., & Thompson, K. (2005). *The Ecology Of Seeds*. Cambridge University Press, 250 pp.

Fort, T., Pauvert, C., Zanne, A. E., Ovaskainen, O., Caignard, T., Barret, M., & Vacher, C. (2021). Maternal effects shape the seed mycobiome in *Quercus petraea*. *New Phytologist*, 230(4), 1594–1608.

González, S., & Cadenazzi, M. (2015). Recolonización natural por bosque ribereño en margen izquierda del embalse de Salto Grande: Identificación de especies pioneras. *Agrociencia (Uruguay)*, 19(1), 1-13.

Gouda, S., Das, G., Sen, S. K., Shin, H. S., & Patra, J. K. (2016). Endophytes: a treasure house of bioactive compounds of medicinal importance. *Frontiers in microbiology*, 7, 1538.

Grela, I. (2004). Geografía florística de las especies arbóreas de Uruguay: Propuesta para la delimitación de dendrofloras. Tesis, PEDECIBA, Montevideo, Uruguay, 97 pp.

Grubb, P. J. (1977). The maintenance of species-richness in plant communities: the importance of the regeneration niche. *Biological Review*, 52, 107-145.

Gupta, R. S., Patel, S., Saini, N., & Chen, S. (2020). Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel *Bacillaceae* genera. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(11), 5753-5798.

Haretche, F., Mai, P., & Brazeiro, A. (2012). Woody flora of Uruguay: inventory and implication within the Pampean region. *Acta Botanica Brasílica*, 26(3), 537-552.

Hernández-Pacheco, C. E., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., Flores, A., Valencia-Cantero, E., & Santoyo, G. (2021). Tissue-specific diversity of bacterial endophytes in Mexican husk tomato plants (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.), and screening for their multiple plant growth-promoting activities. *Current Research in Microbial Sciences*, 2, 100028.

Heyrman, J., Vanparys, B., Logan, N. A., Balcaen, A., Rodríguez-Díaz, M., Felske, A., & De Vos, P. (2004). *Bacillus novalis* sp. nov., *Bacillus vireti* sp. nov., *Bacillus soli* sp. nov., *Bacillus bataviensis* sp. nov. and *Bacillus drentensis* sp. nov., from the Drentse A grasslands. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(1), 47-57.

Hu, X., Roberts, D. P., Xie, L., Maul, J. E., Yu, C., Li, Y., Zhang, S., & Liao, X. (2013). Development of a biologically based fertilizer, incorporating *Bacillus megaterium* A6, for improved phosphorus nutrition of oilseed rape. *Canadian Journal of Microbiology*, 59(4), 231-236. <https://doi.org/10.1139/cjm-2012-0579>

Hughes, C. E., Ringelberg, J. J., Lewis, G. P., & Catalano, S. A. (2022). Disintegration of the genus *Prosopis* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae, mimosoid clade). *PhytoKeys*, 205, 147.

Huston, M. (2004). Management strategies for plant invasions: manipulating productivity, disturbance, and competition. *Diversity and Distributions*, 10, 167-178.

Ibort, P., Molina, S., Núñez, R., Zamarreño, Á., García-Mina, J. M., Ruiz-Lozano, J. M., & Aroca, R. (2017). Tomato ethylene sensitivity determines interaction with plant growth-promoting bacteria. *Annals of botany*, 120(1), 101-122.

Iris, S., Vargas, H., Carlos, J., Hernández, M., Del Carmen, D. M., & González Chávez, Á. (2014). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Repositorio Institucional BUAP. <https://repositorioinstitucional.buap.mx>

Izumi, H. (2011). Diversity of endophytic bacteria in forest trees. In A. M. Pirttilä & A. C. Frank (Eds.), *Endophytes of forest trees, biology and applications* (pp. 95-105). *Springer*. https://doi.org/10.1007/978-94-007-1599-8_6

Kämpfer, P., Ruppel, S., & Remus, R. (2005). *Enterobacter radicincitans* sp. nov., a plant growth promoting species of the family Enterobacteriaceae. *Systematic and applied microbiology*, 28(3), 213-221.

Kandel, S., Joubert, P., & Doty, S. (2017). Bacterial endophyte colonization and distribution within plants. *Microorganisms*, 5(4), 77. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5040077>

Kang, S. M., Radhakrishnan, R., You, Y. H., Joo, G. J., Lee, I. J., Lee, K. E., & Kim, J. H. (2014). Phosphate Solubilizing *Bacillus megaterium* mj1212 Regulates Endogenous Plant Carbohydrates and Amino Acids

Contents to Promote Mustard Plant Growth. *Indian Journal of Microbiology*, 54(4), 427–433. <https://doi.org/10.1007/s12088-014-0476-6>

Khalaf, E. M., & Raizada, M. N. (2018). Bacterial seed endophytes of domesticated cucurbits antagonize fungal and oomycete pathogens including powdery mildew. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00042>

Klironomos, J. N. (2002). Feedback with soil biota contributes to plant rarity and invasiveness in communities. *Nature*, 417(6884), 67–70.

Krey, T., Caus, M., Baum, C., Ruppel, S., & Eichler-Löbermann, B. (2011). Interactive effects of plant growth-promoting rhizobacteria and organic fertilization on P nutrition of *Zea mays* L. and *Brassica napus* L. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 174(4), 602–613. <https://doi.org/10.1002/jpln.201000163>

Lambrese, Y., Guiñez, M., Calvente, V., Sansone, G., Cerutti, S., Raba, J., & Sanz, M. I. (2018). Production of siderophores by the bacterium *Kosakonia radicincitans* and its application to control of phytopathogenic fungi. *Bioresource Technology Reports*, 3, 82–87.

Landrum, L. R. (1986). *Campomanesia*, *Pimenta*, *Blepharocalyx*, *Legrandia*, *Acca*, *Myrrhinium*, and *Luma* (Myrtaceae). *Flora Neotropica*, 45, 1–178.

Larios, L., Hallett, L. M., & Suding, K. N. (2017). Where and how to restore in a changing world: a demographic-based assessment of resilience. *Journal of Applied Ecology*, 54(4), 1040–1050. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12946>

Leck, M. Alessio., Parker, V. Thomas., & Simpson, Robert. (2008). Seedling ecology and evolution. *Cambridge University Press*.

Lehner, B., & Grill, G. (2013). Global river hydrography and network routing: baseline data and new approaches to study the world's large river systems. *Hydrological Processes*, 27(15), 2171–2186.

Lewis, S. L., & Tanner, E. V. (2000). Effects of above-and belowground competition on growth and survival of rain forest tree seedlings. *Ecology*, 81(9), 2525–2538.

Liu, X., Zhao, H., & Chen, S. (2006). Colonization of maize and rice plants by strain *Bacillus megaterium* C4. *Current Microbiology*, 52(3), 186–190. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-0162-3>

Liu, M., Luo, K., Wang, Y., Zeng, A., Zhou, X., Luo, F., & Bai, L. (2014). Isolation, identification and characteristics of an endophytic quinclorac degrading bacterium *Bacillus megaterium* Q3. *Plos one*, 9(9), e108012.

López-Bucio, J., Campos-Cuevas, J. C., Hernández-Calderón, E., Velásquez-Becerra, C., Farías-Rodríguez, R., Macías-Rodríguez, L. I., & Valencia-Cantero, E. (2007). *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin-and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(2), 207–217.

Lorenzi, H. (1998). Manual de identificação e cultivo de plantas úteis do Brasil. *Plantarum*.

Mahmood, S., Daur, I., Al-Solaimani, S. G., Ahmad, S., Madkour, M. H., Yasir, M. & Ali, Z. (2016). Plant growth promoting rhizobacteria and silicon synergistically enhance salinity tolerance of mung bean. *Frontiers in plant science*, 7, 876. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00876>

Malfanova, N., Lugtenberg, B. J., & Berg, G. (2013). Bacterial endophytes: who and where, and what are they doing there?. *Molecular microbial ecology of the rhizosphere*, 1, 391–403.

Mantese, A. I., & Montaldo, N. H. (2002). Contribución a la anatomía foliar de *Blepharocalyx salicifolius* (Myrtaceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 37(3–4), 167–170.

Marulanda, A., Azcón, R., Chaumont, F., Ruiz-Lozano, J. M., & Aroca, R. (2010). Regulation of plasma membrane aquaporins by inoculation with a *Bacillus megaterium* strain in maize (*Zea mays* L.) plants under unstressed and salt-stressed conditions. *Planta*, *232*(2), 533–543. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1196-8>

Mary-Lauy , A. L., González-Bergonzoni, I., Gobel, N., Somma, A., Silva, I., & Lucas, C. M. (2023). Baseline assessment of the hydrological network and land use in riparian buffers of Pampean streams of Uruguay. *Environmental Monitoring and Assessment*, *195*(1), 80.

Mello, L. M., Cantos, A. A., Meneghello, G. E., Silva, A. C. S., & Villela, F. A. (2016). Supera o de dormência e influência da temperatura, substrato e fotoper odo na germina o de sementes de *Erythrina crista-galli* L. (FABACEAE). *Revista Thema*, *13*(3), 30–37.

MGAP. 2018. Cartografía Nacional de Bosque Nativo 2016 (CNBN) Elaborada por el Proyecto REDD+ Uruguay (MGAP - MVOTMA).

Morales, C., Cardenas, L., & Huertas, M. (1995). Las plantas medicinales en el Uruguay. *Editorial Universitaria*.

Neill, D. (1993). Manual de identificación de árboles y arbustos de Uruguay. *Editorial Universitaria*.

Nelson, E. B. (2018). The seed microbiome: Origins, interactions, and impacts. *Plant and Soil*, *422*(1–2), 7–34. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3289-7>

Nelson, E. B., Simoneau, P., Barret, M., Mitter, B., & Compant, S. (2018). Editorial special issue: the soil, the seed, the microbes and the plant. *Plant and Soil*, *422*(1), 1–5. <https://doi.org/10.1007/s11104-018-3576-y>

Nores, M., Cerana, M. M., & Serra, D. A. (2005). Dispersal of forest birds and trees along the Uruguay River in southern South America. *Diversity and Distributions*, *11*(3), 205–217.

Olayemi, O. P., & Odedara, O. O. (2017). Screening of endophytic plant growth-promoting bacteria isolated from two Nigerian rice varieties. *Nigerian Journal of Biotechnology*, *33*(1). <https://doi.org/10.4314/v33i1.1>

Palacios, R. A., & Brizuela, M. M. (2005). *Prosopis*: historia y elementos para su domesticación.

Partida-Martínez, L. P., & Heil, M. (2011). The microbe-free plant: fact or artifact?. *Frontiers in Plant Science*, *2*, 100.

Patel, S., & Gupta, R. S. (2020). A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology*, *70*(1), 406–438.

Pereira, S. I. A., Monteiro, C., Vega, A. L., & Castro, P. M. (2016). Endophytic culturable bacteria colonizing *Lavandula dentata* L. plants: isolation, characterization and evaluation of their plant growth-promoting activities. *Ecological Engineering*, *87*, 91–97.

Pinay, G., Roques, L., & Fabre, A. (1993). Spatial and temporal patterns of denitrification in a riparian forest. *Journal of Applied Ecology*, 581–591.

Proyecto REDD+ Uruguay (2019). Análisis de las Especies Exóticas Invasoras (EEI) en Bosques Nativos del Uruguay, en base a parcelas del Inventario Forestal Nacional (IFN). Garcia de Souza, M. L., Justo, C., Miguel, C. y Martino, D. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca - Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente. Montevideo.

Proyecto REDD+ Uruguay (2020). Análisis de los impulsores de deforestación y degradación del bosque nativo en Uruguay. García de Souza, M. L., Chiesa, V., Etchebarne, V., Justo, C. y Martino, D. Proyecto Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca-Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente. Montevideo, Uruguay.

Quintas-Nunes, F., Rossi, M. J., & Nascimento, F. X. (2022). Genomic insights into the plant-associated lifestyle of *Kosakonia radicincitans* MUSA4, a diazotrophic plant-growth-promoting bacterium. *Systematic and Applied Microbiology*, *45*(2). <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2022.126303>

Rego, S. S., Nogueira, A. C., Kuniyoshi, Y. S., & Santos, Á. F. D. (2009). Germinação de sementes de *Blepharocalyx salicifolius* (HBK) Berg. em diferentes substratos e condições de temperaturas, luz e umidade. *Revista Brasileira de Sementes*, 31, 212-220.

Rego, S. S., Nogueira, A. C., Medeiros, A. C. D. S., Petkowicz, C. L. D. O., & Santos, Á. F. D. (2013). Physiological behaviour of *Blepharocalyx salicifolius* and *Casearia decandra* seeds on the tolerance to dehydration. *Journal of Seed Science*, 35, 323-330.

Reinhart, K. & Callaway, R. M. (2006). Soil biota and invasive plants. *New phytologist*, 170(3), 445-457.

Reparaz, J. M. (2018). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en trigo (*Triticum* spp.) y maíz (*Zea mays*) (Tesis, Universidad Nacional de La Plata). *Repositorio de la Universidad Nacional de La Plata*. <https://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/70999>

Rodríguez, E. E., Aceñolaza, P. G., Picasso, G., & Gago, J. (2018). Plantas del bajo Río Uruguay: Árboles y Arbustos. Comisión Administradora del Río Uruguay.

Rosenblueth, M., & Martínez-Romero, E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(8), 827-837. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-8-0827>

Routhu, S. R., Ragi, N. C., Yedla, P., Shaik, A. B., Venkataraman, G., Cheemalamarri, C., Chityala, G. K., Amanchy, R., Sripadi, P., & Kamal, A. (2021). Identification, characterization and evaluation of novel antifungal cyclic peptides from *Neobacillus drentensis*. *Bioorganic Chemistry*, 115. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105180>

Ruppel, S., & Merbach, W. (1995). Effects of different nitrogen sources on nitrogen fixation and bacterial growth of *Pantoea agglomerans* and *Azospirillum* sp. in bacterial pure culture: an investigation using ¹⁵N₂ incorporation and acetylene reduction measures. *Microbiological research*, 150(4), 409-418.

Ruppel, S., Rühlmann, J., & Merbach, W. (2006). Quantification and localization of bacteria in plant tissues using quantitative real-time PCR and online emission fingerprinting. *Plant and Soil*, 286(1), 21-35. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-9023-5>

Sarmiento, C., Zalamea, P. C., Dalling, J. W., Davis, A. S., Simon, S. M., U'Ren, J. M., & Arnold, A. E. (2017). Soilborne fungi have host affinity and host-specific effects on seed germination and survival in a lowland tropical forest. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(43), 11458-11463. <https://doi.org/10.1073/pnas.1706324114>

Schilling, M. A., & Hill, C. W. (1998). Managing the new product development process: Strategic imperatives. *Academy of Management Perspectives*, 12(3), 67-81.

Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7), 671-675.

Sessa, L., Abreo, E., & Lupo, S. (2018). Diversity of fungal latent pathogens and true endophytes associated with fruit trees in Uruguay. *Journal of Phytopathology*, 166(9), 633-647.

Shade, A., Jacques, M. A., & Barret, M. (2017). Ecological patterns of seed microbiome diversity, transmission, and assembly. *Current Opinion in Microbiology*, 37, 15-22. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.03.010>

Sharifi, R., & Ryu, C. M. (2018). Revisiting bacterial volatile-mediated plant growth promotion: lessons from the past and objectives for the future. *Annals of Botany*, 122(3), 349-358.

Shearin, Z. R., Filipek, M., Desai, R., Bickford, W. A., Kowalski, K. P., & Clay, K. (2018). Fungal endophytes from seeds of invasive, non-native *Phragmites australis* and their potential role in germination and seedling growth. *Plant and Soil*, 422, 183-194.

Silva, A., Carpanezzi, & Lavoranti, O. (2006). Quebra de dormência de sementes *Erythrina crista-galli*.

Sosa, B., Caballero, N., Carvajales, A., Fernández, G., Mello, A. L., & Achkar, M. (2015). Control de *Gleditsia triacanthos* en el Parque Nacional Esteros de Farrapos e Islas del Río Uruguay. *Ecología austral*, 25(3), 250-254.

Sun, S., Chen, Y., Cheng, J., Li, Q., Zhang, Z., & Lan, Z. (2018). Isolation, characterization, genomic sequencing, and GFP-marked insertional mutagenesis of a high-performance nitrogen-fixing bacterium, *Kosakonia radicincitans* GXGL-4A and visualization of bacterial colonization on cucumber roots. *Folia Microbiologica*, 63, 789-802.

Susilowati, D., Sudiana, I., Mubarik, N., & Suwanto, A. (2015). Species and functional diversity of rhizobacteria of rice plant in the coastal soils of Indonesia. *Indonesian Journal Agricultural Science*, 16(1), 39–50.

Taulé, C., Castillo, A., Villar, S., Olivares, F., & Battistoni, F. (2016). Endophytic colonization of sugarcane (*Saccharum officinarum*) by the novel diazotrophs *Shinella* sp. UYSO24 and *Enterobacter* sp. UYSO10. *Plant and Soil*, 403, 403-418.

Taulé, C., Luizzi, H., Beracochea, M., Mareque, C., Platero, R., & Battistoni, F. (2019). The Mo-and Fe-nitrogenases of the endophyte *Kosakonia* sp. UYSO10 are necessary for growth promotion of sugarcane. *Annals of Microbiology*, 69, 741-750.

Tiscornia, S., Ruiz, R., & Bettucci, L. (2012). Fungal endophytes from vegetative and reproductive tissues of *Eugenia uruguayensis* in Uruguay. *Sydowia*, 64(2), 313-328.

Vaz Jauri, P. V., Silva, C., Trasante, T., Acosta, S., Tió, A., Lucas, C., & Massa, A. M. (2023). Exploration of seed culturable microbiota for the conservation of South American riparian forests. *Environmental Sustainability*, 6(3), 359-371.

Velásquez Holguín, L. F., Montoya Yepes, D. F., Jiménez Rodríguez, A. A., Murillo Arango, W., & Méndez Arteaga, J. J. (2019). Género *Erythrina*: Actualidad en la investigación y perspectivas de desarrollo científico.

von Cosmos, N. H., Watson, B. A., Fellman, J. K., Mattinson, D. S., & Edwards, C. G. (2017). Characterization of *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, and *Paenibacillus polymyxa* isolated from a Pinot noir wine from Western Washington State. *Food Microbiology*, 67, 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.05.003>

Wang, B. C., & Smith, T. B. (2002). Closing the seed dispersal loop. *Trends in Ecology & Evolution*, 17(8), 379–385. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(02\)02541-7](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)02541-7)

Wang, H., Zheng, X. W., Su, J. Q., Tian, Y., Xiong, X. J., & Zheng, T. L. (2009). Biological decolorization of the reactive dyes Reactive Black 5 by a novel isolated bacterial strain *Enterobacter* sp. EC3. *Journal of Hazardous Materials*, 171(1-3), 654-659.

Wang, S. A., Tokars, J. I., Bianchine, P. J., Carson, L. A., Arduino, M. J., Smith, A. L., & Jarvis, W. R. (2000). *Enterobacter cloacae* bloodstream infections traced to contaminated human albumin. *Clinical Infectious Diseases*, 30(1), 35-40.

War Nongkhaw, F. M., & Joshi, S. R. (2014). Epiphytic and endophytic bacteria that promote growth of ethnomedicinal plants in the subtropical forests of Meghalaya, India. *Revista de Biología Tropical*, 62(4), 1295-1308.

War, A. F., Bashir, I., Reshi, Z. A., Kardol, P., & Rashid, I. (2023). Insights into the seed microbiome and its ecological significance in plant life. *Microbiological Research*, 269, 127318.

Weyens, N., van der Lelie, D., Taghavi, S., Newman, L., & Vangronsveld, J. (2009). Exploiting plant-microbe partnerships to improve biomass production and remediation. *Trends in Biotechnology*, 27(10), 591–598. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.07.006>

White, J. F., Kingsley, K. I., Kowalski, K. P., Irizarry, I., Micci, A., Soares, M. A., & Bergen, M. S. (2018). Disease protection and allelopathic interactions of seed-transmitted endophytic pseudomonads of invasive reed grass (*Phragmites australis*). *Plant and Soil*, 422, 195-208.

Yadav, S., Kaushik, R., Saxena, A. K., & Arora, D. K. (2011). Diversity and phylogeny of plant growth-promoting bacilli from moderately acidic soil. *Journal of Basic Microbiology*, *51*(1), 98–106. <https://doi.org/10.1002/jobm.201000098>

Yarte, M. E., Llorente, B. E., & Larraburu, E. E. (2022). Native putatively endophytic bacteria from *Handroanthus impetiginosus* improves its in vitro rooting. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *151*(2), 265-274.

Zabaleta, M. (2013). Conservación de leguminosae nativas y sus bacterias simbióticas del Parque Nacional Esteros de Farrapos e Islas del Río Uruguay (ROU). Universidad de la República. <http://hdl.handle.net/20.500.12008/4049>

Zhou, C., Ma, Z., Zhu, L., Xiao, X., Xie, Y., Zhu, J., & Wang, J. (2016). Rhizobacterial strain *Bacillus megaterium* BOFC15 induces cellular polyamine changes that improve plant growth and drought resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(6), 976. <https://doi.org/10.3390/ijms17060976>

Zilber-Rosenberg, I., & Rosenberg, E. (2008). Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: The hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, *32*(5), 723–735. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00123.x>

Zou, C., Li, Z., & Yu, D. (2010). *Bacillus megaterium* strain XTBG34 promotes plant growth by producing 2-pentylfuran. *The Journal of Microbiology*, *48*, 460-466.

Anexo 1: Diversos orígenes de las bacterias endófitas seleccionadas: *N. drentensis*, *K. radicincitans*, *C. freundii* y *P. megaterium*, incluyendo sus respectivos hospedantes, y las referencias bibliográficas correspondientes.

Bacteria	Host / Lugar de origen	Localidad	Artículos
<i>N. drentensis</i>	Raíz, tallo y hoja de Tomate (<i>Physalis ixocarpa</i>)	México	Hernández-Pacheco et al. 2021
	Rizosfera de arroz (<i>Oryza sativa</i>)	India	Yadav et al. 2011
	Rizosfera del Frijol mungo (<i>Vigna radiata</i>)	Arabia Saudita	Mahmood et al. 2016
	Raíz y brotes de <i>Lavandula dentata</i>	Portugal	Pereira et al. 2015
	Tallo de Mimosa pudica	Bangladesh	Akter ,2022.
	Suelos salinos	México	Magaña 2021.
	Aguas marinas y sedimentos de petróleo	India	Routhu et al. 2021
<i>K. radicincitans</i>	Filosfera de Trigo de invierno (<i>Triticum aestivum</i>)		Remus et al. 2000
	Tallo de Caña de azúcar (<i>Saccharum officinarum</i>)	Uruguay	Talué et al. 2016.
	Yerba mate (<i>Ilex paraguariensis</i>)		Bergottini et al. 2016
<i>C. freundii</i>	Hoja de banano (<i>Musa</i> sp.)		Quintas-Nunes et al. 2022.
	Raíz de Cebada (<i>Hordeum vulgare</i>)	Argentina	Reparaz J. M. (2018).
	Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	México	Luna-Guevara et al. 2012.
	Rizosfera de Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	Indonesia	Susilowatia et al. 2015.
	Raíz de Maíz (<i>Zea mays</i>)	Sudáfrica	Fadiji et al. 2023.
	Raíz, tallo y hoja de Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	Nigeria	Olayemi & Odedara, 2017.
<i>P. megaterium</i>	Hoja de Mimosa pudica	Bangladesh	Akter et al. 2022
	Suelo y agua de un cultivo de Maíz (<i>Zea mays</i>)	Brasil	Dobrzanski et al. 2018.
	Suelo de invernadero salinizado	China	Wang, et al. 2021
	Rizosfera de Maíz (<i>Zea mays</i>)	China	Liu et al. 2006.
	Miel	Argentina	López y Alippi, 2010.
	Vino	EE.UU	von Cosmos et al. 2017
	Rizosfera de Colza (<i>Brassica napus</i>)	China	Hu et al. 2013
	Nódulos de raíces de Soja (<i>Glycine max</i>)	China	Zhou et al.2017.
	Nódulos de Frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Kenia	Korir et al.2017.
	Raíz de Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	China	Feng et al.2017.
	Rizofera de Té (<i>Camellia sinensis</i>)	India	Chakraborty et al. 2006.

Anexo 2: Rasgos promotores del crecimiento en plantas de las bacterias: *N. drentensis*, *K. radicincitans*, *C. freundii* y *P. megaterium*, en plantas vasculares bajo diferentes condiciones experimentales. Los efectos observados incluyen parámetros específicos según el tipo de planta y las condiciones del experimento.

Bacteria	Rasgo promotor de crecimiento en plantas	Artículos
<i>N. drentensis</i>	Antagonismo fúngico contra <i>Botrytis cinerea</i> , <i>F. solani</i> y <i>Rhizoctonia solani</i> .	Hernández-Pacheco et al. 2021.
	Antagonismo fúngico contra <i>Fusarium graminearum</i>	Vaz Jauri et al. 2023.
	Producción de cianuro de hidrógeno (HCN) y amoníaco (NH ₃)	Pereira et al. 2015.
	Eficiencia antifúngica contra <i>Candida albicans</i>	Routhu et al. 2021.
	Producción de ácido indolacético (IAA)	Hernández-Pacheco et al. 2021; Mahmood et al. 2016; Pereira et al. 2015.
<i>K. radicincitans</i>	Producción de enzimas extracelulares: celulasa, pectinasa, proteasa	Pereira et al. 2015.
	Solubilización de fosfato y producción de sideróforos	Hernández-Pacheco et al. 2021; Mahmood et al. 2016.
	Actividad ACC-desaminasa	Mahmood et al. 2016.
	Antagonismo fúngico contra <i>Fusarium graminearum</i>	Vaz Jauri et al. 2023.
	Diazotrófica eficiente	Ruppel y Merbach, 1995; Sun et al. 2018.
<i>C. freundii</i>	Solubilización de fosfatos	Schilling et al. 1998.
	Producción de sideróforos	Bergottini et al. 2015.
	Resistencia en <i>Arabidopsis thaliana</i> contra algunas especies de insectos fitófagos	Brock, 2018.
	Antagonismo fúngico contra <i>Fusarium graminearum</i>	Vaz Jauri et al. 2023.
	Producción de ácido indolacético (IAA)	Susilowati et al. 2015.
<i>P. megaterium</i>	Solubilización de fosfatos y producción de celulasa	Susilowati et al. 2015.
	Antagonismo con <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Rhizoctonia solani</i>	Olayemi & Odedara, 2017.
	Producción de ácido indolacético (IAA)	Chakraborty et al. 2006; Feng et al. 2017.
	Producción de ácido abscísico (ABA) en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	Zhou., et al. 2016.
	Producción de compuestos volátiles	Ryu et al. 2003; Sharifi y Ryu 2018; Zou et al. 2010.
<i>P. megaterium</i>	Producción de sideróforos	Chakraborty et al. 2006; Feng et al. 2017.
	Solubilización de fosfatos	Chakraborty et al. 2006; Feng et al. 2017; Kang et al. 2014.
	Metabolitos antifúngicos: antagonismo contra <i>Fusarium lamaoensis</i> , <i>Phytophthora hipobrumea</i> , <i>Sclerotinia repens</i> y <i>Sclerotium rolfsii</i>	Chakraborty et al. 2006.

Anexo 3: Efectos de inoculación de *N. drentensis*, *K. radicincitans*, *C. freundii* y *P. megaterium*, en plantas vasculares bajo diferentes condiciones experimentales. Los efectos observados incluyen parámetros específicos según el tipo de planta y las condiciones del experimento.

Bacteria	Planta	Efecto de inoculación	Condiciones	Referencias
<i>N. drentensis</i>	Frijol mungo (<i>Vigna radiata</i>)	Incrementa la longitud de raíces y brotes, así como el peso fresco de raíces y brotes.	Campo	Mahmood et al. 2016.
	Maíz (<i>Zea mays</i> L.)	Mejora la altura y diámetro del tallo, longitud de la raíz, y biomasa aérea y de raíz bajo condiciones de estrés por salinidad.	Invernadero	Alfonso Ayil, 2023.
<i>K. radicincitans</i>	<i>Brassica oleracea</i>	Mejora el desarrollo de raíces, hojas y tubérculos.	Invernadero	Ruppel et al. 2006.
	Rábano (<i>Raphanus sativus</i>)	Favorece el crecimiento de tubérculos y hojas.	Campo.	Berger et al. 2015.
	Maíz (<i>Zea mays</i> L.)	Incrementa los rendimientos de ensilado y la biomasa de los granos.	Campo.	Berger 2018.
	Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	Acelera la floración y maduración de frutos, mejora el desarrollo de raíces y brotes.	Invernadero	Berger et al. 2013, 2017.
	Pepino (<i>Cucumis sativus</i>)	Aumenta la altura y biomasa de la planta.	Invernadero	Sun et al. 2018.
	Caña de azúcar (<i>Saccharum officinarum</i>)	Mejora la altura y diámetro del tallo y el desarrollo de la raíz.	Laboratorio / invernadero	Taulé, et al. 2016. Taulé, et al. 2019
	Colza (<i>Brassica napus</i> L.) <i>Arabidopsis thaliana</i>	Aumenta la biomasa de la planta. Incrementa el peso de las semillas.	Campo / Laboratorio	Krey et al. 2011. Brock et al 2013.
<i>C. freundii</i>	Vainilla (<i>Vanilla planifolia</i>)	Mejora la biomasa seca, área foliar y desarrollo de raíces.	Invernadero	Hernández Vargas, 2014.
<i>P. megaterium</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Aumenta el número de raíces laterales, el crecimiento de las raíces laterales y la longitud del pelo de las raíces.	Laboratorio	López-Bucio et al. 2007.
	Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	Aumenta la biomasa seca.		lbort et al. 2017; Porcel et al. 2014.
	Té (<i>Camellia sinensis</i>)	Aumenta la altura, el número de hojas y el número de ramas laterales.	Invernadero	Chakraborty et al. 2006.
	Maíz (<i>Zea mays</i> L.)	Mejora diversos parámetros de crecimiento de la planta.	Invernadero	Marulanda et al. 2010.
	Mostaza (<i>Brassica juncea</i>)	Aumenta la longitud de los brotes, la longitud de las raíces y el peso fresco de las plantas.	Invernadero	Kang et al. 2014.

Anexos de estadísticos

Anexo 4. Promedio (n=50 semillas) de biomasa, ancho y largo de las tres especies arbóreas de enfoque.

Nombre científico	Biomasa (g)	Largo (cm)	Ancho (cm)
<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	0.044 ±0.009	0,50 ±0.012	0,42 ±0.006
<i>Erythrina crista-galli</i>	0.421 ±0.045	1,30 ±0.010	0,65 ±0.015
<i>Neltuma affinis</i>	0.047 ±0.004	0,64 ±0.045	0,54 ±0.022

Anexo 5: Proporción de semillas viables con el test de Tetrazolio (TZ); inicial (n=20 semillas) y final del experimento (semillas no germinadas). Proporción de semillas viables determinada mediante el ensayo de Tetrazolio (TZ); resultados iniciales (n = 20 semillas) y finales (evaluados en semillas no germinadas al término del experimento). Los valores señalados con un asterisco (*) corresponden a los tratamientos en los que se aplicó el ensayo de Tetrazolio con un porcentaje de semillas viables dentro de un rango del 85 % al 90 %.

Especie	Tratamiento	Tetrazolio inicial	Tetrazolio final
<i>B. salicifolius</i>	Control	0,98 ±0.2	0,97
	<i>N. drentensis</i>	0,98 ±0.2	0,98
	<i>K. radicincitans</i>	0,98 ±0.2	0,95
	<i>C. freundii</i>	0,98 ±0.2	0,98
<i>E. crista-galli</i>	Control	1	0,96
	<i>N. drentensis</i>	1	0,97
	<i>K. radicincitans</i>	1	0,93
	<i>C. freundii</i>	1	0,97
<i>N. affinis</i>	Control	1	1*
	<i>N. drentensis</i>	1	1*
	<i>K. radicincitans</i>	1	1*
	<i>P. megaterium</i>	1	1*

Anexo 6: Prueba de Kruskal-Wallis (χ^2 , p-valor) para cada una de las especies (*B. salicifolius*, *E. crista-galli*, *N. affinis*) y para cada una de las variables medidas (Gf, MGT, Vg). Se presenta el valor de la estadística χ^2 y el valor de p asociado a cada variable. Las comparaciones significativas se indican con un asterisco (*).

Especie	Prueba de Kruskal-Wallis (χ^2 , p-valor)		
	Gf	MGT	Vg
<i>B. salicifolius</i>	$\chi^2 = 3.187$, p = 0.364	$\chi^2 = 10.39$, p = 0.016*	$\chi^2 = 10.39$, p = 0.016*
<i>E. crista-galli</i>	$\chi^2 = 9.478$, p = 0.024*	$\chi^2 = 11.64$, p = 0.009*	$\chi^2 = 5.362$, p = 0.150
<i>N. affinis</i>	$\chi^2 = 2.555$, p = 0.465	$\chi^2 = 10.93$, p = 0.012*	$\chi^2 = 10.93$, p = 0.012*

Anexo 7: Comparaciones post hoc Prueba de Dunn (Z, p-valor , aplicada únicamente a las comparaciones que resultaron significativas en la prueba de Kruskal-Wallis. Se evaluaron las diferencias entre el grupo de control y cada tratamiento (Control, *N. drentensis*, *K. radicincitans*, *C. freundii* y *P. megaterium*) para cada especie (*B. salicifolius*, *E. crista-galli*, *N. affinis*) y variables medidas (Gf, MGT, Vg). Se presenta el valor de la estadística Z y el p-valor asociado a cada comparación. Las comparaciones significativas se indican con un asterisco (*).

Especie	Tratamiento	Prueba de Dunn (Control vs Tratamiento) (Z, p-valor)		
		Gf	MGT	Vg
<i>B. salicifolius</i>	<i>N. drentensis</i>		Z = -0.071, p = 0.472	Z = 0.071, p = 0.472
	<i>K. radicincitans</i>		Z = -2.672, p = 0.004	Z = 2.672, p = 0.004
	<i>C. freundii</i>		Z = -0.052, p = 0.479	Z = 0.052, p = 0.479
<i>E. crista-galli</i>	<i>N. drentensis</i>	Z = -0.492, p = 0.311	Z = -1.459, p = 0.072	
	<i>K. radicincitans</i>	Z = -2.230, p = 0.013*	Z = -2.363, p = 0.009*	
	<i>C. freundii</i>	Z = 0.723, p = 0.235	Z = 0.717, p = 0.237	
<i>N. affinis</i>	<i>N. drentensis</i>		Z = 1.139, p = 0.127	Z = -1.139, p = 0.127
	<i>K. radicincitans</i>		Z = -1.755, p = 0.040*	Z = 1.755, p = 0.040*
	<i>P. megaterium</i>		Z = 1.066, p = 0.143	Z = -1.066, p = 0.143

Anexo 8: Resultados de la selección del modelo GLM (Modelo Lineal Generalizado) y LMM (Modelo Lineal Mixto) para las variables de plántulas de *B. salicifolius*, *E. crista-galli* y *N. affinis*. Para cada modelo, se incluyen los resultados del test de normalidad de Shapiro-Wilk (W, p-valor), así como los criterios de información de Akaike (AIC) y Bayesiano (BIC). Con asterisco (*) el modelo seleccionado.

Especie	Variable	ShapiroWilk (W, p-value)	AIC	BIC	Modelo
<i>B. salicifolius</i>	Biomasa seca total (g)	0.98, 0.01	-1017.63	-1002.25	GLM*
		0.97, 0	-976.24	-957.79	LMM
	Área foliar (cm ²)	0.95, <0	463.66	479.04	GLM
		0.96, <0	453.75	472.20	LMM*
	Subterráneo: aérea	0.88, <0	-12.24	3.14	GML*
		0.88, <0	8.97	27.42	LMM
<i>E. crista-galli</i>	Biomasa seca total (g)	0.98, 0.21	400.77	416.15	GLM
		0.99, 0.17	403.30	421.75	LMM*
	Área foliar (cm ²)	0.98, 0.35	-5.21	3.71	GLM*
		0.97, 0.30	11.11	21.81	LMM
	Subterráneo: aérea	0.92, 0.01	435.42	444.34	GLM
		0.92, 0.07	409.33	420.04	LMM*
<i>N. affinis</i>	Biomasa seca total (g)	0.85, <0	-24.94	-15.80	GLM*
		0.86, <0	-6.66	4.31	LMM
	Área foliar (cm ²)	0.97, 0.21	225.16	234.07	GLM*
		0.97, 0.21	220.54	231.24	LMM
	Subterráneo: aérea	0.98, 0.01	-856.72	-837.43	LMM
		0.98, 0.02	-897.37	-881.30	GLM*
Altura (cm)	0.96, <0	550.45	563.27	LMM*	
	0.95, <0	557.88	567.49	GLM	
	0.98, 0.03	-69.95	-50.66	LMM	
	0.98, 0.01	-93.07	-76.99	GLM*	
Altura (cm)	0.99, 0.36	859.66	878.88	LMM*	
	0.99, 0.20	868.95	884.97	GLM	

Anexo 9: Resultados de ANOVA para el modelo seleccionado y comparaciones múltiples de Tukey ($\alpha = 0,05$) para las variables biomasa seca total, área foliar, relación subterráneo:aérea y altura en las especies *B. salicifolius*, *E. crista-galli* y *N. affinis* bajo diferentes tratamientos de inoculación. Se incluyen los grados de libertad (G.l) para los modelos lineales generalizados (GLM) o modelos lineales mixtos (LMM), según corresponda (Anexo 8). Las letras representan grupos identificados a través de las pruebas de Tukey.

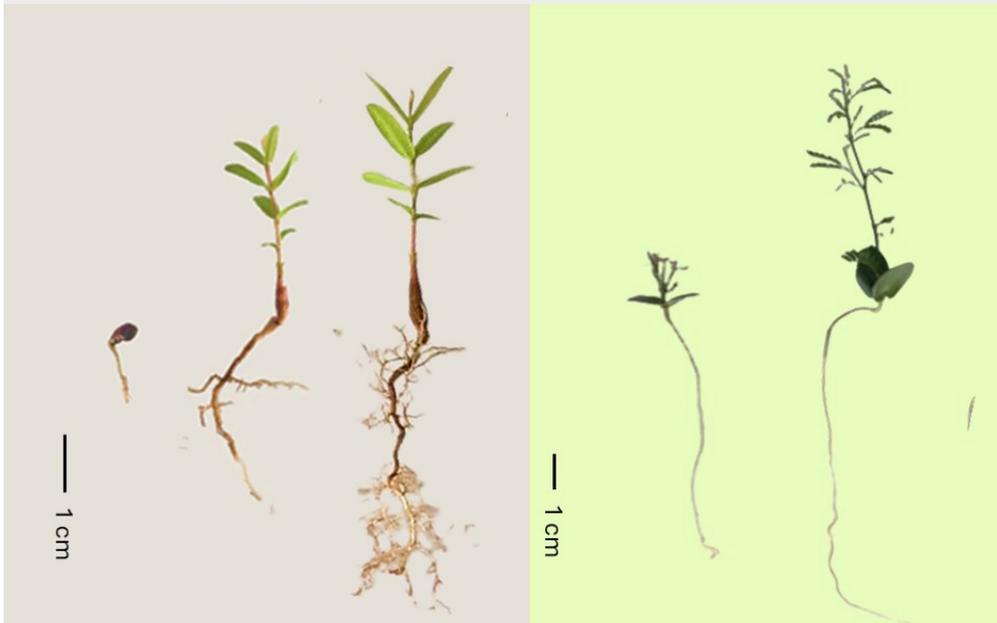
Especie	Variable	Anova					Tukey	
		Tratamiento	Est.	Error Stand.	Valor t	p-valor; G.l	Media Ajustada	Grupo
<i>B. salicifolius</i>	Biomasa seca total (g)	Intercepto	0,02	0,00	12,515	p<0.001	0,022	a
		<i>N. drentensis</i>	0,00	0,00	0,692	0,490; 156	0,023	ab
		<i>K. radicincitans</i>	0,01	0,00	2,957	0,004; 156	0,029	b
		<i>C. freundii</i>	0,00	0,00	1,998	0,048; 156	0,026	ab
	Área foliar (cm ²)	Intercepto	0,86	0,22	3,884	p<0.001	0,870	a
		<i>N. drentensis</i>	0,63	0,30	2,081	0,043; 43	1,493	ab
		<i>K. radicincitans</i>	1,37	0,31	4,408	0,003; 50	2,237	b
		<i>C. freundii</i>	0,84	0,31	2,702	0,009; 51	1,708	b
	Subterráneo: aérea	Intercepto	0,45	0,04	11,240	p<0.001	0,447	a
		<i>N. drentensis</i>	-0,01	0,05	-0,203	0,839; 156	0,437	a
		<i>K. radicincitans</i>	-0,02	0,05	-0,387	0,700; 156	0,426	a
		<i>C. freundii</i>	0,08	0,05	1,471	0,143; 156	0,526	a
	Altura (cm)	Intercepto	1,72	0,17	9,997	p<0.001	1,722	a
		<i>N. drentensis</i>	0,27	0,23	1,169	0,650; 53	1,990	ab
		<i>K. radicincitans</i>	0,82	0,24	3,414	0,007; 47	2,540	b
		<i>C. freundii</i>	0,48	0,24	2,001	0,205; 41	2,200	ab
<i>E. crista-galli</i>	Biomasa seca total (g)	Intercepto	0,52	0,06	9,233	p<0.001	0,521	a
		<i>N. drentensis</i>	0,15	0,09	1,780	0,082; 42	0,675	ab
		<i>K. radicincitans</i>	0,23	0,07	3,321	0,002; 42	0,752	b
		<i>C. freundii</i>	0,17	0,09	1,811	0,0773; 42	0,692	ab
	Área foliar (cm ²)	Intercepto	7,69	0,88	8,717	p<0.001	7,690	ab
		<i>N. drentensis</i>	-1,78	1,41	-1,256	0,217; 43	5,910	a
		<i>K. radicincitans</i>	0,86	1,10	0,787	0,436; 43	8,550	ab
		<i>C. freundii</i>	3,53	1,49	2,374	0,023; 43	11,220	b
	Subterráneo: aérea	Intercepto	0,39	0,05	7,239	p<0.001	0,388	b
		<i>N. drentensis</i>	-0,23	0,08	-2,724	0,010; 43	0,160	a
		<i>K. radicincitans</i>	-0,12	0,07	-1,849	0,072; 43	0,266	ab
		<i>C. freundii</i>	0,02	0,08	0,226	0,823; 43	0,406	b
	Altura (cm)	Intercepto	7,69	0,88	8,717	p<0.001	7,690	ab
		<i>N. drentensis</i>	-1,78	1,41	-1,256	0,217; 43	5,910	a
		<i>K. radicincitans</i>	0,86	1,10	0,787	0,436; 43	8,550	ab
		<i>C. freundii</i>	3,53	1,49	2,374	0,023; 43	11,220	b
<i>N. affinis</i>	Biomasa seca total (g)	Intercepto	0,06	0,00	19,760	p<0.001	0,062	a
		<i>N. drentensis</i>	0,07	0,00	2,610	0,010; 180	0,073	b
		<i>K. radicincitans</i>	0,07	0,00	0,798	0,426; 180	0,066	ab
		<i>P. megaterium</i>	0,07	0,00	1,733	0,085; 180	0,069	ab
	Área foliar (cm ²)	Intercepto	2,89	0,20	14,179	p<0.001	2,890	a
		<i>N. drentensis</i>	1,08	0,28	3,804	0,001; 50	3,970	b
		<i>K. radicincitans</i>	0,69	0,29	2,404	0,020; 53	3,580	ab
		<i>P. megaterium</i>	0,98	0,28	3,458	0,002; 49	3,870	b
	Subterráneo: aérea	Intercepto	0,50	0,03	1,780	p<0.001	0,496	a
		<i>N. drentensis</i>	0,48	0,03	-0,560	0,576; 180	0,475	a
		<i>K. radicincitans</i>	0,48	0,03	-0,520	0,604; 180	0,476	a
		<i>P. megaterium</i>	0,43	0,03	-1,723	0,087; 180	0,430	a
	Altura (cm)	Intercepto	6,40	0,40	16,201	p<0.001	6,401	a
		<i>N. drentensis</i>	1,93	0,54	3,542	0,001; 178	8,333	b
		<i>K. radicincitans</i>	1,08	0,56	1,929	0,057; 178	7,478	ab
		<i>P. megaterium</i>	1,72	0,54	3,185	0,002; 178	8,133	b

E. crista-galli



B. Salicifolius

N. affinis



Anexo 10. Desarrollo de plántulas de: *E. crista-galli* inoculadas con *K. radicincitans*, a los 5, 25 y 62 días posteriores a la germinación; *B. salicifolius* inoculadas con *K. radicincitans*, a los 2, 15 y 25 días posteriores a la germinación; *N. affinis* inoculadas con *K. radicincitans*, a los 19 y 42 días posteriores a la germinación.